

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391151** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.06.27**

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)  
*A61P 31/14* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.10.19**

---

(54) **РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК E2 ВИРУСА КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**

---

(31) PCT/CN2020/121786

(72) Изобретатель:

(32) 2020.10.19

**Чэнь Нин, Лю Хуаньхуань, Тун Чао,  
Ван Цзяин (CN)**

(33) CN

(86) PCT/CN2021/124794

(74) Представитель:

(87) WO 2022/083600 2022.04.28

**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)**

(71) Заявитель:

**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ВЕТМЕДИКА (ЧАЙНА) КО., ЛТД.  
(CN)**

---

(57) Изобретение касается области ветеринарии. В частности, настоящее изобретение касается рекомбинантного белка E2 вируса классической чумы свиней, который включает по меньшей мере одну мутацию в эпитопе, специфически распознаваемом моноклональным антителом 6B8. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, включающую рекомбинантный белок E2 в соответствии с настоящим изобретением, и применение иммуногенной композиции для профилактики и/или лечения заболеваний, связанных с вирусом КЧС, у животных. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ и комплект для отлучения животных, инфицированных вирусом КЧС от животных, вакцинированных иммуногенной композицией согласно настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ продуцирования белка E2.

**A1**

**202391151**

**202391151**

**A1**

## РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК E2 ВИРУСА КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

### Область изобретения

5 Настоящее изобретение касается области ветеринарии. В частности, настоящее изобретение касается рекомбинантного белка E2 вируса классической чумы свиней, который включает по меньшей мере одну мутацию в эпитопе, специфически распознаваемом моноклональным антителом 6B8. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, включающую

10 рекомбинантный белок E2 в соответствии с настоящим изобретением, и применение иммуногенной композиции для профилактики и/или лечения заболеваний, связанных с вирусом КЧС, у животных. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ и комплект для отличия животных, инфицированных вирусом КЧС от животных, вакцинированных иммуногенной

15 композицией согласно настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ продуцирования белка E2.

### Уровень техники

Классическая чума свиней (КЧС) является высокозаразным заболеванием домашних и диких свиней, вызывающим значительные экономические убытки.

20 Возбудителем заболевания является вирус классической чумы свиней (вирус КЧС). В Китае для борьбы со вспышками КЧС осуществляют комбинированную стратегию профилактической вакцинации и полного санитарного уоя. Однако спорадические вспышки КЧС и стойкие инфекции по-прежнему отмечаются в большинстве регионов Китая.

25 В данной области сохраняется потребность в новой вакцине против вируса КЧС, которая была бы безопасной, эффективной и обеспечивала бы возможность различения животных, вакцинированных ею, от животных, инфицированных полевыми штаммами дикого типа.

### Краткое описание изобретения

30 В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает белок E2 рекомбинантного вируса КЧС (вируса классической чумы свиней), включающий по меньшей мере одну мутацию в пределах эпитопа 6B8 белка E2, причем эпитоп 6B8 (немодифицированный) специфически распознается моноклональным антителом 6B8.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно настоящему изобретению.

5 В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает вектор, включающий нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, включающую рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, или вектор, кодирующий такую нуклеиновую кислоту, все в соответствии с настоящим  
10 изобретением.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных, причем способ включает этап введения иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению животному, которое в этом нуждается.

15 В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ отличия животных, инфицированных вирусом КЧС, от животных, вакцинированных иммуногенной композицией согласно настоящему изобретению, включающий а) получение образца от животного; и б) анализирование вышеупомянутого образца путем иммунотеста.

20 В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает комплект для отличия животных, инфицированных вирусом КЧС, от животных, вакцинированных иммуногенной композицией согласно настоящему изобретению.

### **Краткое описание фигур**

25 **Фигура 1:** структура E2 вируса КЧС и критически важные аминокислоты для эпитопа 6B8.

**Фигура 2:** построение E2 вируса КЧС дикого типа и мутированного E2 вируса КЧС с различными замещениями в эпитопе 6B8.

30 **Фигура 3:** mAb 6B8 распознает большинство штаммов вируса КЧС, при этом не реагируя с вирусами ВД КРС.

**Фигура 4:** выравнивание последовательности изолятов вируса КЧС, штаммов ВД КРС и некоторых других пестивирусов.

Фигура 5: результаты ИФА, показывающие, что аминокислотные остатки в позиции 14, 22 или 24/25 являются критически важными для связывания mAb 6B8 (Фигуры 5А - 5В).

5 Фигура 6: А) - результаты очистки wt-E2 и E2-KARD или E2-KRD, подтверждаемые SDS PAGE и вестерн-блоттингом (Фигура 6А); и Б) – очищенные E2-KARD или E2-KRD продемонстрировали отрицательные результаты с окрашиванием 6B8 (Фигура 6Б).

Фигура 7: результаты очистки QZ07-E2-Fc-WT, подтверждаемые SDS PAGE и вестерн-блоттингом.

10 Фигура 8: температура тела после антигенной стимуляции в исследовании эффективности.

Фигура 9: подсчет лейкоцитов после антигенной стимуляции в исследовании эффективности.

15 Фигура 10: смертность после антигенной стимуляции в исследовании эффективности.

Фигура 11: клинические показатели после антигенной стимуляции в исследовании эффективности.

Фигура 12: серологическая реакция во время исследования эффективности.

Фигура 13: высокий выход белка E2, экспрессируемого в системе СНО.

20 Фигура 14: иммуногенность белка E2, экспрессируемого в системе СНО.

Фигура 15: Идентификация дополнительных критически важных остатков для связывания 6B8 в E2. Выполняемое при помощи ИФА обнаружение мутантных форм белка E2 в системе экспрессии клеток СНО демонстрирует, что аминокислотные остатки в позиции 10, 41 или 64 являются критически важными для связывания mAb 6B8.

25

Фигура 16: выполняемое путем вестерн-блоттинга обнаружение мутантных форм белка E2 в системе экспрессии клеток СНО.

Фигура 17: идентификация дополнительных аминокислот в позиции 22 для ингибирования связывания 6B8 E2.

30 Фигура 18: идентификация дополнительных аминокислот в позиции 24 для ингибирования связывания 6B8 E2.

Фигура 19: идентификация дополнительных аминокислот в позиции 25 для ингибирования связывания 6B8 E2.



Фигура 20: идентификация дополнительных аминокислот в позиции 64 для ингибирования связывания 6В8 Е2.

### **Подробное описание изобретения**

5 Перед описанием аспектов настоящего изобретения следует заметить, что применяемые в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа также предполагают и множественное число, если контекст прямо не диктует иное. Таким образом, ссылка на "эпитоп" включает и множество эпитопов, ссылка на "вирус" является ссылкой на один или несколько вирусов и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и т. д.

10 Термин "и/или" охватывает любые комбинации предметов, связанных этим термином, эквивалентные списку всех комбинаций по отдельности. Например, "А, В и/или С" охватывает "А", "В", "С", "А и В", "А и С", "В и С" и "А и В и С". Если не определено иное, все технические и научные термины, применяемые авторами, имеют одинаковые значения в общепринятом понимании среди специалистов в

15 области, к которой относится данное изобретение. Хотя в практическом воплощении или испытании настоящего изобретения существует возможность применения любых способов и материалов, подобных или эквивалентных тем, которые описаны авторами, ниже описаны предпочтительные способы, устройства и материалы. Все упомянутые авторами публикации включены путем

20 ссылки с целью описания и раскрытия указанных в публикациях штаммов вируса, линий клеток, векторов и методологий, применение которых возможно в связи с изобретением. Ни одно из положений данного документа не следует истолковывать как признание того, что изобретение не дает права на датирование такого раскрытия более ранним числом в силу более раннего изобретения.

25 В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает белок Е2 рекомбинантного вируса КЧС (вируса классической чумы свиней), включающий по меньшей мере одну мутацию в пределах эпитопа 6В8 белка Е2, причем эпитоп 6В8 (немодифицированный) специфически распознается моноклональным антителом 6В8.

30 Термин "вирус КЧС" в контексте данного описания относится ко всем вирусам, относящимся к видам вируса классической чумы свиней (вируса КЧС) рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*.

Термин "рекомбинантный" относится к белку или нуклеиновой кислоте, которые были изменены, реаранжированы или модифицированы путем генной

инженерии. Однако термин не касается изменений в полинуклеотиде, аминокислотной последовательности, нуклеотидной последовательности, образуемых в результате естественных явлений, таких как спонтанные мутации.

5 В одном аспекте рекомбинантный белок E2 вируса КЧС является выделенным.

Молекулу полипептида или нуклеиновой кислоты считают "выделенной", например, по сравнению с естественным биологическим источником и/или реакционной средой или культуральной средой, из которой она была получена, если она была отделена от по меньшей мере одного другого компонента, с 10 которым она обычно связана в вышеупомянутом источнике или среде, например, другого белка / полипептида, другой нуклеиновой кислоты, другого биологического компонента или макромолекулы или по меньшей мере одного загрязнителя, примеси или второстепенного компонента. В частности, молекула полипептида или нуклеиновой кислоты считается "выделенной", если она была 15 очищена по меньшей мере в 2 раза, в частности, по меньшей мере в 10 раз, в частности, по меньшей мере в 100 раз и до 1000 раз или более. Молекула полипептида или нуклеиновой кислоты, находящаяся "в выделенной форме", предпочтительно является по сути гомогенной, как определяют с применением соответствующей технологии, такой как соответствующая хроматографическая 20 технология, например электрофорез в полиакриламидном геле.

“Эпитоп 6B8 белка E2” в контексте данного описания также касается эпитопа белка E2, специфически распознаваемого моноклональным антителом 6B8, как описывается авторами. В возможном варианте эпитоп 6B8 является конформационным эпитопом. Эпитоп 6B8 включает определенные аминокислоты 25 в позициях 24, 25, 14, 22, 10, 41 и/или 64 белка E2. Например, эпитоп 6B8 включает S в позиции 14, G в позиции 22, E или G в позиции 24, G в позиции 25, Y в позиции 10, D в позиции 41, и/или R в позиции 64 белка E2.

Термин “моноклональное антитело 6B8” касается моноклонального антитела 6B8 или его антигенсвязывающего фрагмента, причем моноклональное антитело 30 6B8 специфически распознает эпитоп 6B8, в частности, эпитоп 6B8, который включает по меньшей мере аминокислоту S в позиции 14, G в позиции 22, E или G в позиции 24, G в позиции 25, Y в позиции 10, D в позиции 41 и/или R в позиции 64 белка E2. Предпочтительно термин “моноклональное антитело 6B8” касается моноклонального антитела, которое включает CDR моноклонального антитела,

5 продуцируемого гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120. Предпочтительно термин “моноклональное антитело 6B8” касается моноклонального антитела, которое включает VH CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1, VH CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 2, VH CDR3, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3, VL CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4, VL CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5, и VL CDR3, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6. Более предпочтительно термин “моноклональное антитело 6B8” касается моноклонального антитела, которое включает переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8. Более предпочтительно термин “моноклональное антитело 6B8” касается моноклонального антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120.

20 В контексте данного описания “антитело” касается иммуноглобулинов и фрагментов иммуноглобулинов, естественных или частично или полностью синтетически, например, рекомбинантно, продуцируемых, включая любой их фрагмент, содержащий по меньшей мере часть переменной области молекулы иммуноглобулина, сохраняющей способность специфического связывания иммуноглобулина полной длины. Таким образом, антитело включает любой белок, имеющий связывающий домен, который гомологичен или, по сути, гомологичен антигенсвязывающий домен иммуноглобулина (антитело-комбинирующий участок). Антитела включают фрагменты антител. В контексте данного описания термин “антитело”, таким образом, включает синтетические антитела, рекомбинантно продуцируемые антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), человеческие антитела, антитела отличного от человека вида, гуманизированные антитела, химерные антитела, внутриклеточные антитела и фрагменты антител. Обеспечиваемые согласно изобретению антитела представляют любой тип иммуноглобулина (например, IgG,

IgM, IgD, IgE, IgA и IgY), любой класс (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласс (например, IgG2a и IgG2b).

Термин "вариабельная область" в контексте данного описания означает домен иммуноглобулина, по сути состоящий из четырех "каркасных участков", называемых специалистами а данной области и авторами в этом описании "каркасным участком 1" или "FR1"; "каркасным участком 2" или "FR2"; "каркасным участком 3" или "FR3"; и "каркасным участком 4" или "FR4", соответственно; эти каркасные участки прерываются тремя "гипервариабельными участками" или "CDR", называемыми специалистами а данной области и авторами в этом описании "гипервариабельным участком 1" или "CDR1"; "гипервариабельным участком 2" или "CDR2"; и "гипервариабельным участком 3" или "CDR3", соответственно. Таким образом, общую структуру или последовательность вариабельной области иммуноглобулина указывают следующим образом: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. V<sub>H</sub> или V<sub>H</sub> означает вариабельную область тяжелой цепи, и V<sub>L</sub> или V<sub>L</sub> означает вариабельную область легкой цепи. Подобным образом V<sub>H</sub> CDR1, V<sub>H</sub> CDR2 и V<sub>H</sub> CDR3 означают CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, соответственно. V<sub>L</sub> CDR1, V<sub>L</sub> CDR2 и V<sub>L</sub> CDR3 означают CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, соответственно.

В контексте данного описания "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела означает любую часть антитела полной длины, которая составляет менее полной длины, но содержит по меньшей мере часть вариабельной области антитела, которая связывает антиген (например, один или несколько CDR и/или один или несколько антитело-комбинирующих участков) и, таким образом, сохраняет специфичность связывания и по меньшей мере часть способности к специфическому связыванию, которой обладает антитело полной длины. Таким образом, антигенсвязывающий фрагмент означает фрагмент антитела, который содержит антигенсвязывающую часть, которая связывается с тем же антигеном, что и антитело, из которого происходит этот фрагмент антитела. Фрагменты антител включают производные антител, продуцируемые путем ферментной обработки антител полной длины, а также синтетически, например, рекомбинантно продуцируемые производные. Фрагмент антитела включен среди антител. Примерами фрагментов антител являются, помимо прочих, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, одноцепочечный Fv (scFv), Fv, dsFv, диатело,

фрагменты Fd и Fd' и другие фрагменты, включая модифицированные фрагменты (см., например, *Methods in Molecular Biology, Vol. 207: Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols* (2003); Chapter 1; p 3 - 25, Kipriyanov). В возможном варианте фрагмент включает связанные между собой множественные цепи, такие как дисульфидные мостики и/или пептидные линкеры. Антигенсвязывающий фрагмент включает любой фрагмент антитела, который, будучи вставленным в каркас антитела (например, путем замены соответствующего участка), в результате дает антитело, которое иммуноспецифически связывается (т. е., демонстрирует  $K_a$  по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно  $10^7$ -  $10^8$   $M^{-1}$ ) с антигеном.

Термин “антигенсвязывающий фрагмент моноклонального антитела 6B8” означает фрагмент моноклонального антитела 6B8 или по меньшей мере кодирует аминокислотную последовательность, которая специфически распознает эпитоп 6B8, в частности, эпитоп 6B8, который включает по меньшей мере аминокислоту S в позиции 14, G в позиции 22, E или G в позиции 24, G в позиции 25, Y в позиции 10, D в позиции 41 и/или R в позиции 64 белка E2. Термин также охватывает аминокислотный фрагмент, кодирующий VH CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1, VH CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 2, VH CDR3, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3, и/или VL CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4, VL CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5, и VL CDR3, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6. Кроме того, термин также охватывает аминокислотный фрагмент, который включает переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7, и/или переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8. Более предпочтительно термин охватывает аминокислотный фрагмент, кодируемый моноклональным антителом, продуцируемым гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120, причем аминокислотный фрагмент специфически связывается с эпитопом 6B8.

Термин “мутация” включает замещение, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот. Термин “мутация” является общеизвестным среди

специалистов в данной области, и специалист в данной области сможет генерировать мутации без излишних усилий.

В одном аспекте по меньшей мере одна мутация в пределах эпитопа 6B8 белка E2 согласно изобретению приводит к специфическому ингибированию связывания моноклонального антитела 6B8 с таким мутированным эпитопом 6B8.

Термин "специфически ингибирует" или "специфическое ингибирование" означает, что антитело 6B8 связывается с по меньшей мере в 2 раза, предпочтительно в 5 раз, более предпочтительно – в 10 раз и еще более предпочтительно – в 50 раз меньшей аффинностью к мутированному эпитопу 6B8 по сравнению с немодифицированным эпитопом 6B8, в частности, с немодифицированным эпитопом 6B8, имеющим аминокислоту S в позиции 14, G в позиции 22, E или G в позиции 24, G в позиции 25, Y в позиции 10, D в позиции 41, R в позиции 64 белка E2 или их комбинациями. "Аффинность" означает взаимодействие между отдельным антигенсвязывающим центром на молекуле антитела и отдельным эпитопом. Ее выражают по константе ассоциации  $KA = k_{ass}/k_{diss}$  или константе диссоциации  $KD = k_{diss}/k_{ass}$ . Более предпочтительно термин "специфически ингибирует" или "специфическое ингибирование" означает, что моноклональное антитело 6B8, в частности, моноклональное антитело, продуцируемое гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120, не демонстрирует обнаружимого связывания с мутированным эпитопом 6B8 согласно изобретению в специфическом анализе иммунофлуоресценции, предпочтительно в специфическом анализе иммунофлуоресценции, описанном в примере 5, или в специфическом дот-блот-анализе, предпочтительно в специфическом дот-блот-анализе, описанном в примере 6. И специфический анализ иммунофлуоресценции, и специфический дот-блот-анализ применимы для определения специфического ингибирования, однако в случае противоречий между двумя анализами преимущественную силу имеет результат дот-блот-анализа.

Термин "замещение" означает, что аминокислоту заменяют на другую аминокислоту в той же позиции. Таким образом, термин "замещение" охватывает удаление / делецию аминокислоты с последующей вставкой другой аминокислоты в той же позиции.

Термин "белок E2" означает обработанный белок E2, получаемый как конечный продукт расщепления из полипротеина

(Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B) вируса КЧС.

Специалист в данной области подтвердит возможность применения любого белка E2 вируса КЧС в соответствии с изобретением. В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 происходит от белка E2 дикого типа, имеющего эпитоп 6B8, специфически распознаваемый моноклональным антителом 6B8. Например, в возможном варианте белок E2 происходит от известного штамма вируса КЧС, такого как С-штамм, или от новых изолятов, таких как QZ07 или GD18, как определено в данном описании. Например, белок E2 полевого штамма QZ07 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 9, белок E2 полевого штамма GD18 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10, белок E2 полевого штамма GD191 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 34, и белок E2 С-штамма имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 21.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % идентичности последовательности с одной из SEQ ID NO: 9, 10, 34 и 21, но содержит по меньшей мере одну мутацию в пределах эпитопа 6B8, как раскрывается в данном описании.

"Идентичность последовательностей" между двумя полипептидными последовательностями означает процент аминокислот, которые являются идентичными между этими последовательностями. Способы оценки уровня идентичности последовательностей между аминокислотными или нуклеотидными последовательностями известны специалистам в данной области. Например, программы для анализа последовательностей часто применяют для определения идентичности аминокислотных последовательностей. Например, идентичность определяют с применением программы BLAST в базе данных NCBI. Определение идентичности последовательностей описано, например, в публикациях Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in

Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987 и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991.

В предпочтительном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2, имеющий по меньшей мере одну мутацию в пределах эпитопа 6B8, как раскрывается в данном описании, является иммуногенным и предпочтительно обеспечивает защитный иммунитет против вируса КЧС. Белок E2 содержит четыре антигенных домена, A, B, C и D, и все эти домены расположены на N-конце белка E2. Четыре домена составляют две независимых антигенных единицы, одна из которых является единицей из доменов B/C, а другая включает домены A/D. Домен B/C охватывает от аминокислотной позиции 1 до позиций 84/111, а домен D/A расположен от аминокислотной позиции 77 до позиций 111/177. Кроме того, домен B/C связан предполагаемой дисульфидной связью между аминокислотами 4C и 48C, тогда как единица D/A образуется с двумя дисульфидными связями: одна между аминокислотами 103C и 167C, а другая между аминокислотами 129C и 139C. Эти цистеиновые остатки являются ключевыми для конформационной антигенной структуры белка E2. Антигенный мотив (82-85LLFD имеет важное значение для антигенной структуры белка E2 для связывания с сывороткой фазы выздоровления. Другой мотив (RYLASLHKKALPT, аминокислотные позиции с 64 по 76) также определен как важный для структурной целостности распознавания конформационного эпитопа белка E2. Кроме того, имеются сведения, что белок E2, содержащий лишь один из вышеупомянутых антигенных доменов, остается иммуногенным и способен защищать свиней от антигенной стимуляции инфекционным вирусом КЧС. Таким образом, в предпочтительном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2, имеющий по меньшей мере одну модификацию в пределах эпитопа 6B8, как описывается авторами, сохраняет по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере один из антигенных доменов, как описано выше. Предпочтительно рекомбинантный белок E2 согласно изобретению способен обеспечивать защитный иммунитет против вируса КЧС. В одном аспекте существует возможность введения по меньшей мере одной мутации в пределах эпитопа 6B8, как определено в данном описании, без существенного влияния на защитную иммуногенность рекомбинантного белка E2 против вируса КЧС.

В одном аспекте изобретения эпитоп 6B8 белка E2, который специфически распознается моноклональным антителом 6B8, определяется по меньшей мере



аминокислотным остатком в позиции 14, позиции 22, позиции 24, позициях 24 и 25 (“24/25”), позиции 10, позиции 41 и/или позиции 64 белка E2.

В одном аспекте изобретения эпитоп 6B8 белка E2, который специфически распознается моноклональным антителом 6B8, определяется по меньшей мере аминокислотным остатком S14, G22, E24, E24/G25, Y10, D41 и/или R64 белка E2, например, для изолятов QZ07, GD18 или GD191. В одном аспекте изобретения эпитоп 6B8 белка E2, который специфически распознается моноклональным антителом 6B8, определяется по меньшей мере аминокислотным остатком S14, G22, G24, G24/G25, Y10, D41 и/или R64 белка E2, например, для С-штамма.

Нумерация аминокислотного остатка касается аминокислотной позиции в обработанном белке E2 от N-конца, например, до аминокислотной позиции, представленной для примера в SEQ ID NO: 9 или 10. Однако аминокислотную позицию также определяют по отношению к полипротеину (содержащему Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B), например, к аминокислотной позиции, представленной для примера в SEQ ID NO: 11 или 12. Например, аминокислотные остатки в позиции 14, позиции 22, позиции 24, позиции 25, позиции 10, позиции 41 и позиции 64 белка E2 соответствуют аминокислотным остаткам в позиции 703, позиции 711, позиции 713, позиции 714, позиции 699, позиции 730, и позиции 753 полипротеина.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 24 белка E2, замещение в аминокислотных позициях 24/25 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 22 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещение в аминокислотной позиции 64 белка E2, причем предпочтение отдают замещению в аминокислотной позиции 64.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или а замещение в аминокислотной позиции 64 белка E2, причем предпочтение отдают замещению в аминокислотной позиции 64.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 24 белка

Е2 и замещение в аминокислотной позиции 25 белка Е2, и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения в аминокислотной позиции 10 белка Е2, замещения в аминокислотной позиции 41 белка Е2 и/или а замещения в аминокислотной позиции 64 белка Е2, причем  
5 предпочтение отдают замещению в аминокислотной позиции 64.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок Е2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 24 белка Е2 и замещение в аминокислотной позиции 14 белка Е2 и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения в  
10 аминокислотной позиции 10 белка Е2, замещения в аминокислотной позиции 41 белка Е2 и/или замещения в аминокислотной позиции 64 белка Е2, причем предпочтение отдают замещению в аминокислотной позиции 64.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок Е2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 24 белка  
15 Е2, замещение в аминокислотной позиции 25 белка Е2 и замещение в аминокислотной позиции 14 белка Е2 и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения в аминокислотной позиции 10 белка Е2, замещения в аминокислотной позиции 41 белка Е2 и/или замещения в аминокислотной позиции 64 белка Е2, причем предпочтение отдают замещению в  
20 аминокислотной позиции 64.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок Е2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 24 белка Е2 и замещение в аминокислотной позиции 22 белка Е2, по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения в  
25 аминокислотной позиции 10 белка Е2, замещения в аминокислотной позиции 41 белка Е2 и/или замещения в аминокислотной позиции 64 белка Е2, причем предпочтение отдают замещению в аминокислотной позиции 64.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок Е2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 24 белка  
30 Е2, замещение в аминокислотной позиции 25 белка Е2 и замещение в аминокислотной позиции 22 белка Е2 и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения в аминокислотной позиции 10 белка Е2, замещения в аминокислотной позиции 41 белка Е2 и/или замещения в

аминокислотной позиции 64 белка E2, причем предпочтение отдают замещению в аминокислотной позиции 64.

5 В одном аспекте изобретения рекомбинантный вирус КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 14 белка E2 и замещение в аминокислотной позиции 22 белка E2 и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещения в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещения в аминокислотной позиции 64 белка E2, причем предпочтение отдают замещению в аминокислотной позиции 64.

10 В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 24 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 14 белка E2 и замещение в аминокислотной позиции 22 белка E2 и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения в аминокислотной позиции 10  
15 белка E2, замещения в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещения в аминокислотной позиции 64 белка E2, причем предпочтение отдают замещению в аминокислотной позиции 64.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 24 белка  
20 E2, замещение в аминокислотной позиции 25 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 14 белка E2 и замещение в аминокислотной позиции 22 белка E2 и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещения в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещение в аминокислотной  
25 позиции 64 белка E2, причем предпочтение отдают замещению в аминокислотной позиции 64.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 24 белка  
30 E2, замещение в аминокислотной позиции 25 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 22 белка E2 и замещение в аминокислотной позиции 64 белка E2.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещения в аминокислотных позициях белка E2, как определено ниже в таблицах с 1 до 7. Например, вторая линия в Таблице 1

означает, что рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещение в аминокислотной позиции 10 (“позиция 10”) белка E2, а третья линия в Таблице 1 означает, что рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно изобретению включает замещения в аминокислотных позициях 10 и 14

5 белка E2 и т. д.

Таблица 1:

позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 24	позиция 25	позиции 24/25	позиция 41	позиция 64
X							
X	X						
X		X					
X			X				
X				X	X		
X						X	
X							X
X	X	X					
X	X		X				
X	X			X	X		
X	X					X	
X	X						X
X		X	X				
X		X		X	X		
X		X				X	
X		X					X
X			X	X	X		
X			X			X	
X			X				X
X				X	X	X	
X				X	X		X
X						X	
X	X	X	X		X		
X	X	X		X	X		
X	X	X				X	
X	X	X					X
X	X		X	X	X	X	
X		X	X	X	X		
X		X	X				X
X			X	X	X	X	
X	X	X	X	X	X		
X	X	X	X			X	
X	X	X	X				X

позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 24	позиция 25	позиции 24/25	позиция 41	позиция 64
x		x	x	x	x	x	
x		x	x	x	x		
x	x	x	x	x	x	x	
x	x	x	x	x	x		x
x	x	x	x	x	x	x	x

Таблица 2:

позиция 41	позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 24	позиция 25	позиции 24/25	позиция 64
x							
x	x						
x		x					
x			x				
x				x			
x					x	x	
x							x
x	x	x					
x	x		x				
x	x			x			
x	x				x	x	
x	x						x
x		x	x				
x		x		x			
x		x			x	x	
x		x					x
x				x	x	x	
x				x			x
x					x	x	x
x	x	x	x				
x	x	x		x			
x	x	x			x	x	
x	x						x
x	x				x	x	
x	x				x	x	x
x		x	x	x			
x		x	x		x	x	
x		x	x				x
x			x	x	x	x	
x			x	x			x
x				x	x	x	x
x	x	x	x	x			
x	x	x	x		x	x	

позиция 41	позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 24	позиция 25	позиции 24/25	позиция 64
x	x	x	x				x
x		x	x	x	x	x	
x		x	x	x			x
x	x	x	x	x	x	x	
x	x	x	x	x			x
x	x	x	x	x	x	x	x

Таблица 3:

позиция 64	позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 24	позиция 25	позиции 24/25	позиция 41
x							
x	x						
x		x					
x			x				
x				x			
x					x	x	
x							x
x	x	x					
x	x		x				
x	x			x			
x	x				x	x	
x	x						x
x		x	x				
x		x		x			
x		x			x	x	
x		x					x
x				x	x	x	
x				x			x
x					x	x	x
x	x	x	x				
x	x	x		x			
x	x	x			x	x	
x	x			x			x
x	x				x	x	x
x		x	x	x			
x		x	x		x	x	
x		x	x				x
x			x	x	x	x	
x			x	x			x

позиция 64	позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 24	позиция 25	позиции 24/25	позиция 41
X				X	X	X	X
X	X	X	X	X			
X	X	X	X		X	X	
X	X	X	X				X
X		X	X	X	X	X	
X		X	X	X			X
X	X	X	X	X	X	X	
X	X	X	X	X			X
X	X	X	X	X	X	X	X

Таблица 4:

позиция 14	позиция 10	позиция 22	позиция 24	позиция 25	позиции 24/25	позиция 41	позиция 64
X							
X	X						
X		X					
X			X				
X				X	X		
X						X	
X							X
X	X	X					
X	X		X				
X	X			X	X		
X	X					X	
X	X						X
X		X	X				
X		X		X	X		
X		X				X	
X		X					X
X			X	X	X		
X			X			X	
X			X				X
X	X	X	X				
X	X	X		X	X		
X	X	X				X	
X	X	X					X
X	X		X	X	X		
X	X		X			X	
X	X		X				X
X	X			X	X	X	
X	X			X	X		X
X	X					X	X
X		X	X	X	X		
X		X	X			X	
X		X	X				X
X			X	X	X	X	

позиция 14	позиция 10	позиция 22	позиция 24	позиция 25	позиции 24/25	позиция 41	позиция 64
X			X	X	X		X
X				X	X	X	X
X	X	X	X	X	X		
X	X	X	X			X	
X	X	X	X				X
X		X	X	X	X	X	
X		X	X	X	X		X
X	X	X	X	X	X	X	
X	X	X	X	X	X		X
X	X	X	X	X	X	X	X

Таблица 5:

позиция 22	позиция 10	позиция 14	позиция 24	позиция 25	позиции 24/25	позиция 41	позиция 64
X							
X	X						
X		X					
X			X				
X				X	X		
X						X	
X							X
X	X	X					
X	X		X				
X	X			X	X		
X	X					X	
X	X						X
X		X	X				
X		X		X	X		
X		X				X	
X		X					X
X			X	X	X		
X			X			X	
X			X				X
X	X	X	X				
X	X	X		X	X		
X	X	X				X	
X	X	X					X
X	X		X	X	X		
X	X		X			X	
X	X		X				X
X	X			X	X	X	
X	X			X	X		X
X	X					X	X
X		X	X	X	X		
X		X	X			X	
X		X	X				X



позиция 22	позиция 10	позиция 14	позиция 24	позиция 25	позиции 24/25	позиция 41	позиция 64
X			X	X	X	X	
X			X	X	X		X
X				X	X	X	X
X	X	X	X	X	X		
X	X	X	X			X	
X	X	X	X				X
X		X	X	X	X	X	
X		X	X	X	X		X
X	X	X	X	X	X	X	
X	X	X	X	X	X		X
X	X	X	X	X	X	X	X

Таблица 6:

позиция 24	позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 25	позиции 24/25	позиция 41	позиция 64
X							
X	X						
X		X					
X			X				
X				X	X		
X						X	
X							X
X	X	X					
X	X		X				
X	X			X	X		
X	X					X	
X	X						X
X		X	X				
X		X		X	X		
X		X				X	
X		X					X
X			X	X	X		
X			X			X	
X			X				X
X				X	X	X	
X				X	X		X
X	X	X	X				
X	X	X		X	X		
X	X	X				X	
X	X	X					X
X	X		X	X	X		
X	X		X			X	
X	X		X				X
X	X			X	X	X	
X	X			X	X		X
X	X					X	X
X		X	X	X	X		
X		X	X			X	

позиция 24	позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 25	позиции 24/25	позиция 41	позиция 64
X		X	X				X
X			X	X	X	X	
X			X	X	X		X
X				X	X	X	X
X	X	X	X	X	X		
X	X	X	X			X	
X	X	X	X				X
X		X	X	X	X	X	
X		X	X	X	X		X
X	X	X	X	X	X	X	
X	X	X	X	X	X		X
X	X	X	X	X	X	X	X

Таблица 7А:

позиция 25	позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 24	позиция 41	позиция 64	
X							
X	X						
X		X					
X			X				
X				X			
X					X		
X						X	
X	X	X					
X	X		X				
X	X			X			
X	X				X		
X	X					X	
X		X	X				
X		X		X			
X		X			X		
X		X				X	
X			X	X			
X			X		X		
X			X			X	
X			X			X	
X	X	X	X				
X	X	X			X		
X	X	X				X	
X	X		X	X			
X	X		X		X		
X	X		X			X	
X	X		X		X	X	
X		X	X	X			

позиция 25	позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 24	позиция 41	позиция 64	
X		X	X		X		
X		X	X			X	
X			X	X	X		
X			X	X		X	
X				X	X	X	
X	X	X	X	X			
X	X	X	X		X		
X	X	X	X			X	
X		X	X	X	X		
X		X	X	X		X	
X	X	X	X	X	X		
X	X	X	X	X		X	
X	X	X	X	X	X	X	

Таблица 7В:

позиции 24/25	позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 24	позиция 41	позиция 64	
X							
X	X						
X		X					
X			X				
X				X			
X					X		
X						X	
X	X	X					
X	X		X				
X	X			X			
X	X				X		
X	X					X	
X		X	X				
X		X		X			
X		X			X		
X		X				X	
X			X	X			
X			X		X		
X			X			X	
X	X	X	X				
X	X	X		X			
X	X	X			X		
X	X	X				X	
X	X		X	X			
X	X		X		X		
X	X		X			X	
X	X			X	X		
X	X			X		X	
X	X				X	X	

позиции 24/25	позиция 10	позиция 14	позиция 22	позиция 24	позиция 41	позиция 64	
x		x	x	x			
x		x	x		x		
x		x	x			x	
x			x	x	x		
x			x	x		x	
x				x	x	x	
x	x	x	x	x			
x	x	x	x		x		
x	x	x	x			x	
x		x	x	x	x		
x		x	x	x		x	
x	x	x	x	x	x		
x	x	x	x	x		x	
x	x	x	x	x	x	x	

В одном аспекте изобретения в рекомбинантном белке E2 вируса КЧС согласно изобретению аминокислота в позиции 10 белка E2 замещена А или Р, аминокислота в позиции 14 белка E2 замещена К, Q или R, аминокислота в позиции 22 белка E2 замещена А, R, Q, E, D, N, К, L, Р, Т, V или S, причем предпочтение отдают А, Q, D, E, N и S, аминокислота в позиции 24 белка E2 замещена R, D или I, причем предпочтение отдают R, аминокислота в позиции 25 белка E2 замещена D, К, L, N, R, Т, V, E или Р, причем предпочтение отдают D, E, К, L, N, R, Т и V, аминокислота в позиции 41 белка E2 замещена А, N или E, и/или аминокислота в позиции 64 белка E2 замещена А, S, E, D, G, H, Т, L, Р, К или W, причем предпочтение отдают А, К и W.

В одном аспекте изобретения подразумевается, что аминокислотные замещения, как описано в таблицах с 1 по 7, являются специфическими замещениями, как описано в предыдущем абзаце. Например, аминокислота в позиции 10 белка E2, как описано в таблицах с 1 по 7, в возможном варианте замещена А или Р, аминокислота в позиции 14 белка E2, как описано в таблицах с 1 по 7, в возможном варианте замещена К, Q или R, аминокислота в позиции 22 белка E2, как описано в таблицах с 1 по 7, в возможном варианте замещена А, R, Q, E, D, N, К, L, Р, Т, V или S, причем предпочтение отдают А, Q, D, E, N и S, аминокислота в позиции 24 белка E2, как описано в таблицах с 1 по 7, в возможном варианте замещена R, D или I, причем предпочтение отдают R, аминокислота в позиции 25 белка E2, как описано в таблицах с 1 по 7, в возможном варианте замещена D, К, L, N, R, Т, V, E или Р, причем предпочтение отдают D, К, L, N, R,

Т и V, аминокислота в позиции 41 белка E2, как описано в таблицах с 1 по 7, в возможном варианте замещена A, N или E, и/или аминокислота в позиции 64 белка E2, как описано в таблицах с 1 по 7, в возможном варианте замещена A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W. Специалистам в данной области известна возможность выполнения всех возможных пермутаций в таблицах с 1 по 7 и комбинирования, например, мутации 10A с мутацией 14K, 14Q или 14R, или комбинирования мутации 10P с мутацией 14K, 14Q или 14R, и т.д.

В одном аспекте изобретения результатом аминокислотного замещения в пределах эпитопа 6B8 белка E2 согласно изобретению является образование мутированного эпитопа 6B8, включающего аминокислоту A или P в позиции 10 белка E2, аминокислоту K, Q или R в позиции 14 белка E2, аминокислоту A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S в позиции 22 белка E2, аминокислоту R, D или I в позиции 24 белка E2, аминокислоту D, K, L, N, R, T, V, E или P в позиции 25 белка E2, аминокислоту A, N или E в позиции 41 белка E2 и/или аминокислоту A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W в позиции 64 белка E2, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22, R является предпочтительным в аминокислотной позиции 24, D, K, L, N, R, T и V являются предпочтительными в аминокислотной позиции 25, A, K и W являются предпочтительными в аминокислотной позиции 64 белка E2.

Специалист в данной области подтвердит возможность получения рекомбинантного белка E2 вируса КЧС согласно изобретению из различных изолятов вируса КЧС, поскольку эпитоп 6B8 является эволюционно консервативным среди разных штаммов вируса КЧС.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно изобретению получают из изолята геногруппы 2.1. В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС получают, например, из полевого штамма GD18 или QZ07. Полевой штамм QZ07 имеет полноразмерную нуклеотидную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 13, или включает или экспрессирует полипротеин с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 11. Полевой штамм GD18 имеет полноразмерную нуклеотидную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 14, или включает или экспрессирует полипротеин с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 12.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно изобретению получают из изолята геногруппы 1. В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС получают из С-штамма, хорошо известного специалистам в данной области.

5 В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит, например, из полевого штамма QZ07 и включает замещение Y на A или P в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции  
10 22 белка E2, замещение E на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 белка E2, замещение G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25 белка E2, замещение D на A, N или E в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A,  
15 K и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит, например, из полевого штамма QZ07 и включает замещение E на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24, и замещение G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V  
20 в аминокислотной позиции 25 белка E2, необязательно также включает замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2 или замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения Y на A или P в аминокислотной  
25 позиции 10 белка E2, замещение D на A, N или E в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит, например, из полевого штамма QZ07 и включает замещение E на R, D  
30 или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24, замещение G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25 белка E2, замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение G на A, R, Q или E, причем предпочтение отдают A и R в аминокислотной позиции 22 белка E2, и замещение

R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит, например, из полевого штамма GD18, и включает замещение E на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 белка E2, и  
5     необязательно включает замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, замещение Y на A или P в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение D на A,  
10    N или E в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит, например, из полевого штамма GD18 и включает замещение E на R, D  
15    или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 и замещение G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25 белка E2, необязательно включает замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2 или замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в  
20    аминокислотной позиции 22 белка E2, и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения Y на A или P в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещения D на A, N или E в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещения R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит, например, из полевого штамма GD18 и включает замещение E на R, D  
25    или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24, замещение G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25 белка E2, замещение S на K, Q или R в  
30    аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, и замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K, и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит, например, из С-штамма и включает замещение G на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 белка E2, и необязательно включает замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14  
5 белка E2 или замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения Y на A или P в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение D на A, N или E в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещение R на A, S, E, D,  
10 G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит, например, из С-штамма и включает замещение G на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24, и замещение G на  
15 D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25 белка E2, и необязательно включает замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2 или замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, и по меньшей мере еще одно замещение,  
20 выбранное из группы, состоящей из замещения Y на A или P в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение D на A, N или E в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС  
25 происходит, например, из С-штамма и включает замещение G на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24, замещение G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25 белка E2, замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T,  
30 V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, и замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K, и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

В одном аспекте изобретения с целью получения растворимого белка E2 рекомбинантный белок E2 согласно изобретению укорачивают для удаления



трансмембранного домена. Например, удаляют последние приблизительно 40 аминокислот (например, 42 или 43 аминокислоты) С-конца интактного белка E2 согласно изобретению.

В одном аспекте изобретения с целью получения секретированного формата рекомбинантного белка E2 согласно изобретению сигнальный пептид добавляют к N-концевому белку E2. Например, последние приблизительно 20 аминокислот, в частности, последние 16 аминокислот (например, для С-штамма) или 21 - 23 аминокислот (например, для GD18 или QZ07), из белка E1 добавляют к N-концу рекомбинантного белка E2 согласно изобретению. В одном возможном аспекте сигнальный пептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 41 - 43. Специалист в данной области подтвердит возможность применения согласно настоящему изобретению и другого сигнального пептида, обеспечивающего возможность экспрессии секрета.

В одном возможном аспекте изобретения белок E2 укорачивают для удаления трансмембранного домена и сигнальный пептид добавляют к N-концевому белку E2 для получения растворимого и секретируемого белка E2; например, последние 43 аминокислот интактного белка E2 удаляют, а последние 16 аминокислот или 21-23 аминокислоты из белка E1 добавляют к N-концу белка E2.

В одном возможном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 также включает слитую метку для идентификации и/или очистки. Такие метки хорошо известны специалистам в данной области, например, His-метка или FLAG-метка.

В одном аспекте изобретения Fc-фрагмент иммуноглобулина связывают с белком E2. Термин "Fc-фрагмент иммуноглобулина" в контексте данного описания означает белок, который содержит константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3) иммуноглобулина, более конкретно – не содержит переменных областей тяжелой и легкой цепей и константную область 1 легкой цепи (CL1) иммуноглобулина. В возможном варианте он также включает шарнирный участок или часть шарнирного участка иммуноглобулина (т. е., шарнирный участок в константной области тяжелой цепи). Кроме того, Fc-фрагмент иммуноглобулина в возможном варианте содержит часть константной области 1 тяжелой цепи (CH1). Подразумевается, что термин "Fc-фрагмент иммуноглобулина" в контексте данного описания эквивалентен термину "Fc-фрагмент".

Применяемый авторами термин “связанный с”, в частности, касается любого средства связывания, в пределах полипептида, Fc-фрагмента иммуноглобулина с С-концом или N-концом белка E2. Примером средства связывания является прямая связь Fc-фрагмента иммуноглобулина с белком E2 путем ковалентного связывания. В одном аспекте Fc-фрагмент связывают с С-концом белка E2.

В одном аспекте Fc-фрагмент иммуноглобулина связывают с белком E2 через пептидный линкер. Термин “пептидный линкер” в контексте данного описания относится к пептиду, включающему один или несколько аминокислотных остатков. Более конкретно термин “пептидный линкер” в контексте данного описания относится к пептиду, способному соединять два переменных белка и/или домена, например, белка E2 и Fc-фрагмент иммуноглобулина. Упомянутый авторами пептидный линкер предпочтительно представляет собой аминокислотную последовательность, имеющую длину от 3 до 20 аминокислотных остатков. Например, в возможном варианте линкерный компонент является пептидным линкером, имеющим длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислотных остатков. Типичными последовательностями пептидных линкеров являются GGS, GSGGSG, GGGGS, GGGGSGGGGS. В одном аспекте аминокислотной последовательностью пептидного линкера является GGS (SEQ ID NO: 91).

В одном аспекте Fc-фрагмент иммуноглобулина является Fc-фрагмент IgG свиньи. В одном возможном аспекте Fc-фрагмент связан с С-концом белка E2. В одном возможном аспекте Fc-фрагмент связан с С-концом белка E2 через пептидный линкер. В одном аспекте аминокислотная последовательность Fc-фрагмента свиньи показана как SEQ ID NO: 95. Нуклеотидная последовательность, кодирующая Fc-фрагмент, показана как SEQ ID NO: 96.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 вируса КЧС включает одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 - 20, 22 - 33, 35 - 40, 49 - 72 и 74 - 81.

В одном аспекте изобретения рекомбинантный белок E2 согласно изобретению включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % идентичности

последовательности с одной из SEQ ID NO: 15 - 20, 22 - 33, 35 - 40, 49 - 72 и 74 - 81, содержащей по меньшей мере одну мутацию в пределах эпитопа 6B8.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает рекомбинантный вирус КЧС (вирус классической чумы свиней), включающий рекомбинантный белок E2 согласно изобретению. В одном аспекте изобретения рекомбинантный вирус КЧС является аттенуированным.

Специалист в данной области подтвердит возможность получения рекомбинантного вируса КЧС согласно изобретению из различных изолятов вируса КЧС, поскольку эпитоп 6B8 является эволюционно консервативным среди разных штаммов вируса КЧС. В одном аспекте изобретения рекомбинантный вирус КЧС получают из изолята геногруппы 2.1. В одном аспекте изобретения рекомбинантный вирус КЧС получают, например из полевого штамма GD18 или QZ07. В одном аспекте изобретения рекомбинантный вирус КЧС получают из изолята геногруппы 1. В одном аспекте изобретения рекомбинантный вирус КЧС получают из С-штамма, хорошо известного специалистам в данной области.

В одном аспекте настоящее изобретение также обеспечивает иммуногенную композицию, включающую рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно настоящему изобретению и/или рекомбинантный вирус КЧС согласно изобретению.

Термин "иммуногенная композиция" в контексте данного описания относится к композиции, включающей по меньшей мере один антиген, вызывающий иммунологическую реакцию у хозяина, которому вводят иммуногенную композицию. В возможных вариантах иммунологическая реакция является клеточным и/или антителоопосредованным иммунным ответом на иммуногенную композицию согласно изобретению. Хозяина также указывают как "субъекта". Предпочтительно любой из описанных или упомянутых хозяев или субъектов является животным.

Как правило, "иммунологическая реакция" включает, помимо прочих, один или несколько из следующих эффектов: выработку или активацию антител, В-клеток, хелперных Т-клеток, супрессорных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток и/или гамма-дельта Т-клеток, специфически направленных на антиген или антигены, включенные в иммуногенную композицию согласно изобретению.

Предпочтительно хозяин проявляет либо защитную иммунологическую реакцию, либо терапевтический ответ.

“Защитная иммунологическая реакция” проявляется в уменьшении или отсутствии клинических признаков, обычно демонстрируемых инфицированным хозяином, более быстрым восстановлением и/или сокращением времени инфективности или снижением титра патогена в тканях или жидкостях организма или выделениях инфицированного хозяина.

“Антиген” в контексте данного описания относится, помимо прочего, к компонентам, которые вызывают у хозяина иммунологическую реакцию на соответствующую иммуногенную композицию или вакцину, включающую такой антиген или его иммунологически активный компонент.

В случае, когда хозяин демонстрирует защитную иммунологическую реакцию, таким образом, что повышается резистентность к новой инфекции, и/или снижается клиническая тяжесть заболевания, иммуногенную композицию описывают как “вакцину”.

В одном аспекте иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению является вакциной.

Термин “вакцина” в контексте данного описания означает вакцину для ветеринарного применения, включающую антигенные вещества и вводимую с целью вызывания специфического и активного иммунитета против заболевания, возбуждаемого инфекцией вируса КЧС.

Предпочтительно вакцина согласно изобретению является субъединичной вакциной вируса КЧС, включающей рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, предпочтительно, как описывается авторами, обеспечивающий защитный иммунный ответ у животного-хозяина.

В возможном варианте вакцина дополнительно включает другие компоненты, типичные для фармацевтических композиций.

Дополнительными компонентами для усиления иммунного ответа являются составляющие, обычно называемые “адьювантами” или вспомогательными молекулами, добавляемыми к вакцине или генерируемыми организмом после соответствующего индуцирования такими дополнительными компонентами, к которым, помимо прочих, относятся интерфероны, интерлейкины или факторы роста. “Адьюванты” в контексте данного описания включают гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge

Biotech Inc., Cambridge, Массачусетс, США), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, Алабама, США), эмульсию типа вода в масле, эмульсию типа масло в воде, эмульсию типа вода в масле в воде. Эмульсию, в частности, изготавливают на основе легкого жидкого парафинового масла (согласно требованиям Европейской Фармакопеи); изопреноидного масла, такого как сквалан или сквален; масла, образуемого в результате олигомеризации алкенов, в частности, изобутена или децена; сложных эфиров кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, в частности, растительных масел, этилолеата, ди(каприлата/капрата) пропиленгликоля, три(каприлата/капрата) глицерина или диолеата пропиленгликоля; эфиров разветвленных жирных кислот или спиртов, в частности, сложных эфиров изостеариновой кислоты. Для образования эмульсии масло применяют в комбинации с эмульгаторами. Эмульгаторами предпочтительно являются неионные поверхностно-активные вещества, в частности, сложные эфиры сорбита, маннида (например, безводный маннитолеат), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолеиновой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно этоксилированы, и блок-сополимеры полиоксипропилена-полиоксиэтилена, в частности, продукты типа плуроник, особенно L121. См. Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, NY, pp 51 - 94 (1995) и Todd et al., *Vaccine* 15: 564 - 570 (1997). Типичными адьювантами являются эмульсия SPT, описанная на странице 147 публикации "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" под редакцией M. Powell и M. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсия MF59, описанная на странице 183 этой же книги.

Еще одним примером адьюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного. Предпочтительными адьювантными соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, сшитые, в частности, с полиалкениловыми эфирами сахаров или многоатомных спиртов. Эти соединения известны как карбомеры (*Pharmеuropa* Vol. 8, No. 2, June 1996). Специалисты в данной области могут найти соответствующие сведения также в Патенте США № 2,909,462, в котором описаны такие акриловые полимеры, сшитые с полигидроксилированным соединением, имеющим по меньшей мере 3 гидроксильных группы, предпочтительно не более 8, причем атомы водорода по

меньшей мере трех гидроксильных групп заменены на ненасыщенные алифатические радикалы, имеющие по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтение отдают радикалам, содержащим от 2 до 4 атомов углерода, например, винилам, аллилам и другим этиленненасыщенными группами. В возможных вариантах ненасыщенные радикалы сами содержат другие заместители, такие как метил. Продукты, продаваемые под названием Carbopol (BF Goodrich, Огайо, США), являются особенно предпочтительными. Их сшивают с аллилсахарозой или с аллилпентаэритритом. Среди них следует отметить Carbopol 974P, 934P и 971P. Наибольшее предпочтение отдают применению Carbopol 971P. К сополимерам малеинового ангидрида и алкенильного производного относятся сополимеры ЕМА (Monsanto), являющиеся сополимерами малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде ведет к образованию раствора кислоты, который нейтрализуют, предпочтительно до физиологического уровня рН, для получения раствора адьюванта, в который включают иммуногенную, иммунологическую или саму вакцинную композицию.

К подходящим адьювантам, помимо прочих, относится адьювантная система RIBI (Ribi Inc.), блоксополимер (CytRx, Atlanta, Джорджия, США), SAF-M (Chiron, Emeryville, Калифорния, США), монофосфорил-липид А, авридин липид-аминовый адьювант, термолабильный энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или полученный другим путем), холерный энтеротоксин, IMS 1314 или мурамилдипептид, или встречающиеся в природе или рекомбинантные цитокины или их аналоги или стимуляторы высвобождения эндогенного цитокина, помимо многих других.

В одном возможном аспекте иммуногенную композицию рецептируют в эмульсию типа вода в масле с подходящим адьювантом. Адьювант включает масла и поверхностно-активные вещества. В одном аспекте адьювантом является MONTANIDE™ ISA 71R VG (производства Seppic Inc, Cat no: 365187). В одном аспекте адьювантом является Seppic ISA 206. Адьювант добавляют в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу. В еще более предпочтительном варианте адьювант добавляют в количестве от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг на дозу. В еще более предпочтительном варианте адьювант добавляют в количестве приблизительно 500 мкг до приблизительно 5 мг на дозу. В еще более предпочтительном варианте адьювант добавляют в количестве приблизительно 750 мкг до приблизительно 2.5 мг на дозу. В наиболее

предпочтительном варианте адъювант добавляют в количестве приблизительно 1 мг на дозу. В одном варианте осуществления иммуногенная композиция согласно изобретению включает на дозу приблизительно 7 частей масляной фазы, содержащей адъювант, и приблизительно 3 части водной фазы, содержащей белок E2 согласно изобретению.

В одном аспекте настоящего изобретения в качестве маркера используют по меньшей мере одну мутацию в пределах эпитопа 6B8 белка E2, специфически распознаваемого моноклональным антителом 6B8, как определено выше, например, замещение в аминокислотной позиции 24 белка E2, замещение в аминокислотных позициях 24/25 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 22 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или а замещение в аминокислотной позиции 64 белка E2.

Термин “маркер” в контексте данного описания относится к мутантному эпитопу 6B8 согласно настоящему изобретению. Мутантный эпитоп 6B8 согласно настоящему изобретению отличается от последовательности эпитопа 6B8 белка E2 вируса КЧС дикого типа (эпитопа 6B8, который не был генетически модифицирован). Таким образом, мутантный эпитоп 6B8 согласно настоящему изобретению обеспечивает возможность отличия естественно инфицированных животных, имеющих немутированный эпитоп 6B8, от вакцинированных животных, имеющих мутантный эпитоп 6B8 согласно настоящему изобретению, при помощи типовых иммунотестов и/или геномных аналитических тестов.

В одном аспекте изобретения иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению представляет собой маркерную вакцину или DIVA-вакцину (для различения между инфицированными и вакцинированными животными).

Термин “маркерная вакцина” или “DIVA (различение между инфицированными и вакцинированными животными)” означает вакцину, имеющую маркер, как было изложено выше. Таким образом, маркерную вакцину применяют для отличия вакцинированного животного от естественно инфицированного животного. Иммуногенная композиция согласно настоящему изобретению действует как маркерная вакцина, поскольку, в отличие от инфицирования вирусом КЧС дикого типа, у животных, вакцинированных вакциной согласно настоящему изобретению, поддается обнаружению

замещенный эпитоп 6B8 согласно настоящему изобретению. С применением типовых иммунотестов и/или геномных аналитических тестов замещенный эпитоп 6B8 согласно настоящему изобретению отличают от последовательности эпитопа 6B8 вируса КЧС дикого типа (эпитопа 6B8, который не был генетически модифицирован). И наконец, маркерный эпитоп должен быть специфичен к патогену во избежание ложноположительных серологических результатов, вызываемых другими возможными организмами, присутствующими в поголовье. Однако, поскольку эпитоп 6B8 является эволюционно консервативным (при выравнивании последовательности) и специфичным к вирусу КЧС (mAb 6B8 не связывается с ВД КРС). Таким образом, замещенный эпитоп 6B8 согласно настоящему изобретению в высокой степени приемлем для применения в маркерной вакцине.

Главное преимущество эффективной маркерной вакцины состоит в том, что она позволяет выявлять свиней с острой инфекцией или инфицированных в течение определенного времени (например по меньшей мере приблизительно 3 недели) перед забором образцов в популяции вакцинированных свиней и, таким образом, обеспечивает возможность отслеживания распространения или повторного введения вируса КЧС в популяцию свиней. Таким образом, на основании результатов лабораторных тестов с определенной долей уверенности можно заявить, что популяция вакцинированных свиней свободна от вируса КЧС.

Маркерная вакцина согласно настоящему изобретению идеально подходит для экстренной вакцинации в случае обнаружения или вспышки чумы свиней. Маркерная вакцина способствует быстрому и эффективному введению и позволяет проводить различие между животными, инфицированными полевым вирусом (патогенным) и вакцинированными животными.

В одном аспекте настоящего изобретения существует возможность отличия животных, подвергнутых лечению иммуногенной композицией согласно настоящему изобретению, от животных, инфицированных встречающимся в природе вирусом чумы свиней путем анализа образцов, полученных от вышеупомянутых животных с применением иммунотестов и/или геномных аналитических тестов.

Термин “образец” относится к образцу жидкости организма, образцу отделенных клеток или образцу из ткани или органа. Образцы жидкостей организма получают с применением общеизвестных технологий, и к ним



предпочтительно относятся образцы крови, плазмы, сыворотки или мочи, более предпочтительно – образцы крови, плазмы или сыворотки. Образцы тканей или органов получают из любой ткани или органа, например, путем биопсии. Отделенные клетки получают из жидкостей организма или тканей или органов с применением технологий отделения, таких как центрифугирование или сортировка клеток.

Термин “полученный” включает этап выделения и/или очистки, известный специалистам в данной области, предпочтительно с применением осаждения, колонок и т. п.

Термин “иммунотесты” и “геномные аналитические тесты” рассматриваются ниже. Однако анализ вышеупомянутых “иммунотестов” и “геномных аналитических тестов”, соответственно, является основой для отличия животных, вакцинированных иммуногенной композицией согласно настоящему изобретению, и животных, инфицированных встречающимся в природе (патогенным) вирусом чумы свиней.

В одном аспекте настоящего изобретения вышеупомянутую иммуногенную композицию рецептируют для введения единичной дозой.

Предпочтительно экспериментальные данные, предусмотренные настоящим изобретением, свидетельствуют, что введение иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению единичной дозой надежно и эффективно стимулирует защитный иммунный ответ. Таким образом, в одном аспекте изобретения вышеупомянутую иммуногенную композицию рецептируют для введения единичной дозой, и она эффективна при таком введении.

Кроме того, изобретение обеспечивает применение иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению для применения в качестве медикамента.

В одном аспекте изобретение обеспечивает способ профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных, причем способ включает этап введения иммуногенной композиции согласно изобретению животному, которое в этом нуждается. В одном аспекте заболевание, связанное с вирусом КЧС, является КЧС.

Настоящее изобретение также касается способа иммунизации животного, который включает введение такому животному любой из иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению. Настоящее изобретение также

касается способа иммунизации животного, который включает однократное введение такому животному любой из иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению. Предпочтительно способ иммунизации животного эффективен при однократном введении такому животному иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению.

Термин "иммунизирующий" относится к активной иммунизации путем введения иммуногенной композиции животному, подлежащему иммунизации, что вызывает иммунологическую реакцию против антигена, включенного в такую иммуногенную композицию.

Иммунизация касается снижения частоты инфицирования конкретным вирусом КЧС в стаде или уменьшения тяжести клинических признаков, связанных с инфицированием конкретным вирусом КЧС. Предпочтительно результатом иммунизации является снижение частоты инфицирования конкретным вирусом КЧС в стаде или уменьшения тяжести клинических признаков, вызываемых инфицированием конкретным вирусом КЧС или связанных с ним, путем однократного введения иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению.

В соответствии с аспектом изобретения результатом иммунизации животного, нуждающегося в предлагаемых авторами иммуногенных композициях, является предотвращение инфицирования субъекта вирусом КЧС, предпочтительно путем однократного введения иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению. Еще более предпочтительно результатом иммунизации является эффективная, длительная иммунологическая реакция против инфицирования вирусом КЧС. Следует понимать, что вышеупомянутый период времени должен длиться более 2 месяцев, предпочтительно более 3 месяцев, более предпочтительно – более 4 месяцев, более предпочтительно – более 5 месяцев, более предпочтительно – более 6 месяцев. Следует понимать, что иммунизация не обязательно будет эффективна для всех иммунизированных животных. Однако термин требует, чтобы значительная часть животных в стаде была эффективно иммунизирована.

Предпочтительно в данном контексте предполагается стадо животных, в котором в обычных условиях, т. е., без иммунизации, развились бы клинические признаки, обычно вызываемые инфекцией вируса КЧС или связанные с ней. Эффективность иммунизации животных в стаде без излишних усилий

определяется специалистом в данной области. Предпочтительно иммунизация должна быть эффективной, если клинические признаки по меньшей мере у 33 %, по меньшей мере у 50 %, по меньшей мере у 60 %, по меньшей мере у 70 %, по меньшей мере у 80 % или по меньшей мере у 90 % животных данного стада  
5 уменьшаются по частоте и тяжести по меньшей мере на 10 %, более предпочтительно – по меньшей мере на 20 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 30 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 40 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 50 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 60 %, еще более предпочтительно – по  
10 меньшей мере на 70 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 80 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 90 %, и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95 % по сравнению с животными, которые либо не были иммунизированы, либо были иммунизированы иммуногенной композицией, существовавшей до настоящего изобретения, и впоследствии были  
15 инфицированы вирусом КЧС.

В одном аспекте настоящего изобретения животное является свиньей. В одном аспекте животное является поросенком. Как правило, поросята имеют возраст от 3 до 4 недель. В одном аспекте поросят вакцинируют в возрасте от 1 до 4 недель. В одном аспекте животное является свиноматкой. В одном аспекте  
20 животное является беременной свиноматкой.

В одном аспекте настоящего изобретения иммуногенную композицию вводят интрадермально, внутритрахеально, интравагинально, внутримышечно, интраназально, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, перорально, интратекально, подкожно, внутрикожно, внутрисердечно, интралобарно,  
25 интрамедуллярно, внутрилегочно и с применением комбинаций этих способов. Однако, в зависимости от характера и способа действия соединения, также возможно введение иммуногенной композиции и другими путями.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ снижения у животного частоты инфицирования или уменьшения тяжести одного или нескольких  
30 клинических признаков, связанных с КЧС, причем способ включает этап введения иммуногенной композиции согласно настоящему изобретению животному, которое в этом нуждается, причем снижение частоты инфицирования или тяжести одного или нескольких клинических признаков отмечают относительно животного, не получающего иммуногенную композицию. Предпочтительно

способ включает введение единичной дозы иммуногенной композиции и эффективен для снижения частоты инфицирования или тяжести одного или нескольких клинических признаков путем такого однократного введения иммуногенной композиции.

5 Термин “клинические признаки” в контексте данного описания относится к признакам инфицирования животного вирусом КЧС. Клинические признаки подробнее определены ниже. Однако клинические признаки также включают, помимо прочих, клинические признаки, прямо наблюдаемые у живого животного. Примерами клинических признаков, прямо наблюдаемых у живого животного,  
10 являются выделения из носа и глаз, вялость, кашель, свистящее дыхание, сильное сердцебиение, повышенная температура, привес или потеря веса, обезвоживание, диарея, опухание суставов, хромота, атрофия, бледность кожи, худосочность и т. п. Mittelholzer et al. (Vet. Microbiol., 2000. 74(4): p. 293 - 308) разработали контрольный список для определения клинических показателей в экспериментах с  
15 животными, зараженными КЧС. Этот контрольный список содержит параметры бодрости, напряжения тела, формы тела, дыхания, походки, кожи, глаз / конъюнктивы, аппетита, дефекации и остатков при продевании.

Предпочтительно клинические признаки уменьшаются по частоте и тяжести по меньшей мере на 10 %, более предпочтительно – по меньшей мере на 20 %, еще  
20 более предпочтительно – по меньшей мере на 30 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 40 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 50 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 60 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 70 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 80 %, еще более предпочтительно – по меньшей мере на 90 %, и  
25 наиболее предпочтительно – по меньшей мере на 95 % по сравнению с субъектами, которых либо не подвергали лечению, либо лечили иммуногенной композицией, имевшейся в наличии до настоящего изобретения, и впоследствии инфицированных вирусом КЧС.

В одном аспекте изобретения иммуногенную композицию вводят однократно,  
30 и она является эффективной при таком однократном введении.

Однако, хотя предпочтение отдают введению единичной дозой, также возможно введение иммуногенной композиции дважды или несколько раз, причем первую дозу вводят до введения второй (бустерной) дозы. Предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 15 дней после первой дозы. Более

предпочтительно вторую дозу вводят через период от 15 до 40 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 17 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят через период от 17 до 30 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 19 дней после первой дозы. Еще более предпочтительно вторую дозу вводят через период от 19 до 25 дней после первой дозы. Наиболее предпочтительно вторую дозу вводят по меньшей мере через 21 день после первой дозы. В предпочтительном аспекте режима двукратного введения и первую, и вторую дозы иммуногенной композиции вводят в одинаковом количестве. Помимо режима первой и второй доз, альтернативный вариант включает и дальнейшие последующие дозы. Например, в этих аспектах возможно введение третьей, четвертой или пятой дозы. Предпочтительно режимы введения последующих третьей, четвертой или пятой дозы предполагают их введение в таком же количестве, что и первая доза, с временными интервалами между дозами, соответствующими интервалам между вышеупомянутыми первой и второй дозами.

В одном аспекте изобретения один или несколько клинических признаков выбирают из группы, состоящей из: респираторного дистресса, затрудненного дыхания, кашля, чихания, ринита, тахипноэ, диспноэ, пневмонии, покраснения / посинения ушей и вульвы, желтухи, лимфоцитарных инфильтратов, лимфаденопатии, гепатита, нефрита, анорексии, лихорадки, вялости, агалактии, диареи, назального экструдата, конъюнктивита, прогрессирующей потери веса, сниженного привеса, бледности кожи, язвы желудка, макроскопических и микроскопических повреждений органов и тканей, лимфатических поражений, смертности, вызываемых вирусом выкидышей, мертворождения, недоразвитости порослят, мумификации и их комбинаций.

В одном аспекте настоящее изобретение также обеспечивает способ отличия животных, инфицированных вирусом КЧС, от животных, вакцинированных иммуногенной композицией согласно настоящему изобретению, включающий

- а) получение образца и
- б) испытание вышеупомянутого образца в иммунотесте.

Термин “иммунотест” означает тест, включающий антитело, специфичное к эпитопу 6В8 белка Е2 вируса КЧС. В возможном варианте антитело является

специфичным к мутантному эпитопу 6В8 согласно настоящему изобретению или к эпитопу 6В8 белка Е2 вируса КЧС дикого типа (эпитопу 6В8, который не был генетически модифицирован). Однако термин “иммунотест” также относится к тесту, включающему пептиды мутантного эпитопа 6В8 согласно настоящему изобретению или пептиды эпитопа 6В8 белка Е2 вируса КЧС дикого типа (эпитоп 6В8, который не был генетически модифицирован). Примерами иммунотестов являются любые ферментно-иммунологические или иммунохимические способы обнаружения, такие как ELISA (твердофазный иммуносорбентный анализ), EIA (иммуноферментный анализ), RIA (радиоиммунный анализ), сэндвич-ферментные иммуноанализы, флуоресцентный тест на антитела (FAT), электрохемилюминесцентные сэндвич-иммуноанализы (ECLIA), усиленный диссоциацией лантанидный флуоресцентный иммуноанализ (DELFIА) или твердофазные иммунотесты, иммунофлуоресцентный тест (IFT), иммуногистохимическое окрашивание, вестерн-блоттинг или любой другой подходящий способ, технически доступный для специалистов в данной области. В зависимости от применяемого анализа, антигены или антитела метят ферментом, флуорофором или радиоизотопом. См., например, Coligan et al. *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons Inc., New York, N.Y. (1994); и Frye et al., *Oncogen* 4: 1153 - 1157, 1987.

Предпочтительно антитело, специфичное к эпитопу 6В8 белка Е2 вируса КЧС дикого типа, применяют для обнаружения антигена вируса КЧС в клетках сыворотки (таких как лейкоциты) или криостатных срезах выделенных органов (таких как миндалины, селезенка, почки, лимфатические узлы, дальние части подвздошной кишки) животного (такого как свинья), у которого есть подозрение на инфицирование вирусом КЧС дикого типа, или которое вакцинировано вакциной, включающей рекомбинантный белок Е2 вируса КЧС согласно изобретению. В таком случае только образец животного, инфицированного вирусом КЧС дикого типа, демонстрирует положительные результаты при применении вышеупомянутого специфичного к эпитопу 6В8 антитела. В отличие от него, образец животного, вакцинированного вакциной, включающей рекомбинантный белок Е2 вируса КЧС согласно настоящему изобретению, не демонстрирует результатов при применении вышеупомянутого специфичного к эпитопу 6В8 антитела по причине мутации в пределах эпитопа 6В8 согласно настоящему изобретению. В альтернативном тесте вирус КЧС выделяют,

например, из органов (таких как миндалины животного) или клеток сыворотки (таких как лейкоциты) инфицированных или с подозрением на инфицирование вирусом КЧС дикого типа или вакцинированных животных, и инкубируют с соответствующей линией клеток (таких как клетки SK-6 или клетки РК-15) для инфицирования клеток вирусом. Реплицированный вирус затем обнаруживают в клетках с использованием специфичных к эпитопу 6В8 антител, которые позволяют различать полевой (дикий тип, патогенный) вирус КЧС и рекомбинантный вирус КЧС согласно изобретению. Кроме того, пептиды применяют для блокирования неспецифической перекрестной реактивности. Кроме того, антитела, специфичные к другим эпитопам вируса КЧС дикого типа, применяют в качестве положительного контроля.

Более предпочтительно применяют анализ ELISA, причем антитело, специфичное к эпитопу 6В8 белка Е2 вируса КЧС дикого типа (эпитоп 6В8, который не был генетически модифицирован) сшивают с микролуночными аналитическими планшетами для отличия инфицированных свиней от свиней, вакцинированных вакциной согласно настоящему изобретению. Вышеупомянутое сшивание предпочтительно выполняют через якорный белок, такой как, например, поли-L-лизин. Анализы ELISA, в которых применяют такое сшивание, в целом более чувствительны по сравнению с анализами ELISA с применением технологии пассивного покрытия. Вирус КЧС дикого типа (патогенный) связывается с антителом, специфичным к эпитопу 6В8 белка Е2 вируса КЧС дикого типа (эпитопу 6В8, который не был генетически модифицирован). Обнаружение связывания вируса КЧС дикого типа с антителом, специфичным к эпитопу 6В8 вируса КЧС дикого типа, выполняют с применением другого антитела, специфичного к вирусу КЧС. В таком случае только образец инфицированной свиньи будет показывать положительные результаты при применении специфичного к эпитопу 6В8 антитела. Кроме того, возможно применение пептидов для блокирования неспецифической перекрестной реактивности. Кроме того, возможно применение антител, специфичных к другим эпитопам вируса КЧС дикого типа, в качестве положительного контроля.

В альтернативном варианте микролуночные аналитические планшеты сшивают с антителом, специфичным к вирусу КЧС, отличным от антитела, специфичного к эпитопу 6В8 белка Е2 вируса КЧС дикого типа (эпитопу 6В8, который не был генетически модифицирован). Вирус КЧС дикого типа

(патогенный) связывается со сшитым антителом. Обнаружение связывания вируса КЧС дикого типа со сшитым антителом выполняют с применением антитела, специфичного к эпитопу 6B8 белка E2 вируса КЧС дикого типа (эпитопу 6B8, который не был генетически модифицирован).

5 Как уже было изложено выше, эпитоп 6B8 является эволюционно консервативным и специфичным к вирусу КЧС дикого типа.

Таким образом, в более предпочтительном варианте применяют ELISA для обнаружения в образце антител, направленных против мутантного эпитопа 6B8 согласно настоящему изобретению или эпитопа 6B8 вируса КЧС дикого типа  
10 (эпитопа 6B8, который не был генетически модифицирован). Такой тест включает пептиды мутантного эпитопа 6B8 согласно настоящему изобретению или пептиды эпитопа 6B8 вируса КЧС дикого типа (эпитопа 6B8, который не был генетически модифицирован).

В возможном варианте такой тест, например, включает лунки с замещенным  
15 эпитопом 6B8 согласно настоящему изобретению или эпитопом 6B8 вируса КЧС дикого типа (эпитопом 6B8, который не был генетически модифицирован), сшитым с микролуночными аналитическими планшетами. Вышеупомянутое сшивание предпочтительно выполняют через якорный белок, такой как, например, поли-L-лизин. Системы экспрессии для получения эпитопа 6B8, мутантного или  
20 дикого типа, общеизвестны среди специалистов в данной области. В альтернативном варианте вышеупомянутые эпитопы 6B8 синтезируют химическим путем. Следует понимать, что в тесте согласно изобретению возможно применение мутантного или относящегося к дикому типу эпитопа 6B8 как такового, удобно использовать белок, включающий полный белок E2 или  
25 фрагмент белка E2, который включает вышеупомянутый эпитоп 6B8, вместо относительно короткого эпитопа как такового. В особенности при применении эпитопа, например, для покрытия лунки в стандартном тесте ELISA, более эффективным для этапа покрытия считают использование большего белка, включающего эпитоп.

30 Животные, вакцинированные вакциной, включающей рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно настоящему изобретению, не вырабатывали антитела против эпитопа 6B8 дикого типа. Однако такие животные вырабатывали антитела против замещенного эпитопа 6B8 согласно настоящему изобретению. Вследствие этого антитела не связываются в лункой, покрытой эпитопом 6B8



дикого типа. В отличие от нее, в случае, если лунка покрыта мутантным эпитопом 6B8 согласно настоящему изобретению, антитела связываются с вышеупомянутым мутантным эпитопом 6B8.

Однако животные, инфицированные вирусом КЧС дикого типа, 5  
вырабатывали антитела против эпитоп вируса КЧС дикого типа. Но такие животные не вырабатывали антитела против мутантного эпитопа 6B8 согласно настоящему изобретению. Вследствие этого антитела не связываются с лункой, покрытой мутантным эпитопом 6B8 согласно настоящему изобретению. В отличие от нее, в случае, если лунка покрыта эпитопом 6B8 дикого типа, антитела 10  
связываются с эпитопом 6B8 дикого типа.

Связывание антител с мутантным эпитопом 6B8 согласно настоящему изобретению или эпитопом 6B8 вируса КЧС дикого типа (эпитопом 6B8, который не был генетически модифицирован) возможно с применением способов, общеизвестных среди специалистов в данной области.

Предпочтительно анализ ELISA представляет собой ELISA сэндвич-типа. 15  
Более предпочтительно анализ ELISA является конкурентным ELISA. Наиболее предпочтительно анализ ELISA является двойным конкурентным ELISA. Однако специалистам в данной области хорошо известны и другие технологии ELISA. Примеры анализов ELISA описаны в публикациях Wensvoort G. et al., 1988 (Vet. 20  
Microbiol. 17(2): 129 - 140), Robiolo B. et al., 2010 (J. Virol. Methods. 166 (1 - 2): 21 - 27) и Colijn, E.O. et al., 1997 (Vet. Microbiology 59: 15 - 25).

В одном аспекте настоящего изобретения иммунотест включает тестирование с целью выяснения, связываются ли антитела, специфически 25  
распознающие интактный эпитоп 6B8 белка E2 вируса КЧС, с белком E2 вируса КЧС в образце. В одном аспекте настоящего изобретения иммунотест включает тестирование с целью выяснения, присутствует ли в образце антитело, специфически распознающее эпитоп 6B8 белка E2 вируса КЧС, и/или тестирование с целью выяснения, присутствует ли в образце антитело, специфически распознающее мутированный эпитоп 6B8 белка E2 вируса КЧС. 30  
Такой мутированный эпитоп 6B8 включает мутацию(и) в эпитопе 6B8, как определено в данном описании.

В одном аспекте настоящего изобретения иммунологический тест представляет собой EIA (иммуноферментный анализ) или ELISA (твердофазный иммуносорбентный анализ). В одном аспекте настоящего изобретения анализ

ELISA является непрямым ELISA, сэндвич-ELISA, конкурентным ELISA или двойным конкурентным ELISA, предпочтительно двойным конкурентным ELISA.

В одном аспекте настоящее изобретение также обеспечивает нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно  
5 настоящему изобретению.

Термин “нуклеиновая кислота” относится к полинуклеотидам, включая молекулы ДНК, молекулы РНК, молекулы кДНК или производные. Термин охватывает одно- и двухцепочечные полинуклеотиды. Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению охватывает рекомбинантные полинуклеотиды  
10 (т. е., рекомбинантные из их естественной среды) и генетически модифицированные формы. Кроме того, охватываются также химически модифицированные полинуклеотиды, включая встречающиеся в природе модифицированные полинуклеотиды, такие как гликозилированные или метилированные полинуклеотиды или искусственные модифицированные, такие  
15 как биотинилированные полинуклеотиды. Кроме того, следует понимать, что существует возможность кодирования рекомбинантного белка E2 вируса КЧС согласно настоящему изобретению многими полинуклеотидами по причине вырожденности генетического кода. В одном аспекте настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный белок E2 вируса КЧС  
20 согласно настоящему изобретению, является кодон-оптимизированной в соответствии с клеткой-хозяином, в которую вводят нуклеиновую кислоту.

В одном аспекте настоящее изобретение также обеспечивает вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно настоящему изобретению. В одном аспекте вектор является  
25 экспрессионный вектор.

Термин “вектор” охватывает фаг, плазмиду, вирусные или ретровирусные векторы, а также искусственные хромосомы, такие как бактериальные или дрожжевые искусственные хромосомы. Кроме того, термин также касается нацеленных конструкторов, которые позволяют осуществлять случайное или  
30 сайт-направленное включение нацеленного конструктора в геномную ДНК. Такие нацеленные конструкторы предпочтительно включают ДНК достаточной длины для гомологичной или гетерологичной рекомбинации, как подробно описывается ниже. Вектор, охватывающий нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, предпочтительно также включает селективируемые маркеры для

распространения и/или отбора в клетке хозяина. Вектор включают в клетку-хозяин с применением разных технологий, хорошо известных специалистам в данной области. Например, плазмидный вектор включают в осадок, такой как фосфат кальция или хлорид рубидия, или в комплекс с заряженным липидом или в кластеры на углеродной основе, такие как фуллерены. В альтернативном варианте плазмидный вектор вводят с применением технологий теплового шока или электропорации. Если вектор должен быть вирусом, его упаковывают *in vitro* с применением соответствующей пакующей линии клеток перед применением в клетках-хозяевах. Возможны репликационно-компетентные или репликационно-дефективные ретровирусные векторы. В последнем случае вирусное распространение в целом происходит только в комплементирующем хозяине / клетке. Более предпочтительно полинуклеотид функционально связан с последовательностями контроля экспрессии, обеспечивающими возможность экспрессии в прокариотных или эукариотных клетках или их выделенных фракциях. Экспрессия вышеупомянутого полинуклеотида включает транскрипцию полинуклеотида, предпочтительно в транслируемую мРНК. Регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию в эукариотных клетках, предпочтительно клетках млекопитающих, хорошо известны специалистам в данной области. Они предпочтительно включают регуляторные последовательности, обеспечивающие инициацию транскрипции и, необязательно, поли-А сигналы, обеспечивающие терминацию транскрипции и стабилизацию транскрипта. В возможных вариантах дополнительные регуляторные элементы включают транскрипционные, а также трансляционные энхансеры. Возможные регуляторные элементы, обеспечивающие возможность экспрессии в прокариотных клетках-хозяевах, включают, например, *lac*, *trp* или *tac* промотор в *E. coli*, и примерами регуляторных элементов, обеспечивающих возможность экспрессии в эукариотных клетках-хозяевах, являются промотор AOX1 или GAL1 в дрожжах или CMV-, SV40-, RSV-промотор (вирус саркомы Рауса), CMV-энхансер, SV40-энхансер или глобиновый интрон в клетках млекопитающих и других животных. Кроме того, возможно применение индуцибельных последовательностей контроля экспрессии в экспрессионном векторе, охватываемом настоящим изобретением. Такие индуцибельные векторы включают *tet* или *lac* операторные последовательности или последовательности, индуцируемые тепловым шоком или другими окружающими факторами.

Подходящие последовательности контроля экспрессии хорошо известны специалистам в данной области. Технологии описаны, например, в публикациях Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. и Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Предпочтительно вектор в соответствии с изобретением является бакуловирусным вектором. Более предпочтительно вектор в соответствии с изобретением является экспрессионным вектором млекопитающих для экспрессии в клетках млекопитающих, таких как клетка CHO.

10 В одном аспекте изобретение также обеспечивает клетку-хозяин, включающую нуклеиновую кислоту или вектор в соответствии с изобретением. В возможных вариантах клетка-хозяин является прокариотной клеткой, такой как *E. coli*, или эукариотной клеткой, такой как, например, клетка насекомого. Предпочтительно клеткой-хозяином является клетка SF9. Более предпочтительно  
15 клеткой-хозяином является клетка млекопитающего, такая как клетка CHO.

В одном аспекте изобретение также обеспечивает способ продуцирования рекомбинантного белка E2 вируса КЧС, предпочтительно рекомбинантного белка E2 вируса КЧС, включающего одно или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7 или иным образом раскрыто в данном описании,  
20 который включает

(I) культивирование клетки-хозяина, предпочтительно клетки CHO, как определено в данном описании, в условиях, подходящих для экспрессии белка E2 вируса КЧС, и

(II) выделение и, необязательно, очистку белка E2 вируса КЧС.

25 Очистку белка E2 вируса КЧС осуществляют, например, через слитую метку или слитый пептид, прикрепленный к белку E2 вируса КЧС, например, через His-метка, FLAG-метка или Fc-фрагмент в случае наличия.

В одном аспекте изобретение также обеспечивает способ получения иммуногенной композиции, который включает: (I) культивирование клеток,  
30 содержащих экспрессионный вектор, способный экспрессировать белок E2; и (II) сбор белка E2 или цельноклеточной культуры, включающей белок E2, причем белок E2 включает по меньшей мере одну мутацию в пределах эпитопа 6B8 белка E2, который специфически распознается моноклональным антителом 6B8, как определено выше в данном описании.

В одном аспекте изобретения экспрессионный вектор представляет собой рекомбинантный экспрессионный вектор млекопитающего, включающий молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению. В одном аспекте рекомбинантный экспрессионный вектор млекопитающего происходит из коммерческого продукта. В одном аспекте рекомбинантный экспрессионный вектор млекопитающего происходит из pcDNA3.4 (Invitrogen). В одном аспекте клетки являются клетками млекопитающих. В одном аспекте клетки млекопитающих являются клетками CHO.

В одном аспекте способ выполняют путем применения системы экспрессии ExpiCHO™ (Gibico, Cat# A29133) в соответствии с руководством для пользователя (Revision D.0, May 25, 2018, Thermo Fisher Scientific Inc). В одном варианте осуществления клетки CHO являются клетками ExpiCHO-S™, продаваемыми под названием Cat# A29127 компанией Gibico. В одном варианте осуществления способ включает этап инфицирования клеток млекопитающих рекомбинантным экспрессионным вектором млекопитающего в соответствии с изобретением, например, с применением комплекта для трансфекции CHO ExpiFectamine™ (Gibico, Cat# A29129).

В одном аспекте изобретения экспрессионный вектор является рекомбинантным бакуловирусом, включающим молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению. В одном аспекте рекомбинантный бакуловирус происходит из коммерческого продукта. В одном аспекте рекомбинантный бакуловирус происходит из коммерческого продукта, продаваемого под торговой маркой Sapphire™ Vaculovirus (Allele Biotechnology). В одном аспекте клетки являются клетками насекомых. В одном аспекте клетки насекомых являются клетками SF+. В одном варианте осуществления клетки SF+ являются коммерческим продуктом, продаваемым компанией Protein Sciences Corporation (Meriden, Коннектикут, США).

В одном аспекте изобретения способ включает этап приготовления рекомбинантного бакуловируса, включающего молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению. В одном аспекте рекомбинантный бакуловирус происходит из коммерческого продукта. В одном аспекте рекомбинантный бакуловирус происходит из коммерческого продукта, продаваемого под торговой маркой Sapphire™ Vaculovirus (Allele Biotechnology).

В одном аспекте изобретения способ включает этап инфицирования клеток рекомбинантным бакуловирусом согласно изобретению. В одном варианте осуществления клетки являются клетками насекомых. В одном варианте осуществления клетки насекомых являются клетками SF+. В одном варианте осуществления клетки SF+ являются коммерческим продуктом, продаваемым Protein Sciences Corporation (Meriden, Коннектикут, США).

В одном аспекте изобретения способ включает получение рекомбинантного бакуловируса, который включает молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению, и инфицирование клеток насекомых рекомбинантным бакуловирусом. В одном варианте осуществления рекомбинантный бакуловирус происходит из коммерческого продукта, продаваемого под торговой маркой Sapphire™ Baculovirus (Allele Biotechnology). В одном варианте осуществления клетки насекомых являются клетками SF+. В одном варианте осуществления клетки SF+ являются коммерческим продуктом, продаваемым Protein Sciences Corporation (Meriden, Коннектикут, США).

В одном аспекте изобретения способ включает: (I) получение рекомбинантного бакуловируса, включающего молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению; (II) инфицирование клеток насекомых рекомбинантным бакуловирусом; (III) культивирование клеток насекомых в культуральной среде; и (IV) сбор белка E2 согласно изобретению или цельноклеточной культуры, включающий белок E2 согласно изобретению. В одном аспекте рекомбинантный бакуловирус происходит из коммерческого продукта, продаваемого под торговой маркой Sapphire™ Baculovirus (Allele Biotechnology). В одном варианте осуществления клетки насекомых являются клетками SF+. В одном варианте осуществления клетки SF+ являются коммерческим продуктом, продаваемым Protein Sciences Corporation (Meriden, Коннектикут, США).

В одном аспекте изобретения культуральную среду для культивирования клеток согласно изобретению определяют специалисты в данной области. В одном аспекте культуральная среда является бессывороточной средой для клеток насекомых. В одном аспекте культуральной средой является Ex-CELL 420 (бессывороточная среда для клеток насекомых Ex-CELL® 420, Sigma-Aldrich, Cat. 14420C).

В одном аспекте изобретения клетки насекомых культивируют в условиях, подходящих для экспрессии белка E2. В одном аспекте клетки насекомых

инкубируют в течение периода до десяти дней, предпочтительно от приблизительно двух дней до приблизительно десяти дней, более предпочтительно – от приблизительно четырех дней до приблизительно девяти дней, и еще более предпочтительно – от приблизительно пяти дней до

5 приблизительно восьми дней. В одном аспекте условия, подходящие для культивирования клеток насекомых, включают температуру приблизительно 22 - 32 °С, предпочтительно приблизительно 24 - 30 °С, более предпочтительно – приблизительно 25 - 29 °С, еще более предпочтительно – приблизительно 26 - 28 °С, и наиболее предпочтительно – приблизительно 27 °С.

10 В одном аспекте изобретения способ также включает этап инактивирования культуры клеток согласно изобретению. С точки зрения изобретения возможен любой традиционный способ инактивации, включая, помимо прочего, химическую и/или физическую обработку.

В одном аспекте этап инактивации включает добавление циклизированного

15 бинарного этиленимина (БЭИ), предпочтительно в концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 20 мМ, предпочтительно от приблизительно 2 до приблизительно 10 мМ, более предпочтительно – приблизительно 5 мМ или 10 мМ. В одном варианте осуществления этап инактивации включает добавление раствора бромистоводородного 2-бромэтиленамина, который циклизируют для

20 образования БЭИ в NaOH.

В одном аспекте этап инактивации выполняют при 25 - 40 °С, предпочтительно при 28 - 39 °С, более предпочтительно – при 30 - 39 °С, более предпочтительно – при 35 - 39 °С. В одном варианте осуществления этап инактивации выполняют в течение 24 - 72 ч, предпочтительно в течение 30 - 72 ч,

25 более предпочтительно – 48 - 72 ч. В целом этап инактивации выполняют до тех пор, пока не перестанет обнаруживаться вирусный вектор.

В одном аспекте изобретения способ также включает этап нейтрализации после этапа инактивации. Этап нейтрализации включает добавление эквивалентного количества агента, нейтрализующего инактивирующий агент в

30 пределах раствора. В одном варианте осуществления инактивирующим агентом является БЭИ. В одном аспекте нейтрализующим агентом является тиосульфат натрия. В одном аспекте, если инактивирующим агентом является БЭИ, добавляют эквивалентное количество тиосульфата натрия. Например, в случае добавления БЭИ до конечной концентрации 5 мМ добавляют 1,0 М раствора

тиосульфата натрия для получения конечной минимальной концентрации 5 мМ для нейтрализации любого остаточного БЭИ. В одном аспекте этап нейтрализации включает добавление раствора тиосульфата натрия до конечной концентрации от 1 до 20 мМ, предпочтительно от 2 до 10 мМ, более предпочтительно – 5 мМ или 10 мМ, если инактивирующим агентом является БЭИ. В одном аспекте 5 нейтрализующий агент добавляют после завершения этапа инактивации, что означает отсутствие обнаружения репликации вирусного вектора. В одном аспекте нейтрализующий агент добавляют после выполнения этапа инактивации 10 выполняют в течение 24 ч. В одном аспекте нейтрализующий агент добавляют после выполнения этапа инактивации в течение 30 ч. В одном аспекте нейтрализующий агент добавляют после выполнения этапа инактивации в течение 48 ч. В одном аспекте нейтрализующий агент добавляют после выполнения этапа инактивации в течение 72 ч.

В одном аспекте изобретения белок Е2 вируса КЧС подвергают дальнейшей 15 очистке. Например, в возможном варианте белок Е2 вируса КЧС согласно изобретению включает слитый пептид, такой как, например His-метка, FLAG-метка или Fc-фрагмент, который прикрепляют к белку Е2 вируса КЧС. Белки Е2 вируса КЧС с His-меткой очищают, например, при помощи аффинности Ni-NTA (ион никеля<sup>2+</sup>, соединенный с нитрилотриуксусной кислотой). Белки Е2 20 вируса КЧС с FLAG-меткой (DYKDDDDK) очищают, например, при помощи моноклонального антитела, специфически связывающегося с FLAG-меткой (например, имеются в наличии коммерческие комплекты от Sigma-Aldrich (агарозный аффинный гель против FLAG® M1)). Белки Е2 вируса КЧС, связанные с Fc-фрагментом, очищают, например, при помощи аффинности белка А или белка 25 G.

В одном аспекте изобретение также обеспечивает способ продуцирования рекомбинантного белка Е2 вируса КЧС, предпочтительно рекомбинантного белка Е2 вируса КЧС, который включает одно или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7 или иным образом раскрыто в 30 данном описании, в клетках СНО, причем вышеупомянутый способ включает

а) адаптацию клеток СНО к высокоплотной суспензионной культуре, в среде;

б) трансфекцию адаптированных клеток СНО с этапа а) рекомбинантным экспрессионным вектором млекопитающего, включающим молекулу нуклеиновой



кислоты, кодирующую рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, предпочтительно рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, включающий одно или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7 или иным образом раскрыто в данном описании,

5           в) культивирование трансфицированных клеток СНО с этапа б) в условиях, подходящих для экспрессии рекомбинантного белка E2 вируса КЧС;

          г) сбор и необязательно очистку рекомбинантного белка E2 вируса КЧС.

          В одном аспекте изобретение также обеспечивает способ продуцирования рекомбинантного белка E2 вируса КЧС, предпочтительно рекомбинантного белка  
10 E2 вируса КЧС, который включает одно или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7, или рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно настоящему изобретению, в клетках СНО, причем вышеупомянутый способ включает

          а) выращивание клеток СНО, адаптированных к высокоплотной  
15 суспензионной культуре, в среде;

          б) трансфекцию клеток СНО с этапа а) экспрессионным вектором млекопитающего, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, предпочтительно рекомбинантный белок  
20 E2 вируса КЧС, который включает одно или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7, или рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно настоящему изобретению,

          в) культивирование трансфицированных клеток СНО с этапа б) в условиях, подходящих для экспрессии рекомбинантного белка E2 вируса КЧС;

          г) сбор и необязательно очистку рекомбинантного белка E2 вируса КЧС.

25           В одном варианте осуществления рекомбинантный экспрессионный вектор млекопитающего происходит из pcDNA3.4 (Invitrogen).

          В одном варианте осуществления клетки СНО являются клетками ExpiCHO-S™, продаваемыми компанией Gibco как Cat# A29127.

          В одном варианте осуществления средой, применяемой согласно способу,  
30 является экспрессионная среда ExpiCHO™, продаваемая компанией Gibco как Cat# A29100.

          В одном варианте осуществления адаптированные клетки СНО трансфицируют с применением комплекта для трансфекции СНО ExpiFectamine™ (Gibco, Cat# A29129).

В одном варианте осуществления на этапе в) трансфицированные клетки СНО культивируют при приблизительно 32 - 37 °С, предпочтительно приблизительно 32 °С.

5 В одном варианте осуществления на этапе в) трансфицированные клетки СНО культивируют в увлажненной атмосфере приблизительно 5 - 8 % CO<sub>2</sub>.

В одном варианте осуществления на этапе в) добавляют энхансер ExpiFectamine™ СНО и добавку ExpiСНО™ Feed.

10 В одном варианте осуществления рекомбинантный белок E2 вируса КЧС собирают приблизительно через 2 - 14 дней после трансфекции, например, приблизительно через 4 - 12 дней после трансфекции или приблизительно через 8 - 10 дней после трансфекции.

15 В одном аспекте изобретения белок E2 вируса КЧС подвергают дальнейшей очистке. Например, белок E2 вируса КЧС согласно изобретению включает слитый пептид, такой как, например, His-метка, FLAG-метка или Fc-фрагмент, который прикрепляют к белку E2 вируса КЧС. Белки E2 вируса КЧС с His-меткой очищают, например, при помощи аффинности Ni-NTA (ион никеля<sup>2+</sup>, соединенный с нитрилотриуксусной кислотой). Белки E2 вируса КЧС с FLAG-меткой (DYKDDDDK) очищают, например, при помощи моноклонального антитела, специфически связывающегося с FLAG-меткой (например, имеются в наличии 20 коммерческие комплекты от Sigma-Aldrich (агарозный аффинный гель против FLAG® M1)). Белки E2 вируса КЧС, связанные с Fc-фрагментом, очищают, например, при помощи аффинности белка А или белка G.

25 В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает комплект для отличия животных, инфицированных вирусом КЧС, от животных, вакцинированных иммуногенной композиция согласно изобретению. В одном аспекте комплект включает антитело, как определено в данном описании, или его антигенсвязывающий фрагмент, рекомбинантный белок E2 согласно изобретению с мутацией(ями) в эпитопе 6B8 и/или белок E2 вируса КЧС дикого типа, включающий эпитоп 6B8, как определено в данном описании. В возможном 30 варианте комплект также содержит инструкции по применению.

Следующие пункты также описаны авторами и составляют часть раскрытия изобретения:

1. Белок E2 рекомбинантного вируса КЧС (вируса классической чумы свиней), включающий по меньшей мере одну мутацию в пределах эпитопа 6B8,

причем немодифицированный эпитоп 6B8 специфически распознается моноклональным антителом 6B8.

2. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС в соответствии с пунктом 1, причем по меньшей мере одна мутация в пределах эпитопа 6B8 белка E2 ведет к  
5 специфическому ингибированию связывания моноклонального антитела 6B8 с таким мутированным эпитопом 6B8.

3. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС в соответствии с пунктом 1 или 2, причем моноклональное антитело 6B8

(I) продуцируется гибридомой, депонированной в ССТСС под номером  
10 доступа ССТСС С2018120, или

(II) включает переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7 и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8, или

(III) включает CDR моноклонального антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120, или

(IV) включает  $V_H$  CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1,  $V_H$  CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 2,  $V_H$  CDR3, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3,  $V_L$  CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4,  $V_L$  CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5, и  $V_L$  CDR3, включающую аминокислотную  
25 последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6.

4. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 3, причем эпитоп 6B8 белка E2, который специфически распознается моноклональным антителом 6B8, определяется по меньшей мере аминокислотным остатком в позиции 10, позиции 14, позиции 22, позиции 24, позициях 24/25, позиции 41 и/или позиции 64 белка E2.  
30

5. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 3, причем эпитоп 6B8 белка E2, который специфически распознается моноклональным антителом 6B8, определяется по меньшей мере аминокислотным остатком S14, G22, E24, E24/G25, Y10, D41 и/или R64 белка E2,

или определяется по меньшей мере аминокислотным остатком S14, G22, G24, G24/G25, Y10, D41 и/или R64 белка E2.

6. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 5, который включает замещение в аминокислотной позиции 24 белка E2, замещение в аминокислотных позициях 24/25 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 22 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 41 белка E2, и/или а замещение в аминокислотной позиции 64 белка E2.

7. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 6, в котором аминокислота в позиции 24 белка E2 замещена R, аминокислота в позициях 24 и 25 белка E2 замещена R и D соответственно, аминокислота в позиции 14 белка E2 замещена K, Q или R, аминокислота в позиции 22 белка E2 замещена A, R, Q или E, причем предпочтение отдают A и R, аминокислота в позиции 10 белка E2 замещена A или P, аминокислота в позиции 41 белка E2 замещена A, N или E, и/или аминокислота в позиции 64 белка E2 замещена A, S или E, причем предпочтение отдают A и S.

8. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 7, который включает замещение E или G на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 белка E2, замещение E или G на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 и G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25 белка E2, замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, замещение Y на A или P в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение D на A, N или E в аминокислотной позиции 41 белка E2, и/или замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

9. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 8, причем аминокислотное замещение в пределах эпитопа 6B8 в результате образует мутированный эпитоп 6B8, включающий аминокислоту R, D или I в позиции 24 белка E2, аминокислоту D, K, L, N, R, T, V,

Е или Р в позиции 25 белка E2, аминокислоту К, Q или R в позиции 14 белка E2, аминокислоту А, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S в позиции 22 белка E2, аминокислоту А или Р в позиции 10 белка E2, аминокислоту А, N или Е в позиции 41 белка E2 и/или аминокислоту А, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W в позиции 64  
5 белка E2.

10. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 9, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит из С-штамма или полевого штамма QZ07 или GD18.

11. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или  
10 нескольким пунктам с 1 по 10, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит из полевого штамма QZ07 и включает замещение Е на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 белка E2, или замещение Е на R в аминокислотной позиции 24 и G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25  
15 белка E2, необязательно также включает замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2 или замещение G на А, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают А, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения Y на А или Р в аминокислотной позиции 10  
20 белка E2, замещение D на А, N или Е в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещение R на А, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают А, К и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

12. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или  
25 нескольким пунктам с 1 по 10, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит из полевого штамма GD18 и включает замещение Е на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 белка E2, или замещение Е на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24, и G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25 белка E2, необязательно также  
30 включает замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2 или замещение G на А, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают А, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения Y на А или Р в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение D на А, N или Е в

аминокислотной позиции 41 белка E2, и/или замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

13. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или  
5 нескольким пунктам с 1 по 10, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС  
происходит из С-штамма и включает замещение G на R, D или I, причем  
предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 белка E2, и замещение G на  
D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в  
аминокислотной позиции 25 белка E2, и необязательно также включает замещение  
10 S на K в аминокислотной позиции 14 белка E2 или замещение G на A, R, Q, E, D, N,  
K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в  
аминокислотной позиции 22 белка E2, и по меньшей мере еще одно замещение,  
выбранное из группы, состоящей из замещения Y на A или P в аминокислотной  
позиции 10 белка E2, замещение D на A, N или E в аминокислотной позиции 41  
15 белка E2 и/или замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем  
предпочтение отдают A, K и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

14. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или  
нескольким пунктам с 1 по 10, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС  
включает одно или несколько аминокислотных замещений в аминокислотных  
20 позициях белка E2, как определено в таблицах с 1 по 7.

15. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или  
нескольким пунктам с 1 по 10, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС  
включает одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы,  
состоящей из SEQ ID NO: 15 - 20, 22 - 33, 35 - 40, 49 - 72 и 74 - 81.

16. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или  
25 нескольким пунктам с 1 по 15, причем Fc-фрагмент, такой как Fc-фрагмент свиньи  
связан с рекомбинантным белком E2 вируса КЧС; предпочтительно Fc-фрагмент,  
такой как Fc-фрагмент свиньи, связан с С-концом белка E2, предпочтительно  
через пептидный линкер.

17. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный  
30 белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 16.

18. Вектор, включающий нуклеиновую кислоту по пункту 17, причем в  
предпочтительном варианте вектор является экспрессионным вектором  
млекопитающего.

19. Клетка-хозяин, включающая нуклеиновую кислоту по пункту 17 или вектор по пункту 18, причем предпочтительно клетка-хозяин является клеткой СНО.

20. Рекомбинантный вирус КЧС, включающий рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 16.

21. Рекомбинантный вирус КЧС по пункту 20, причем рекомбинантный вирус КЧС является аттенуированным.

22. Иммуногенная композиция, включающая рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 16, рекомбинантную нуклеиновую кислоту в соответствии с пунктом 17, вектор в соответствии с пунктом 18, клетку-хозяин по пункту 19 и/или рекомбинантный вирус КЧС по пункту 20 или 21.

23. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктом 22, причем вышеупомянутая иммуногенная композиция является вакциной, предпочтительно маркерной вакциной или вакциной DIVA (различение между инфицированными и вакцинированными животными).

24. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктами 22 или 23 для применения согласно способу профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных, причем способ включает этап введения животному иммуногенной композиции в соответствии с пунктами 22 или 23.

25. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктами 22 или 23 для применения согласно способу профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных в соответствии с пунктами 22 или 23, причем вышеупомянутым животным является свинья.

26. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктами 22 или 23 для применения согласно способу профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных в соответствии с пунктами 22 или 23, причем вышеупомянутым животным является поросенок.

27. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктами 22 или 23 для применения согласно способу профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных в соответствии с пунктами 22 или 23, причем вышеупомянутым животным является поросенок в возрасте от 1 до 4 недель.

28. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктами 22 или 23 для применения согласно способу профилактики и/или лечения связанных с вирусом

КЧС заболеваний у животных в соответствии с пунктами 22 или 23, причем вышеупомянутым животным является свиноматка.

29. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктами 22 или 23 для применения согласно способу профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных в соответствии с пунктами 22 или 23, причем вышеупомянутым животным является беременная свиноматка.

30. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктами 22 или 23 для применения согласно способу профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных в соответствии с пунктами 22 или 23, причем вышеупомянутую иммуногенную композицию вводят только один раз.

31. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктами 22 или 23 для применения согласно способу профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных в соответствии с пунктами 22 или 23, причем вышеупомянутую иммуногенную композицию вводят животному только один раз, и она является эффективной для профилактики и/или лечения заболеваний, связанных с вирусом КЧС, после вышеупомянутого однократного введения иммуногенной композиции.

32. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктами 22 или 23 для применения согласно способу профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных в соответствии с пунктами 22 или 23, причем вышеупомянутую иммуногенную композицию вводят один или несколько раз.

33. Иммуногенная композиция в соответствии с пунктами 22 или 23 для применения согласно способу профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных в соответствии с пунктами 22 или 23, причем вышеупомянутую иммуногенную композицию вводят животному один или несколько раз, и она является эффективной для профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний после вышеупомянутого однократного или многократного введения иммуногенной композиции.

34. Способ профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных, причем способ включает этап введения иммуногенной композиции в соответствии с пунктами 22 или 23 животному, которое в этом нуждается.



35. Способ отличия животных, инфицированных вирусом КЧС, от животных, вакцинированных иммуногенной композицией по одному из пунктов 22 или 23, включающий

а) получение образца и

5 б) испытание вышеупомянутого образца в иммунотесте.

36. Способ в соответствии с пунктом 35, причем иммунотест включает тестирование с целью выяснения, способно ли антитело, специфически распознающее эпитоп 6В8 белка Е2 вируса КЧС, или его антигенсвязывающий фрагмент, связываться с белком Е2 вируса КЧС в образце.

10 37. Способ в соответствии с пунктом 35 или 36, причем иммунотест включает тестирование с целью выяснения, присутствует ли в образце антитело, специфически распознающее эпитоп 6В8 белка Е2 вируса КЧС, и/или тестирование с целью выяснения, присутствует ли в образце антитело, специфически распознающее мутированный эпитоп 6В8 рекомбинантного белка  
15 Е2 вируса КЧС.

38. Способ согласно одному или нескольким пунктам с 35 по 37, причем иммунотест представляет собой EIA (иммуноферментный анализ) или ELISA (твердофазный иммуносорбентный анализ), предпочтительно двойной конкурентный ELISA.

20 39. Способ согласно одному или нескольким пунктам с 36 по 38, причем антитело, специфически распознающее эпитоп 6В8,

(I) продуцируется гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120, или

25 (II) включает переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8, или

(III) включает CDR моноклонального антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120,  
30 или

(IV) включает  $V_H$  CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1,  $V_H$  CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 2,  $V_H$  CDR3, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3,

VL CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4, VL CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5, и VL CDR3, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6.

5 40. Комплект для отличия животных, инфицированных вирусом КЧС, от животных, вакцинированных иммуногенной композицией по одному из пунктов 22 или 23, который включает антитело, специфически распознающее эпитоп 6В8 белка Е2 вируса КЧС, или его антигенсвязывающий фрагмент.

41. Способ продуцирования рекомбинантного белка Е2 вируса КЧС  
10 согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 16, включающий

(I) культивирование клетки-хозяина по пункту 19 в условиях, подходящих для экспрессии белка Е2 вируса КЧС, и

(II) выделение и, необязательно, очистку белка Е2 вируса КЧС.

42. Способ продуцирования рекомбинантного белка Е2 вируса КЧС,  
15 предпочтительно рекомбинантного белка Е2 вируса КЧС, который включает одно или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7, или рекомбинантного белка Е2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 16, в клетках СНО, причем вышеупомянутый способ включает

а) адаптацию клеток СНО к высокоплотной суспензионной культуре, в  
20 среде;

б) трансфекцию адаптированных клеток СНО с этапа а) экспрессионным вектором млекопитающего, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок Е2 вируса КЧС, предпочтительно рекомбинантный белок Е2 вируса КЧС, который включает одно или несколько  
25 аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7, или рекомбинантный белок Е2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 16,

в) культивирование трансфицированных клеток СНО с этапа б) в условиях, подходящих для экспрессии рекомбинантного белка Е2 вируса КЧС;

30 г) сбор и необязательно очистку рекомбинантного белка Е2 вируса КЧС.

43. Способ продуцирования рекомбинантного белка Е2 вируса КЧС, предпочтительно рекомбинантного белка Е2 вируса КЧС, который включает одно или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7,

или рекомбинантного белка E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 16, в клетках СНО, причем вышеупомянутый способ включает

а) выращивание клеток СНО, адаптированных к высокоплотной суспензионной культуре, в среде;

5 б) трансфекцию клеток СНО с этапа а) экспрессионным вектором млекопитающего, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, предпочтительно рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, который включает одно или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7, или рекомбинантный белок E2  
10 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 16,

в) культивирование трансфицированных клеток СНО с этапа б) в условиях, подходящих для экспрессии рекомбинантного белка E2 вируса КЧС;

г) сбор и необязательно очистку рекомбинантного белка E2 вируса КЧС.

44. Способ по пунктам 42 или 43, причем на этапе в) трансфицированные  
15 клетки СНО культивируют при приблизительно 32 - 37 °С, предпочтительно приблизительно 32 °С.

45. Способ по одному из пунктов 42 - 44, причем на этапе в) трансфицированные клетки СНО культивируют в увлажненной атмосфере приблизительно 5 - 8 % CO<sub>2</sub>.

20 46. Способ по одному из пунктов 42 - 45, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС собирают приблизительно через 2 - 14 дней после трансфекции, например, приблизительно через 4 - 12 дней после трансфекции или приблизительно через 8 - 10 дней после трансфекции.

25 47. Способ по одному из пунктов 42 - 46, клетки СНО являются клетками ExpiCHO-S™, продаваемыми компанией Gibco как Cat# A29127.

48. Способ по одному из пунктов 44 - 47, средой, применяемой согласно способу, является экспрессионная среда ExpiCHO™, продаваемая компанией Gibco как Cat# A29100.

30 49. Способ по одному из пунктов 44 - 48, причем адаптированные клетки СНО трансфицируют с применением комплекта для трансфекции СНО ExpiFectamine™ (Gibco, Cat# A29129).

50. Способ по одному из пунктов 42 - 49, причем на этапе в) добавляют энхансер ExpiFectamine™ СНО и добавку ExpiCHO™ Feed.

51. Способ по одному из пунктов 42 - 50, причем белок E2 вируса КЧС подвергают дальнейшей очистке.

52. Способ по одному из пунктов 42 - 51, причем белок E2 вируса КЧС включает слитый пептид, и очистку белка E2 вируса КЧС осуществляют при помощи аффинности к матрице, которая специфически связывается со слитым пептидом.

53. Способ по одному из пунктов 42 - 52, причем белок E2 вируса КЧС включает His-метку в качестве слитого пептида, и белок E2 вируса КЧС очищают путем связывания белка E2 вируса КЧС через His-метку с Ni-NTA и отщепления белка E2 вируса КЧС от Ni-NTA.

54. Способ по одному из пунктов 42 - 52, причем белок E2 вируса КЧС включает FLAG-метку в качестве слитого пептида, и белок E2 вируса КЧС очищают путем связывания белка E2 вируса КЧС через FLAG-метку с моноклональным антителом, специфически связывающимся с FLAG-меткой, и отщепления белка E2 вируса КЧС от такого моноклонального антитела.

55. Способ по одному из пунктов 42 - 52, причем белок E2 вируса КЧС связывают с Fc-фрагментом и белок E2 вируса КЧС очищают путем связывания белка E2 вируса КЧС через Fc-фрагмент с белком А или белком G и отщепления белка E2 вируса КЧС от белка А или белка G.

## **Примеры**

Представленные ниже примеры дополнительно иллюстрируют типичные варианты осуществления изобретения. Подразумевается, что изобретение не ограничивается какими-либо из этих описанных ниже примеров. Специалисту в данной области станет понятно, что выполнение, результаты и выводы из этих примеров могут быть адаптированы и применены в более широком смысле с учетом общего описания изобретения.

### **Материалы и способы**

#### **1. Культура клеток**

Линию клеток sf9 культивировали в Excell 420 с 5 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) и инкубировали при 27 °C без CO<sub>2</sub>.

Линию клеток sf+ культивировали в Excell 420 и инкубировали при 27 °C в шейкере со скоростью 120 об/мин.

Линию клеток PK/WRL культивировали с 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) и инкубировали при 37 °C с 5 % CO<sub>2</sub>.

## **2. Построение челночных плазмид на основе pVL1393 для мутаций QZ07-E2 и QZ07-E2**

Последовательность QZ07-E2, QZ07-E2-KRD и последовательность QZ07-E2-KARD подвергали оптимизации кодонов (SEQ ID NO: 44 - 46, соответственно) и синтезировали в соответствии с экспрессионной системой насекомых. С целью получения растворимой и секретируемой формы белка E2 последние 43 аминокислоты (aa) E2 делетировали в конечной оптимизированной последовательности, а последние 21 аминокислоту из белка E1 добавляли в качестве сигнального пептида. Схематически экспрессируемая структура E2 представлена на Фигуре 1. Каждую из синтезируемых последовательностей клонировали в челночные плазмиды pVL1393 при помощи BamH I и EcoR I для завершения pVL1393-челночных плазмид для дальнейшей котрансфекции. Полностью процессы построения E2 вируса КЧС и E2 вируса КЧС с мутациями эпитопа 6B8 показаны на Фигуре 2. KARD означает мутации S14K, G22A и E24R/G25D, нумерация аминокислот относится к белку E2, например SEQ ID NO: 9. Другие комбинации мутаций, например, KRD (S14K и E24R/G25D) также вводили в белок E2, соответственно.

Синтезировали последовательность C-E2 и последовательность C-E2-KARD (SEQ ID NO: 47 и 48, соответственно). С целью получения растворимой и секретируемой формы белка E2 последние 42 аминокислоты (aa) E2 делетировали в конечной последовательности, а последние 16aa из белка E1 добавляли в качестве сигнального пептида. Схематически представленная экспрессируемая структура E2 была такая же, как показано на Фигуре 1. Каждую из синтезированных последовательностей клонировали в челночные плазмиды pVL1393 при помощи BamH I и EcoR I для завершения pVL1393-челночных плазмид для дальнейшей котрансфекции. Полностью процессы построения E2 вируса КЧС и E2 вируса КЧС с мутациями эпитопа 6B8 показаны на Фигуре 2. KARD означает мутации S14K, G22A, и G24R/G25D, нумерация аминокислот относится к белку E2, например, SEQ ID NO: 21.

## **3. Построение рекомбинантного бакуловируса с экспрессионной кассетой E2**

Одну лунку клеток SF9 ( $1.0 \times 10^6$ ) приготавливали в шестилуночном планшете для трансфекции, а другую лунку в качестве контроля. Клетки равномерно распределяли по поверхности после инкубации в течение 1 часа.

Смесь для трансфекции липоплексов ДНК приготавливали следующим образом: в одной пробирке смешивали 0,5 мл бессывороточной среды Грейса для клеток насекомых (без добавок) и добавляли 3 мкл челночного реагента для трансфекции ДНК; в другую пробирку добавляли 1 мкл сапфировой бакуловирусной ДНК, 1 мкг трансферной плазмиды и 0,5 мл бессывороточной среды Грейса для клеток насекомых (без добавок); содержание обеих пробирок комбинировали в одну, осторожно перемешивали и помещали в комнатную температуру на 20 минут. Среду из клеток удаляли и монослой дважды промывали, каждый раз с использованием 1 мл бессывороточной среды Грейса для клеток насекомых (без добавок), затем среду из клеток удаляли и добавляли смесь ДНК / реагента для трансфекции. Монослой клеток инкубировали в течение 4 - 5 часов при 27 °С и трансфекционную смесь заменяли на 2 мл Excell 420 с 5 % FBS. Инкубацию продолжали при 27 °С в течение 5 - 6 дней. Клетки и культуральную среду для клеток собирали путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С.

#### **4. Процесс очистки бляшек для рекомбинантного бакуловируса**

Шестилуночные планшеты с клетками sf9 ( $1,5 \times 10^6$  клеток/лунку) подготавливали и оставляли при комнатной температуре на 1 час. Приготавливали 10-кратные серийные разведения (50 мкл вируса и 450 мкл среды) каждого вируса, от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ . Культуральную среду для клеток удаляли из планшетов и 100 мкл вируса на лунку из разведений от  $10^{-3}$  до  $10^{-6}$  по капле добавляли в центр каждой чашки (на каждое разведение инфицировали две лунки). Затем планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Во время периода инкубации 1 % (масса/объем) LGT-агарозной среды приготавливали в водяной бане при 37 °С. Вирусный инокулят удаляли из каждой лунки и 2 мл 1 % (масса/объем) LGT-агарозной среды при помощи пипетки наносили верхним слоем в каждую лунку. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение приблизительно 15 мин до затвердения. Затем 1 мл культуральной среды для клеток насекомых добавляли в каждую лунку на верхний слой агарозы и инкубировали при 27 °С в течение 5 дней. Наконец, жидкий верхний слой удаляли и 1 мл Neutral Red (1: 20 со средой) добавляли в каждую лунку, инкубировали от 2 до 4 часов при 27 °С. Для осветления бляшек чашки оставляли в темноте в перевернутой позиция в течение 4 часов. Бляшки подсчитывали и вычисляли титр

вируса. Отдельные бляшки собирали пипеткой и растворяли в 200 мкл среды, которую хранили при 4 °С до распространения.

#### **5. Очистка белка E2**

300 мл супернатанта культуры центрифугировали с последующей  
5 фильтрацией. Фильтрованный супернатант инкубировали с никель-сефарозными шариками excel в течение 2 часов для захвата белка-мишени. Шарика промывали буфером PBS, pH 7,4, а затем промывали буфером, содержащим 20 mM, 50 mM, 80 mM имидазола, соответственно, окончательно элюировали буфером, содержащим 200 mM имидазола и 500 mM имидазола. SDS PAGE и вестерн-блоттинг выполняли  
10 для проверки чистоты и концентрации белка-мишени.

#### **6. Построение рекомбинантной плазмиды с экспрессионной кассетой E2 для QZ07-E2-Fc-WT и QZ07-E2-Fc-мутаций и экспрессии в клетках CHO**

Последовательность QZ07-E2-Fc-WT (слитого белка E2 вируса КЧС-F) и  
слитого белка E2 вируса КЧС-Fc с мутациями эпитопа 6B8 подвергали  
15 оптимизации кодона и синтезировали в соответствии с инструкцией для системы экспрессии CHO (система экспрессии ExpiCHO™, Thermo Fisher). С целью получения растворимой и секретируемой формы белка E2 последние 43 аминокислоты (aa) E2 делетировали в конечной оптимизированной последовательности, а последние 21 аминокислоту из белка E1 добавляли в  
20 качестве сигнального пептида. Пептидный линкер также добавляли между белком E2 и Fc-фрагментом. Аминокислотная последовательность QZ07-E2-Fc-WT (также указанная как “QZ07-E2-WT-FL-Fc”) была представлена как SEQ ID NO: 97. Каждую из синтезированных последовательностей клонировали в плазмиду pCDNA3.4. Полный процесс построения слитого белка E2 вируса КЧС-Fc и  
25 слитого белка E2 вируса КЧС-Fc с мутациями эпитопа 6B8 (такими как мутация в позиции 64) показан на Фигуре 2.

Трансфекцию и культивирование также осуществляли в соответствии с указаниями руководства для системы экспрессии ExpiCHO™ от Thermo Fisher.

В день перед трансфекцией (День -1) культуру ExpiCHO-ST™ расщепляли до  
30 конечной плотности  $3 \times 10^6 - 4 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл и клетки оставляли для роста до следующего дня. В день трансфекции (День 0) определяли плотность жизнеспособных клеток и процент жизнеспособности. Когда клетки достигали плотности приблизительно  $7 \times 10^6 - 10 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл при жизнеспособности 95 - 99 %, клетки разводили до конечной плотности  $6 \times 10^6$

жизнеспособных клеток/мл свежей экспрессионной средой ExpiCHO™. Колбы подвергали осторожному вихреванию для смешивания клеток. Приготавливали комплексы ExpiFectamine™ CHO / плазмидной ДНК с использованием холодных реагентов (4 °С). Реагенты, подвергавшиеся замораживанию, просто удаляли и начинали комплексообразование ДНК. Включали следующие этапы: а) осторожное переворачивание бутылки с реагентом ExpiFectamine™ CHO 4–5 раз для смешивания, б) разведение плазмидной ДНК с холодной средой OptiPRO™ и смешивание путем вихревания пробирки и/или путем переворачивания, в) разведение реагента ExpiFectamine™ CHO средой OptiPRO™, смешивание путем вихревания пробирки и/или путем переворачивания или осторожного добавления из пипетки 2 - 3 раза, смешивание путем вихревания пробирки или путем переворачивания, инкубирование комплексов ExpiFectamine™ CHO / плазмидной ДНК (с Этапа г) при комнатной температуре в течение 1 - 5 минут и с последующим медленным переносом раствора в колбу шейкера, с осторожным вихреванием колбы во время добавления. В День 1, день после трансфекции (День 1, 18 - 22 часов после трансфекции) энхансер ExpiFectamine™ CHO и добавку ExpiCHO™ добавляли в колбу (объем добавления в соответствии с инструкцией), с последующим осторожным вихреванием колбы во время добавления. Колбу переносили в инкубатор при 32 °С с увлажненной атмосферой 5 % CO<sub>2</sub> в воздухе со взбалтыванием и культивировали в течение 6 - 10 дней. Культуральную среду для клеток собирали путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С и супернатант собирали.

#### **7. Очистка слитого белка E2-Fc и слитого белка E2-Fc с мутациями эпитопа 6B8**

Очистку слитого белка E2-Fc и слитого белка E2-Fc с мутациями эпитопа 6B8 выполняли путем применения белка-А-агарозы от Thermo, соответственно. Раствор для очистки включает 1 М буфера Tris (pH 9,0). Процесс очистки включает этапы уравнивания белка-агарозы и всех буферов до комнатной температуры; осторожную набивку колонки 0,5 мл (для QZ07-E2-Fc-WT и мутаций QZ07-E2-Fc, таких как мутация в позиции 64) раствора смолы, в соответствии с инструкциями, предусмотренными с колонками; уравнивания колонки путем добавления 5 мл связывающего буфера и пропускания раствора самотеком через колонку; разведения образца 1:2 связывающим буфером перед подачей на колонку с белком А для поддержания надлежащей ионной силы и



уровня рН для оптимального связывания; подачи разведенного образца не колонку и его полного вливания в смолу; промывания колонки с белком А 10 мл связывающего буфера; элюирования антитела с 5 мл элюирующего буфера и сбора фракции; немедленного доведения элюированных фракций до физиологического уровня рН путем добавления 100 мкл нейтрализующего буфера к 1 мл элюата; переноса элюирования в центрифужные фильтры и добавления 6 мл PBS; помещения пробирки в центрифугу, 4000 об/мин в течение 15 мин; промывку пробирки с применением 10 мл PBS; повторения этапа центрифугирования для концентрирования образца в 1 - 2 мл; применения комплекта Qubit для измерения очищенных образцов с заменой буфера; и подтверждения продукта путем SDS-PAGE и вестерн-блоттинга.

### **Пример 1: Идентификация и включение сайтов DIVA**

Ключевой особенностью желаемой новой вакцины является то, что она позволяет отличать вакцинированного животного от инфицированного животного (DIVA). Особенность DIVA должна стать существенным улучшением по сравнению с традиционной субъединичной вакциной на основе E2 вируса КЧС и обладает важным техническим преимуществом. Стратегия включения особенности DIVA состоит в изменении одного или нескольких ключевых эпитопов на поверхности иммунного доминантного белка E2 и применении ELISA для демонстрации отсутствия антитела, распознающего эпитоп дикого типа, в качестве индикатора вакцинации (DIVA-отрицательный).

Для осуществления этой стратегии авторами изобретения было выбрано сильно нейтрализующее мышинное mAb 6B8. Гибридомы, продуцирующие моноклональное антитело 6B8, получали от Чжецзянского университета и депонировали под номером доступа CCTCC C2018120 в CCTCC (КИТАЙСКОЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ КОЛЛЕКЦИИ ТИПОВЫХ КУЛЬТУР) Уханьского университета, Wuhan 430072, P.R. China) 13 июня 2018 г. Секвенирование моноклонального антитела 6B8 обнаружило, что оно имеет переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи (VL), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8. CDR этого антитела легко поддаются определению различными способами, известными специалистам в данной области, таким как способ Кэбата. Например, mAb 6B8 включает VH CDR1 аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1, VH CDR2

аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 2, VH CDR3  
аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 3, VL CDR1  
аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 4, VL CDR2  
аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 5, и а VL CDR3  
5 аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 6.

#### 1. Характеризация mAb 6B8

Чтобы исследовать возможность применения mAb 6B8 для большинства  
вирусов КЧС, авторы изобретения испытали связывание mAb 6B8 с различными  
вирусами КЧС, такими как вирусы КЧС из Группы 1 (включая штамм Shimen и  
10 С-штамм) и из Группы 2 (включая QZ07 и GD18), с двумя ВД КРС в качестве  
контроля. Результаты были показаны на Фигуре 3. Дополнительные 8 изолятов  
полевого вируса КЧС из генотипа группы 2 также испытывали как положительные  
на mAb 6B8 (данные не показаны). Эти данные показали, что 6B8 распознает  
консервативный эпитоп, присутствующий на большинстве вирусов КЧС, при этом  
15 не реагируя с вирусами ВД КРС.

#### 2. Идентификация критически важных аминокислот для связывания 6B8

После серийного пассажа С-штамма вируса в культуре клеток РК/WRL в  
присутствии mAb 6B8 возникали "ускользнувшие" мутанты, способные расти в  
присутствии нейтрализующей концентрации антитела 6B8. Были получены  
20 четыре клона этих "ускользнувших" мутантов, и они все "ускользали" от  
связывания с 6B8. Их гены E2 секвенировали, и результаты секвенирования  
показывали две мутации нуклеотидов в двух кодонах (GGAGGT до AGAGAT).  
Эти изменения транслировались в две аминокислотных мутации в  
последовательных позициях 24 и 25 (Gly-Gly до Arg-Asp, или GG до RD).

25 Затем выполняли выравнивание последовательности E2 (QZ07, GD18, GD191  
и С-штамма) для сопоставления с ВД КРС и другим пестивирусным E2 для  
идентификации других потенциально критически важных аминокислот для  
связывания с 6B8 (Фигура 4). Такой подход позволял идентифицировать  
дополнительные потенциально критически важные аминокислоты, такие как  
30 аминокислоты в позиции 14 и позиции 22.

Все эти потенциальные мутации (S14K, G22A, E24R/G25D) вводили в  
экспрессионный вектор E2 по отдельности для испытания его влияния на  
связывание с 6B8. Ген E2 клонировали в вектор pCI-neo-Tag (Promega, cat#E1841)  
для генерирования экспрессионных векторов. После подтверждения правильной

экспрессии белка E2 все мутации вводили в экспрессионный вектор E2. Эти векторы затем трансфицировали в клетки PK/WRL с применением Lipofectamine3000 (Invitrogen, cat#L3000015) в 24-луночной планшете. Через 24 часа после трансфекции клетки фиксировали 4 % формальдегидом, а затем обрабатывали 0,1 % Triton X-100. Затем клетки окрашивают mAb 6B8 или поликлональным антителом кролика против вируса КЧС (применяемым в качестве положительного контроля для обнаружения вируса КЧС с модифицированными эпитопами 6B8) и соответствующим конъюгированным с Alexa Fluor®488 вторичным антителом (Invitrogen cat#21206) в IFA (иммунофлуоресцентном анализе). Как показано на Фигуре 5 А, микроскопическое исследование обнаружило, что мутации S14K, G22A, E24R/G25D являются критически важными для устранения связывания 6B8.

Авторами изобретения также было испытано влияние других мутаций в позициях 14, 22, 24 и 25 по отдельности на связывание с антителом 6B8. Как показано на Фигуре 5 Б, мутации S14Q, S14R и G22R полностью устраняли связывание 6B8, тогда как G22E, G22Q частично влияли на связывание 6B8, дополнительно указывая на то, что позиции 14 и 22 являются критически важными для связывания 6B8. Как показано на Фигуре 5 В, единичная мутация G24K (для С-штамма) полностью устраняла связывание 6B8, также подтверждая, что позиция 24 является ключевой для связывания 6B8. G25S отдельно не может устранить связывание 6B8. Однако, поскольку мутация Gly на Asp в позиции 25 возникает вместе с мутацией в позиции 24, таким образом, две мутации рассматривают как одну мутацию (мутацию 24/25).

Результаты показывают возможность использования что мутаций в позициях 14, 22, 24 и/или 24/25 для DIVA. Результаты также показывают, что мутация эпитопа 6B8 существенно не изменяет общую иммуногенность белка E2, поскольку мутированный белок E2 все равно распознается поликлональным антителом против вируса КЧС.

### **Пример 2: Построение бакуловирусной системы экспрессии**

Бакуловирусную систему экспрессии каждого конструкта устанавливали путем котрансфекции pV11393-QZ07-E2, QZ07-E2-KARD, QZ07-E2-KRD, С-E2 и С-E2-KARD с геномной ДНК бакуловируса в клетку sf9 при помощи коммерческого комплекта (сапфировой бакуловирусной ДНК и комплекта для трансфекции: Allele Biotech Cat# ABP-BVD-100029) и рекомбинантный

бакуловирус, содержащий экспрессионную кассету E2, очищали путем очистки  
бляшек на линии клеток Sf9. Трансфицированные клетки культивировали в  
6-луночных планшетах и инкубировали при 27 °С в течение 5 дней. Супернатант  
каждого трансфицированного образца собирали и хранили при 4 °С для  
5 дальнейшей очистки бляшек.

Затем проводили анализ очистки бляшек для супернатанта, собранного для  
каждого конструкта, как описано в способах выше. После двух циклов очистки  
успешно строили конечный рекомбинантный бакуловирус для каждой  
экспрессионной кассеты E2.

### 10 **Пример 3: Увеличение масштаба экспрессии и очистки E2 и E2-KARD или E2-KRD**

Рекомбинантный бакуловирус с экспрессионной кассетой QZ07-E2,  
QZ07-E2-KARD, QZ07-E2-KRD, C-E2 и C-E2-KARD амплифицировали путем  
инфекции линии клеток SF+ при MOI 5. 300 мл супернатанта, собранного из  
15 каждой инфицированной клетки SF+ применяли для очистки, как описано в  
способе.

Конечные продукты подтверждали при помощи SDS PAGE и  
вестерн-блоттинга. Очищенные E2 демонстрировали надлежащую молекулярную  
массу 110 кДа для димерной формы и 55 кДа для моноформы (Фигура 6А).

20 Дальнейший дот-блот-анализ показал отсутствие реакции очищенных  
QZ07-E2-KARD, QZ07-E2-KRD и C-E2-KARD с mAb 6B8 (Фигура 6Б), указывая  
на то, что каждая DIVA-форма E2 успешно очищается и приемлема для  
дальнейшего применения в качестве субъединичной вакцины. Результаты также  
показывают, что мутация эпитопа 6B8 существенно не изменяет общую  
25 иммуногенность белка E2, поскольку мутированный белок E2 по-прежнему  
распознается и свиной сывороткой в период выздоровления, и вакцинированной  
С-штаммом сывороткой.

### **Пример 4: Построение и очистка системы экспрессии рекомбинантной плазмиды - CHO**

30 Последовательность QZ07-E2-Fc-WT и QZ07-E2-Fc-мутации в позиции 64  
подвергали оптимизации кодона и синтезировали в соответствии с инструкциями  
для системы экспрессии CHO (ExpiCHO™ Expression System, Thermo Fisher). С  
целью получения растворимой и секретируемой формы белка E2 последние 43  
аминокислоты (aa) E2 делетировали в конечной оптимизированной

последовательности, а последние 21 аминокислоту из белка E1 добавляли в качестве сигнального пептида. Пептидный линкер также добавляли между белком E2 и Fc-фрагментом. Каждую синтезированную мутантную последовательность клонировали в плазмиду pCDNA3.4. Затем осуществляли трансфекцию и культивирование для каждого из конструкций, как описано выше в способах. В конце успешно собирали супернатант, содержащий каждый из конструкций.

Очистку слитого белка E2-Fc и слитого белка E2-Fc с мутацией эпитопа 6B8 в позиции 64 выполняли с использованием белка-A-агарозы от Thermo, соответственно. Процессы очистки выполняли, как описано выше в способах. Продукт очистки слитого белка E2-Fc подтверждали с применением SDS-PAGE и вестерн-блоттинга (Фигура 7). Продукт очистки слитого белка E2-Fc с мутацией эпитопа 6B8 в позиции 64 также подтверждали с применением SDS-PAGE и вестерн-блоттинга, и был продемонстрирован подобный результат для окрашивания WH303 и подобный результат для SDS-PAGE как для слитого белка E2-Fc, при этом с отрицательным результатом, продемонстрированным для окрашивания 6B8.

#### **Пример 5: Оценка эффективности E2 и E2-KARD**

Цель этого Примера состояла в оценке эффективности кандидатных субъединичных вакцин у поросят 3-недельного возраста.

Два IVP (исследуемых ветеринарных продукта), адъювантный С-E2 и С-E2-KARD, как представлено в Примере 2, подвергают оценке эффективности.

В общих чертах, всего 20 поросят (3-недельного возраста) распределяли по 4-м группам (Группы 1, 2, 3 и 4), и по 5 поросят в Группе 1 (С-E2) и Группе 2 (С-E2-KARD), использовали для теста IVP, тогда как другие 5 поросят в Группе 3 служили в качестве контроля антигенной стимуляции. Оставшиеся пять поросят в Группе 4 служили для строгого (отрицательного) контроля. В 0-й день животных в Группе 1 и 2 инокулировали с введением (IM) 2 мл Seppic ISA 206 адъювантного С-E2 (54,2 мкг/мл) или С-E2-KARD (55,2 мкг/мл) на поросенка, соответственно. Группа 3, которую инокулировали (IM) 2 мл PBS + Адъювант (Seppic ISA 206) в День 0, служила в качестве контроля антигенной стимуляции. Животных в группах 1, 2 и 3 инокулировали (IM) вирусом КЧС штамма Shimen в дозе  $\geq 10^5$  MLD/мл в День 21. Все поросята были клинически здоровы и не имели вируса КЧС и антител PRRSV и не имели антигена, включая ВД КРС, PRV, в День 0. Все животные были здоровы на момент иммунизации.

Данные ректальной температуры и клинических наблюдений собирали ежедневно с D21 по D37. Образцы сыворотки брали каждые 7 дней, начиная с Дня -7. В Дни 21, 24, 28, 31 и 37 (DPC 0, 3, 7, 10, 16) у всех животных брали образцы цельной крови и образец назального мазка.

## 5 **Температура тела**

Как показано на Фигуре 8, средняя температура тела в контрольной группе с антигенной стимуляцией (Группе 3) демонстрировала значительные колебания после антигенной стимуляции, со снижением температуры тела, когда свиньи находились при смерти. Температура тела в Группе 1 и Группе 2 поднималась в пределах нескольких дней (D2-D4) после антигенной стимуляции, но вскоре падала до уровня, подобного наблюдаемому в группе строгого контроля.

## **Лейкоцитарная формула**

Как показано на Фигуре 9, лейкоцитарная формула в контрольной группе с антигенной стимуляцией значительно снижалась после антигенной стимуляции, тогда как число лейкоцитов у животных вакцинированных групп после антигенной стимуляции незначительно снизилось, а затем повысилось.

## **Смертность**

Как показано на Фигуре 10, в контрольной группе с антигенной стимуляцией (Группа 3) все поросята погибли; в других группах никто из поросят не умер.

## 20 **Клинические наблюдения**

Клинические наблюдения состоят из оценки бодрости, напряжения тела (ощепенелость, судороги), формы тела (состояние тела, истощенная мускулатура), дыхания, походки, состояния кожи, внешнего вид конъюнктивы, аппетита и дефекации, как показано в Таблице 8. Нуль указывает на отсутствие клинических признаков, а повышенные клинические показатели указывают на повышенную степень тяжести клинических признаков. Если отдельные животные демонстрируют общие клинические показатели свыше 2 в 3 последовательных точках наблюдения, это рассматривают как связанные с КЧС клинические признаки.

## 30 **Таблица 8. Инструкция по клиническим показателям**

№	Параметры	Критерии	Балл
1	Бодрость	Животное внимательное (любопытное, сразу встает)	0
		Слегка сниженная (встает нерешительно, но без помощи)	1
		Животное уставшее, встает только при принуждении, снова ложится	2

		Животное сонливое, не встает	3
2	Напряжение тела	Расслабленное, ровная спина	0
		Оцепенелость и согнутая спина при вставании, затем нормализуется	1
		Согнутая спина и оцепенелая походка сохраняется	2
		Судороги	3
3	Форма тела	Полный живот, “круглое” тело	0
		Пустой живот	1
		Пустой живот, истощенная мускулатура тела	2
		Животное изнуренное, проступают позвоночник и ребра, размер головы слишком велик по сравнению с размером тела	3
4	Дыхание (оценивают до приближения к животному)	Частота 10 - 15/мин, движение грудной клетки едва заметно	0
		Частота > 20/мин	1
		Частота > 20/мин, явное движение грудной клетки	2
		Частота > 30/мин, дыхание через открытый рот	3
5	Походка	Хорошо скоординированные движения	0
		Неуверенная походка, заплетание ног корректируется медленно	1
		Явная атаксия / хромота задних ног, способность к хождению	2
		Общая хромота, неспособность к хождению	3
6	Кожа (в частности, уши, нос, ноги и хвост)	Равномерный розоватый цвет, шерстный покров ровный	0
		Покрасневшие участки кожи	1
		Фиолетовые и холодные участки кожи, расположенные несколькими пятнами	2
		Красно-черные участки кожи, отсутствие чувствительности, значительное кожное кровотечение	3
7	Глаза / конъюнктивa	Розоватый цвет	0
		Покраснение, прозрачная секреция	1
		Сильное воспаление, мутная секреция	2
		Сильное воспаление, гнойная секреция, выступающие кровеносные сосуды	3
8	Аппетит	Животное прожорливое, голодное	0
		При кормлении ест медленно	1
		При кормлении не ест, но пробует корм	2
		Совсем не ест, не проявляет интереса к еде	3
9	Дефекация	Мягкие экскременты, нормальное количество	0
		Сниженное количество экскрементов, сухие	1
		Малое количество сухих покрытых фибрином экскрементов или диарея	2
		Отсутствие экскрементов, слизь в прямой кишке, или водянистая или кровавая диарея	3

Как показано на Фигуре 11, средние клинические показатели контрольной группы с антигенной стимуляцией (Группа 3) неуклонно возрастали после антигенной стимуляции; средние клинические показатели Группы 1, Группы 2 и 5 Группы 4 во время исследования были нулевыми.

### Выделение вируса

Выделение вируса в цельной крови, назальном мазке и образцах миндалин определяли с применением стандартных способов, принятых в данной области. Результаты показаны ниже в Таблице 9. Все из собранных образцов из Группы 1 и Группы 2 были отрицательными на VI (выделение вируса).

Таблица 9.

Тип образца	Группы DPC0		DPC3		DPC7		DPC10		DPC16		Миндалины
	WB	NS	WB	NS	WB	NS	WB	NS	WB	NS	
1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3	0/5	0/5	5/5	0/5	2/2	2/2	2/2	1/2	0*	0	5/5

WB: цельная кровь; NS: назальный мазок; \*: поросята из Группы 3 погибли до DPC16.

### Серологическая реакция

Титры антител в образцах испытывали с применением IDEXX ELISA (номер по каталогу 99-43220). Как можно увидеть на Фигуре 12, титры антител в двух группах IVP были положительными (>40 %) в D21.

### ВЫВОД

После вакцинации двумя IVP свиньи были защищены, показатели смертности и заболеваемости во всех случаях были 0 %. В группах IVP не было обнаружено виремии или шилдинга, и ни одна из тканей миндалин не оказалась положительной на вирус КЧС. Образцы сыворотки в D21 все были положительными для двух групп IVP. Включение мутации DIVA (в эпитопе 6B8) не влияет на эффективность.

### Пример 7: Иммунофлуоресцентный анализ (IFA) для определения связывания mAb 6B8 с мутированным эпитопом 6B8

Связывание mAb 6B8 с мутированным эпитопом 6B8 (тестовый образец) определяют путем иммунофлуоресцентного анализа (IFA) в соответствии со следующими этапами:

1. В 96-луночный микротитровальный планшет высевают  $1,0 \times 10^6$  SF9 клеток/луноку, а затем инфицируют следующими рекомбинантными бакуловirusами при MOI 0,01, каждый в двух повторностях:



(I) Тестовый образец: рекомбинантный бакуловирус, экспрессирующий белок E2 с модифицированным эпитопом 6B8;

(II) Положительный контроль: рекомбинантный бакуловирус, экспрессирующий белок E2 с эпитопом 6B8 дикого типа;

5 (III) Отрицательный контроль: рекомбинантный бакуловирус, экспрессирующий белок E2 с мутацией KARD в пределах эпитопа 6B8, как описывается авторами.

Инфицированные бакуловирусом клетки держат в инкубаторе при приблизительно 27 °C в течение 5 дней.

10 2. Культуральную среду сливают и клетки промывают один раз 1xPBS (от 200 до 250 мкл/лунку).

3. В каждую лунку добавляют 100 мкл холодного метанола / ацетона (50:50) и инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин.

15 4. Фиксирующий раствор сливают в определенный контейнер для отходов и планшеты высушивают в течение 15 - 30 минут под вытяжным колпаком.

5. 6B8-специфичное mAb (такое как антитело, продуцируемое гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120), разводят PBS, содержащим 5 % BSA до 1:500 – 1:1000, затем добавляют в вышеупомянутые планшеты в количестве 50 мкл/лунку. Планшеты накрывают  
20 крышкой и инкубируют при 37 °C в течение 1 - 2 часов.

6. Аналитические планшеты трижды промывают 1x PBS (250 мкл/лунку).

7. Вторичное антитело, конъюгированное с Alexa Fluor®488 антитело осла против мыши, которое специфически связывается с антителом 6B8 (Invitrogen, cat#21202), разводят PBS, содержащим 5 % BSA в 400-кратном  
25 разведении, добавляют в аналитические планшеты в концентрации 50 мкл/лунку. Планшеты накрывают крышкой и инкубируют при 37 °C в течение 1 часа.

8. Аналитические планшеты трижды промывают 1xPBS (250 мкл/лунку). В конце добавляют 1xPBS, 100 мкл/лунку. Конечные сигналы флуоресценции считывают при помощи микроскопии с инвертированной флуоресценцией.

30 Отрицательный результат испытуемого образца в этом IFA (в обеих повторностях) показывает, что одна или несколько мутаций в пределах эпитопа 6B8 белка E2 ведут к специфическому ингибированию связывания моноклонального антитела 6B8 с таким мутированным эпитопом 6B8.

**Пример 8: Дот-блот-анализ для определения связывания mAb 6B8 с мутированным эпитопом 6B8**

Связывание mAb 6B8 с мутированным эпитопом 6B8 (тестовый образец) определяют путем дот-блот-анализа в соответствии со следующими этапами:

- 5 1. 1 - 5 мкг каждого очищенного белка, разведенного в PBS, наносят на NC-мембрану (Pall, cat#66485), высушивают на воздухе под вытяжным колпаком в течение 30 мин или дольше
  - (I) Тестовый образец: рекомбинантный бакуловирус, экспрессирующий белок E2 с модифицированным эпитопом 6B8;
  - 10 (II) Положительный контроль: рекомбинантный бакуловирус, экспрессирующий белок E2 с эпитопом 6B8 дикого типа;
2. Мембраны блокируют блокирующим раствором (5 % обезжиренного молока в PBST) при комнатной температуре в течение 1 часа.
3. Специфичное к 6B8 mAb (такое как антитело, продуцированное гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120) разводят PBST, содержащим 5 % обезжиренного молока, до 1:800 – 1:1000, затем добавляют к каждой дот-мембране для 10 мл/мембрану. Мембраны плотно накрывают крышкой и инкубируют при 37 °С в течение 1 - 2 часов.
- 15 4. Первичное антитело сливают и каждую мембрану трижды промывают 3\* PBST.
- 20 5. Вторичное антитело, конъюгированное с HRP антитело против мыши (Bio-Rad, STAR117P), которое специфически связывается с антителом 6B8, разводят PBST, содержащим 5 % обезжиренного молока в 2000-кратном разведении, добавляют к каждой дот-мембране для 10 мл/мембрану. Мембраны
- 25 6. Вторичное антитело сливают и каждую мембрану трижды промывают 3 \* PBST.
7. Блот-сигнал каждой мембраны проявляют при помощи 1 - 5 мл комплекта super signal (Thermo, cat#34080) при комнатной температуре.
- 30 8. Время проявления составляет 1 - 10 с и изображение получают при помощи chemdoc (Bio-Rad).

Отрицательный результат тестового образца в этом дот-блоте указывает на то, что одна или несколько мутаций в пределах эпитопа 6B8 белка E2 ведут к

специфическому ингибированию связывания моноклонального антитела 6В8 с таким мутированным эпитопом 6В8.

**Пример 9: Сравнение экспрессии белка E2 в системе CHO и бакуловиральной системе**

5 QZ07-E2 подвергали оптимизации кодона (с применением алгоритма OptimumGene™) (кодон-оптимизированная последовательность QZ07-E2 показана в SEQ ID NO: 82) и синтезировали в соответствии с экспрессирующей клетки CHO системой экспрессии (система экспрессии ExpiCHO™, Gibco, Cat# A29133). С целью получения растворимой и секретируемой формы белка E2  
10 последние 43 аминокислоты (aa) E2 делетировали в конечной оптимизированной последовательности, а последние 21 аминокислоту из белка E1 добавляли в качестве сигнального пептида. Синтезированную последовательность клонировали в плазмиды pcDNA3.4.

Клетки ExpiCHO-S™ (Gibco, Cat# A29127, которая является клональной  
15 производной линии клеток CHO-S) адаптировали к высокоплотной суспензионной культуре в экспрессионной среде ExpiCHO™ (Gibco, Cat# A2910001). Трансфекцию рекомбинантных плазмид pcDNA3.4 выполняли в соответствии с инструкцией для комплекта для трансфекции CHO ExpiFectamine™ (Gibco, Cat# A29129). Экспрессию выполняли в соответствии с руководством для пользователя  
20 системы экспрессии ExpiCHO™ (Revision D.0, 25 мая 2018 г., Thermo Fisher Scientific Inc), с применением способа ExpiCHO™ Feed (High Titer).

Так, клетки ExpiCHO-S™ инокулировали в конечной плотности  $6 \times 10^6$  жизнеспособных клеток / мл в колбе со свежей экспрессионной средой ExpiCHO, предварительно нагретой до 37 °С. Колбу осторожно подвергали вихреванию для  
25 смешивания клеток. Плазмидную ДНК разводили холодной средой OptiPRO Medium и реагент ExpiCHO Fectamine CHO Reagent разводили холодной средой OptiPRO. Затем их смешивали и комплексы реагента ExpiFectamine CHO / плазмидной ДНК инкубировали при комнатной температуре в течение 2 мин. Затем раствор медленно переносили в колбу шейкера с вихреванием колбы во  
30 время добавления. На следующий день после трансфекции добавляли энхансер ExpiFectamine CHO и добавку ExpiCHO при осторожном вихревании колбы во время добавления. Колбу помещали в инкубатор при 32 °С с увлажненной атмосферой 5 % CO<sub>2</sub> в воздухе на орбитальном шейкере, 125 ± 5 об/мин.

Супернатант и клетки разделяли путем центрифугирования и собирали при D4-D10 после трансфекции.

Результаты экспрессии QZ07-E2 в клетках CHO по сравнению с экспрессией в BEVS (экспрессирующей бакуловирусной векторной системе, см. выше) показаны на Фигуре 13. Выход E2 в системе экспрессии CHO выше (приблизительно 1 мг/мл) по сравнению с системой BEVS (приблизительно 10 мкг/мл).

Испытывали эффективность белков E2, экспрессируемых в клетках CHO и в BEVS. В частности, 50 мкг неочищенного CHO-экспрессируемого E2 и 50 мкг очищенного BEVS-экспрессируемого E2 однократно вводили (IM) свиньям (n=10 свиней/группу). Испытывали антитела КЧС в сыворотке на 21 день после вакцинации. Результаты показаны на Фигуре 14. Как можно увидеть, экспрессируемый CHO E2 сохраняет свою иммуногенность у свиней.

**Пример 10: Идентификация дополнительных критически важных остатков для связывания 6B8 в белке E2**

В этом Примере аминокислотные позиции 10, 41 и 64 в E2 идентифицировали как дополнительные ключевые остатки для связывания mAb 6B8.

Мутантные белки QZ07-E2, содержащие Y10A, Y10P, D41A, D41N, D41E, R64A, R64S или R64E (аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 74 - 81, соответственно; кодон-оптимизированные кодирующие последовательности, показанные в SEQ ID NO: 83 - 90, соответственно) соответственно экспрессировали в клетках CHO (согласно способу, описанному в предыдущем Примере) и подвергали испытанию с применением IFA (иммунофлуоресцентного анализа) (согласно способу, описанному в предыдущем Примере). Результаты показаны на Фигуре 15. Замещения Y10A, Y10P, D41A, D41N, D41E, R64A, R64S и R64E способны ингибировать связывание mAb 6B8 соответственно, указывая на то, что эти мутации также пригодны для применения в DIVA.

Экспрессию мутантных белков QZ07-E2, содержащих Y10A, Y10P, D41A, D41N, D41E, R64A, R64S или R64E, обнаруживали путем вестерн-блоттинга. Результаты показаны на Фигуре 16. Мутации R64A и R64S лишь слегка влияли на секрецию белковой экспрессии в системе клеток CHO. Таким образом, дополнительную мутацию на остатке 64 комбинируют с KARD для оценки экспрессии и эффективности.

**Пример 11: Идентификация дополнительных критически важных аминокислот для ингибирования связывания белка E2 6B8**

В этом Примере дополнительные мутации в аминокислотных позициях 22, 24, 25 и 64 в E2 были идентифицированы как критически важные для ингибирования связывания mAb 6B8.

Мутантные белки QZ07-E2, содержащие различные мутации в позициях 22, 24, 25 и 64, соответственно, экспрессировали в клетках CHO (согласно способу, описанному в предыдущем Примере) и подвергали испытанию с применением IFA (иммунофлуоресцентного анализа) (согласно способу, описанному в предыдущем Примере). Экспрессию мутантных белков QZ07-E2, содержащих различные мутации в позициях 22, 24, 25 и 64, соответственно, обнаруживали при помощи вестерн-блоттинга. Некоторые мутанты, включая мутант QZ07-E2-Fc-R64D, мутант QZ07-E2-Fc-R64H, мутант QZ07-E2-Fc-R64T, мутант QZ07-E2-Fc-R64G и мутант QZ07-E2-Fc-R64K, приготавливали путем дальнейшего связывания С-конца мутанта E2 с Fc-фрагментом для усиления экспрессии белка. Способ получения мутантных белков QZ07-E2-Fc представлен в предыдущих примерах. Результаты показаны на Фигурах 17 - 20.

Для аминокислотной позиции 22 кандидатными замещениями являются G22A, G22Q, G22D, G22E, G22N и G22S в отношении как выхода, так и реактивности с mAb 6B8.

Для аминокислотной позиции 24 G24R по-прежнему обладает слабой реактивностью с mAb 6B8. Мутанты G24D и G24I не способны реагировать с mAb 6B8, хотя выход является низким.

Для аминокислотной позиции 25 кандидатными замещениями являются G25D, G25K, G25L, G25N, G25R, G25T и G25V в отношении как выхода, так и реактивности с mAb 6B8.

Для аминокислотной позиции 26 кандидатными мутантами являются R64A, R64K и R64W в отношении как выхода, так и реактивности с mAb 6B8.

**Пример 12: Оценка эффективности мутантных белков E2**

Белки E2 с одной или несколькими мутациями в позиции 10, 14, 22, 24, 24/25, 41 или 64 экспрессируют в клетках CHO согласно способу, применяемому в предыдущем Примере. В общих чертах, кодон-оптимизированные последовательности, кодирующие мутантные белки E2, клонируют в вектор pсDNA3.4; полученные конструкторы трансфицируют, соответственно, в клетки

ExpiCHO-S™ (Gibico, Cat# A29127), которые были адаптированы к высокоплотной суспензионной культуре в экспрессионной среде ExpiCHO™ (Gibico, Cat# A2910001); белки собирают приблизительно через 2 - 14 дней после трансфекции.

5 Эффективность экспрессированных мутантных белков E2 оценивают согласно способу, описанному в предыдущем Примере. В общих чертах, поросят (3-недельного возраста) зачисляют в разные испытательные группы IVP (в соответствии с тестируемым мутантным белком E2), контрольную группу с антигенной стимуляцией и группу строгого (отрицательного) контроля. В День 0  
10 животных в испытательных группах IVP инокулируют (IM) с введением 2 мл адьювантных (Seppic ISA 206) мутантных белков E2 (приблизительно 50 мкг/мл), соответственно. Животных в контрольной группе с антигенной стимуляцией инокулируют (IM) с введением PBS + адьюванта (Seppic ISA 206) в День 0. Животных в испытательных группах IVP и контрольной группе с антигенной  
15 стимуляцией инокулируют (IM) вирусом КЧС штамма Shimen в дозе  $\geq 10^5$  MLD/ил в День 21. Данные ректальной температуры и клинических наблюдений собирают ежедневно с D21 по D37. Образцы сыворотки собирают каждые 7 дней, начиная с Дня -7. В Дни 21, 24, 28, 31 и 37 (DPC 0, 3, 7, 10, 16) у всех животных собирают образцы цельной крови и назальных мазков. Температуру тела, лейкоцитарную  
20 формулу, смертность, клинические показатели, перечисленные в Таблице 8, выделение вируса и серологическую реакцию анализируют для оценки эффективности.

Экспрессия в клетках CHO или введение дополнительной(ых) мутации(й) в эпитопе 6V8 не имеет неблагоприятного влияния на эффективность.

25

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок E2 рекомбинантного вируса КЧС (вируса классической чумы свиней), включающий по меньшей мере одну мутацию в пределах эпитопа 6B8 в аминокислотной позиции 10, 41 или 64 белка E2, причем немодифицированный эпитоп 6B8 специфически распознается моноклональным антителом 6B8.

2. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по п. 1, причем по меньшей мере одна мутация в пределах эпитопа 6B8 белка E2 ведет к специфическому ингибированию связывания моноклонального антитела 6B8 с таким мутированным эпитопом 6B8.

3. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по пп. 1 или 2, причем моноклональное антитело 6B8

(I) продуцируется гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120, или

(II) включает переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7 и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8, или

(III) включает CDR моноклонального антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120, или

(IV) включает  $V_H$  CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1,  $V_H$  CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 2,  $V_H$  CDR3, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3,  $V_L$  CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4,  $V_L$  CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5, и  $V_L$  CDR3, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6.

4. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 3, причем эпитоп 6B8 белка E2, который специфически распознается

моноклональным антителом 6B8, определяется по меньшей мере аминокислотным остатком в позиции 14, позиции 22, позиции 24, позициях 24/25, позиции 10, позиции 41 и/или позиции 64 белка E2.

5            5.    Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 3, причем эпитоп 6B8 белка E2, который специфически распознается моноклональным антителом 6B8, определяется по меньшей мере аминокислотным остатком S14, G22, E24, E24/G25, Y10, D41 и/или R64 белка E2, или определяется по меньшей мере аминокислотным остатком S14, G22, G24, G24/G25, Y10, D41  
10 и/или R64 белка E2.

              6.    Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 5, который включает замещение в аминокислотной позиции 24 белка E2, замещение в аминокислотных позициях 24/25 белка E2,  
15 замещение в аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 22 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение в аминокислотной позиции 41 белка E2, и/или а замещение в аминокислотной позиции 64 белка E2.

20            7.    Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 6, в котором аминокислота в позиции 24 белка E2 замещена R, D или I, причем предпочтение отдают R, аминокислота в позициях 24 и 25 белка E2 замещена R, D или I, причем предпочтение отдают R, и D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V, соответственно, аминокислота в  
25 позиции 14 белка E2 замещена K, Q или R, аминокислота в позиции 22 белка E2 замещена A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S, аминокислота в позиции 10 белка E2 замещена A или P аминокислота в позиции 41 белка E2 замещена A, N или E, и/или аминокислота в позиции 64 белка E2 замещена A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают  
30 A, K и W.

              8.    Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС согласно одному или нескольким пунктам с 1 по 7, который включает замещение E или G на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 белка E2,



замещение E или G на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 и G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25 белка E2, замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2, замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, замещение Y на A или P в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение D на A, N или E в аминокислотной позиции 41 белка E2, и/или замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W в аминокислотной позиции 64

5  
10

белка E2.

9. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 8, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит из С-штамма или полевого штамма QZ07 или GD18.

15

10. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 9, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит из полевого штамма QZ07 и включает замещение E на R, D или I, причем предпочтение отдают R, в аминокислотной позиции 24 белка E2, или замещение E на R, D или I, причем предпочтение отдают R, в аминокислотной позиции 24, и G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T или V, в аминокислотной позиции 25 белка E2, необязательно включает замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2 или замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S, в аминокислотной позиции 22 белка E2, и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения Y на A или P в аминокислотной позиции 10

20  
25

белка E2, замещение D на A, N или E в аминокислотной позиции 41 белка E2, и/или замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W, в аминокислотной позиции 64 белка E2.

11. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 9, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит из полевого штамма GD18 и включает замещение E на R, D или I, причем предпочтение отдают R, в аминокислотной позиции 24 белка E2, или замещение E на R, D или I, причем

30

предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24, и G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25 белка E2, и необязательно включает замещение S на K, Q или R в аминокислотной позиции 14 белка E2 или замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, и по меньшей мере еще одно замещение, выбранное из группы, состоящей из замещения Y на A или P в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение D на A, N или E в аминокислотной позиции 41 белка E2, и/или замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W в аминокислотной позиции 64 белка E2.

12. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 9, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС происходит из С-штамма и включает замещение G на R, D или I, причем предпочтение отдают R в аминокислотной позиции 24 белка E2, и замещение G на D, K, L, N, R, T, V, E или P, причем предпочтение отдают D, K, L, N, R, T и V в аминокислотной позиции 25 белка E2, и необязательно также включает замещение S на K в аминокислотной позиции 14 белка E2 или замещение G на A, R, Q, E, D, N, K, L, P, T, V или S, причем предпочтение отдают A, Q, D, E, N и S в аминокислотной позиции 22 белка E2, замещение Y на A или P в аминокислотной позиции 10 белка E2, замещение D на A, N или E в аминокислотной позиции 41 белка E2 и/или замещение R на A, S, E, D, G, H, T, L, P, K или W, причем предпочтение отдают A, K и W, в аминокислотной позиции 64 белка E2.

13. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 9, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС включает одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 - 20, 22 - 33, 35 - 40, 49 - 72 и 74 - 81.

14. Рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 13, причем Fc-фрагмент, такой как Fc-фрагмент свиньи связан с рекомбинантным белком E2 вируса КЧС; предпочтительно Fc-фрагмент, такой как Fc-фрагмент свиньи, связан с С-концом белка E2, предпочтительно через пептидный линкер.

15. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 14.

16. Вектор, включающий нуклеиновую кислоту по п. 15.

5

17. Клетка-хозяин, включающая нуклеиновую кислоту по п. 15 или вектор по п. 16, причем предпочтительно клетка-хозяин является клеткой млекопитающего, такой как клетка СНО.

10 18. Способ продуцирования рекомбинантного белка E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 14, включающий

(I) культивирование клетки-хозяина по пункту 19 в условиях, подходящих для экспрессии белка E2 вируса КЧС, и

(II) выделение и, необязательно, очистку белка E2 вируса КЧС.

15

19. Рекомбинантный вирус КЧС (вирус классической чумы свиней), включающий рекомбинантный белок E2 по одному из пунктов с 1 по 14.

20 20. Рекомбинантный вирус КЧС по п. 19, причем рекомбинантный вирус КЧС является аттенуированным.

25 21. Иммуногенная композиция, включающая рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 14, рекомбинантную нуклеиновую кислоту по п. 15, вектор по п. 16 и/или рекомбинантный вирус КЧС по пп. 19 или 20.

30 22. Иммуногенная композиция по п. 21, причем вышеупомянутая иммуногенная композиция является вакциной, такой как маркерная вакцина или вакцина DIVA (различение между инфицированными и вакцинированными животными).

23. Иммуногенная композиция по пп. 21 или 22 для применения согласно способу профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у

животных, причем способ включает этап введения иммуногенной композиции по пп. 21 или 22 животному, которое в этом нуждается.

24. Способ профилактики и/или лечения связанных с вирусом КЧС заболеваний у животных, причем способ включает этап введения иммуногенной композиции по пп. 21 или 22 животному, которое в этом нуждается.

25. Способ отличия животных, инфицированных вирусом КЧС, от животных, вакцинированных иммуногенной композицией по одному из пунктов 21 или 22, включающий

- а) получение образца и
- б) испытание вышеупомянутого образца в иммунотесте.

26. Способ по п. 25, причем иммунотест включает тестирование с целью выяснения, способно ли антитело, специфически распознающее эпитоп 6В8 белка Е2 вируса КЧС, или его антигенсвязывающий фрагмент, связываться с белком Е2 вируса КЧС в образце.

27. Способ по пп. 25 или 26, причем иммунотест включает тестирование с целью выяснения, присутствует ли в образце антитело, специфически распознающее эпитоп 6В8 белка Е2 вируса КЧС, и/или тестирование с целью выяснения, присутствует ли в образце антитело, специфически распознающее мутированный эпитоп 6В8 рекомбинантного белка Е2 вируса КЧС.

28. Способ по одному из пунктов с 25 по 27, причем иммунотест представляет собой EIA (иммуноферментный анализ) или ELISA (твердофазный иммуносорбентный анализ), предпочтительно двойной конкурентный ELISA.

29. Способ по одному из пунктов с 26 по 28, причем антитело, специфически распознающее эпитоп 6В8,

(I) продуцируется гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120, или

(II) включает переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7, и

вариабельную область легкой цепи ( $V_L$ ), имеющую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8, или

(III) включает CDR моноклонального антитела, продуцируемого гибридомой, депонированной в ССТСС под номером доступа ССТСС С2018120,  
5 или

(IV) включает VH CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1, VH CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 2, VH CDR3, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3,  
10 VL CDR1, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4, VL CDR2, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5, и VL CDR3, включающую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6.

15 30. Комплект для отличия животных, инфицированных вирусом КЧС, от животных, вакцинированных иммуногенной композицией по одному из пунктов 21 или 22, который включает антитело, специфически распознающее эпитоп 6B8 белка E2 вируса КЧС, или его антигенсвязывающий фрагмент.

20 31. Способ продуцирования рекомбинантного белка E2 вируса КЧС, предпочтительно рекомбинантного белка E2 вируса КЧС, который включает одно или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7, или рекомбинантного белка E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 14, в клетках СНО, причем вышеупомянутый способ включает

25 а) адаптацию клеток СНО к высокоплотной суспензионной культуре, в среде;

б) трансфекцию адаптированных клеток СНО с этапа а) экспрессионным вектором млекопитающего, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, предпочтительно  
30 рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, который включает одно или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7, или рекомбинантный белок E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 14,

в) культивирование трансфицированных клеток СНО с этапа б) в условиях, подходящих для экспрессии рекомбинантного белка E2 вируса КЧС;

г) сбор и необязательно очистку рекомбинантного белка E2 вируса КЧС.

32. Способ продуцирования рекомбинантного белка E2 вируса КЧС, предпочтительно рекомбинантного белка E2 вируса КЧС, который включает одно  
5 или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7, или рекомбинантного белка E2 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 14, в клетках СНО, причем вышеупомянутый способ включает

а) выращивание клеток СНО, адаптированных к высокоплотной суспензионной культуре, в среде;

10 б) трансфекцию клеток СНО с этапа а) экспрессионным вектором млекопитающего, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, предпочтительно рекомбинантный белок E2 вируса КЧС, который включает одно или несколько аминокислотных замещений, как определено в таблицах с 1 по 7, или рекомбинантный белок E2  
15 вируса КЧС по одному из пунктов с 1 по 14,

в) культивирование трансфицированных клеток СНО с этапа б) в условиях, подходящих для экспрессии рекомбинантного белка E2 вируса КЧС;

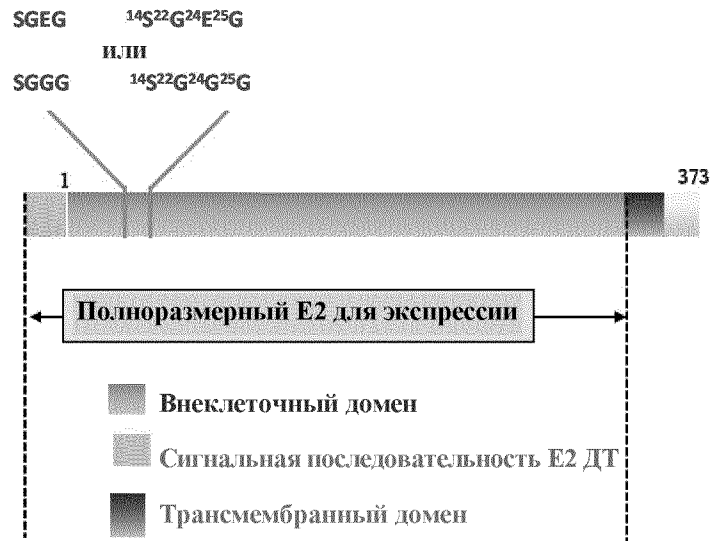
г) сбор и необязательно очистку рекомбинантного белка E2 вируса КЧС.

20 33. Способ по пп. 31 или 32, причем на этапе в) трансфицированные клетки СНО культивируют при приблизительно 32 - 37 °С, предпочтительно приблизительно 32 °С.

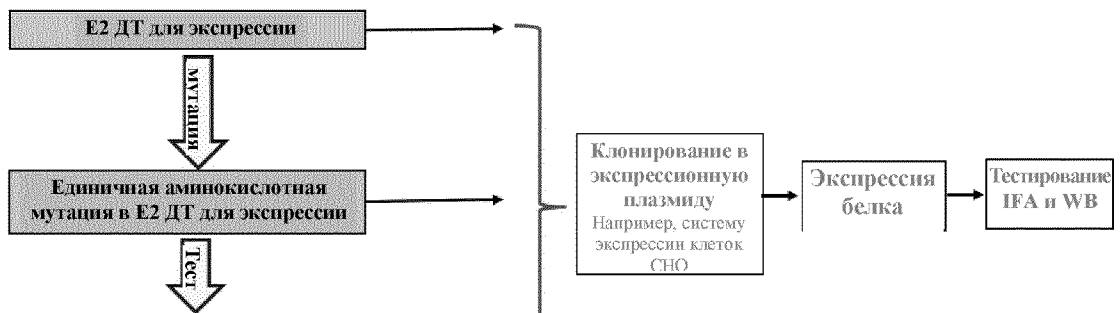
25 33. Способ по одному из пунктов с 31 по 32, причем на этапе в) трансфицированные клетки СНО культивируют в увлажненной атмосфере приблизительно 5 - 8 % CO<sub>2</sub>.

34. Способ по одному из пунктов с 31 по 33, причем рекомбинантный белок E2 вируса КЧС собирают приблизительно через 2 - 14 дней после трансфекции,  
30 например, приблизительно через 4 - 12 дней после трансфекции или приблизительно через 8 - 10 дней после трансфекции.

6B8 – конформационный эпитоп



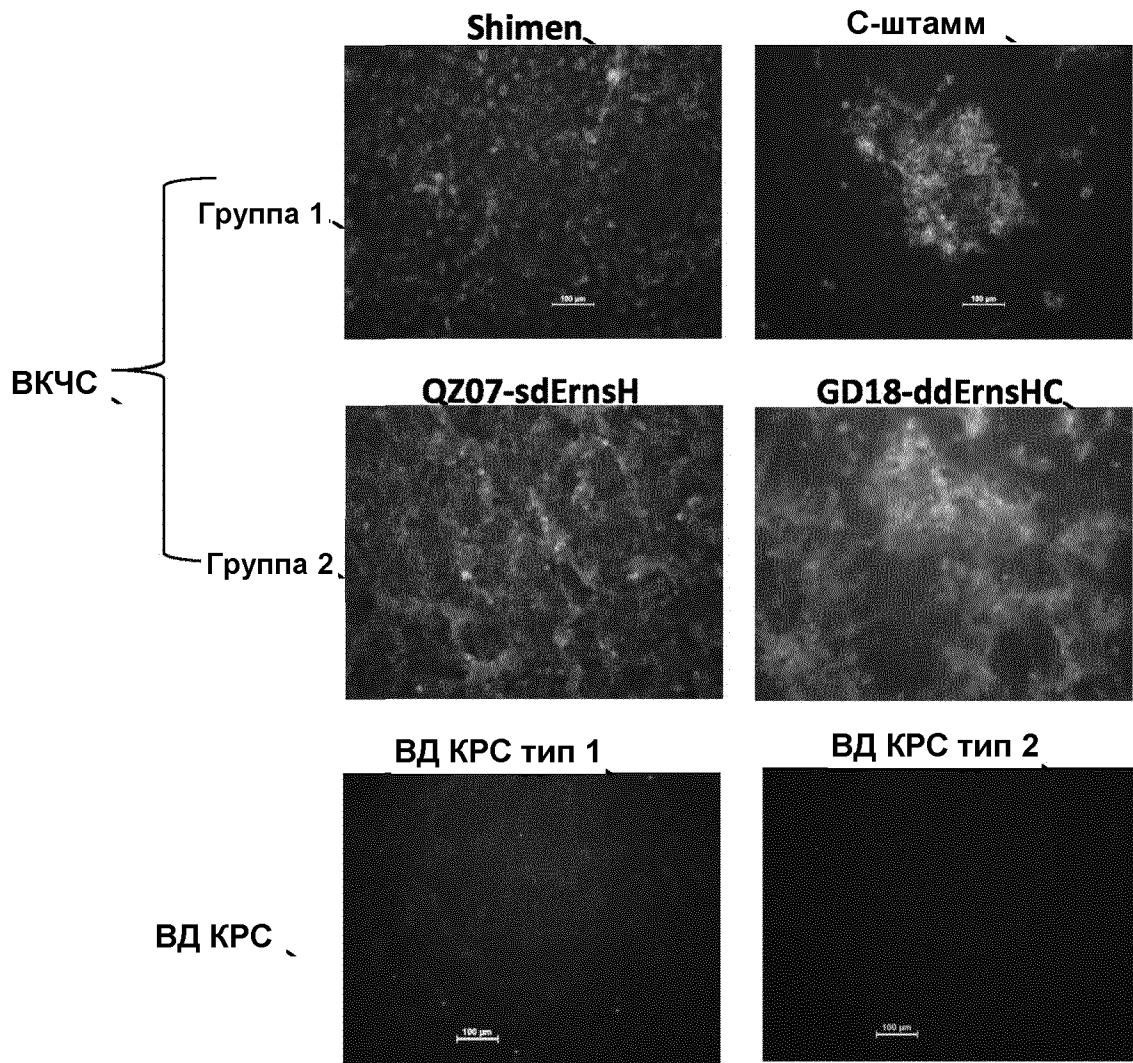
ФИГ. 1



Y10	S14	G22	E/G24	G25	D41	R64
QZ-E2-Y10A	C-E2-S14K	QZ-E2-G22A	QZ-E2-E24R	<u>QZ-E2-G25A</u>	QZ-E2-D41A	QZ-E2-R64E-F6
QZ-E2-Y10P	C-E2-S14Q	QZ-E2-G22D	QZ-E2-E24A	<u>QZ-E2-G25D</u>	QZ-E2-D41N	QZ-E2-R64C-F6
	C-E2-S14R	QZ-E2-G22E	QZ-E2-E24D	QZ-E2-G25E	QZ-E2-D41E	QZ-E2-R64I-F6
		QZ-E2-G22K	QZ-E2-E24I	QZ-E2-G25K		QZ-E2-R64R-F6
		QZ-E2-G22L	QZ-E2-E24K	QZ-E2-G25L		QZ-E2-R64I-F6
		QZ-E2-G22N	QZ-E2-E24P	QZ-E2-G25N		QZ-E2-R64W-F6
		QZ-E2-G22P	QZ-E2-E24S	QZ-E2-G25P		QZ-E2-R64I-F6
		C-E2-G22Q	QZ-E2-E24T	QZ-E2-G25R		QZ-E2-R64F-F6
		QZ-E2-G22R	QZ-E2-E24V	C-E2-G25S		QZ-E2-R64A
		QZ-E2-G22S	C-E2-G24K	QZ-E2-G25T		QZ-E2-R64E
		QZ-E2-G22T		QZ-E2-G25V		QZ-E2-R64S
		QZ-E2-G22V				

Подчеркивание означает отсутствие влияния на распознавание mAb 6B8  
Выделение означает значительное влияние на распознавание mAb 6B8

ФИГ. 2



ФИГ. 3



## S14-G22-E/G24-G25

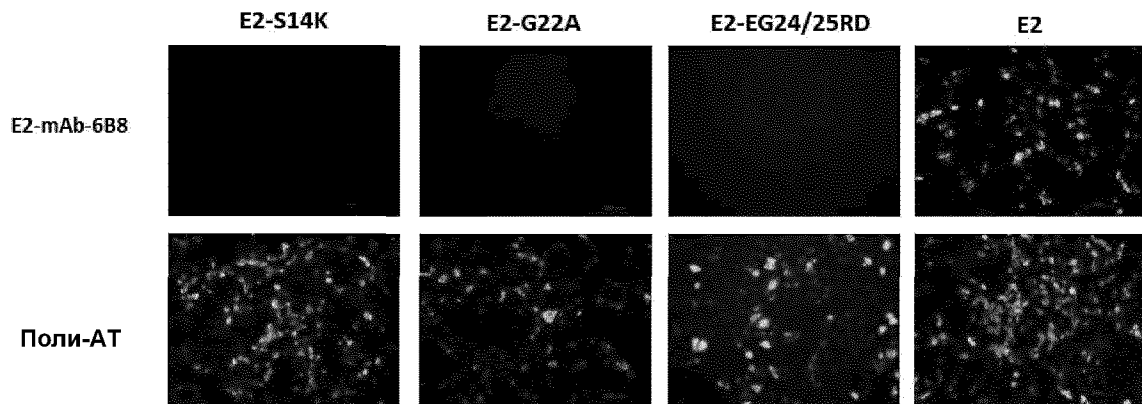
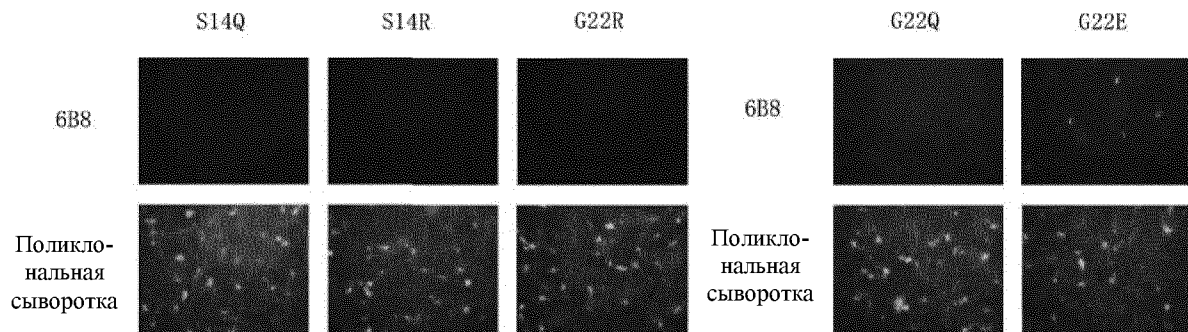
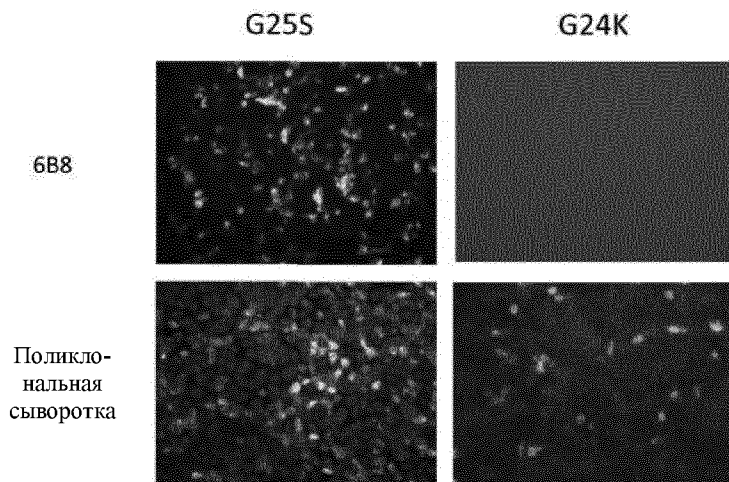
Sequence Name	< Pos = 817
<input checked="" type="checkbox"/> Consensus	--XLTCKPDYRYAIAKTXSIGPLGABG---LTTTWYEYSDGMQLTDGTVRVTCKNGS--
23 Sequences	820 830 840 850 860 870
qz07-e2. apr. pro	--RLSCKEDYRYAISTNEIGPLGABG---LTTTWKEYNHGLQLDDGTVRAICTAGS--
gd191. pro	--RLSCKEDYRYAISTNEIGPLGABG---LTTTWKEYNHGLQLDDGTVRAICTAGS--
gd18. pro	--RLTCKEDYRYAISTNEIGPLGABG---LTTTWKEYNHGLQLDDGTVRATCTAGS--
c-e2. pro	--RLACKEDYRYAISTDEIGLLGAGG---LTTTWKEYNHDLQLNDGTVKASCVAGS--
AAM88294. pro	--YPDCKPGFLYAIARNEKIGLLGABG---LTTTWHEYSAKMRLKDTMVKVVWCKEGQF
AEW46241. 1. pro	--IPBCRPDYSYAIARSEKIGLLGABD---LTTQWYDYSDCMQLLEDGMVVRVWCNKG-
AEW46241. pro	--IPBCRPDYSYAIARSEKIGLLGABD---LTTQWYDYSDCMQLLEDGMVVRVWCNKG-
AFC37640. pro	--YPDCKPDFSYAIAKNDEIGPLGATG---LTTQWYEYSDGMRLQDSTVEIWCKNGE-
AGM75776. pro	--NLKCRPDFSYAIAAGSNKIGLLGABD---LTTTWQKYPVGMRLKDSMVEVWCKGGE-
AKA88535. pro	--YPACKPDYSYAIKNDEIGPLGATG---LTTQWYEYSDGMRLQDSAVVVPCKDGE-
AKA88536. pro	--YPDCRPEHSYAIKASDRIGPLGABD---LTTVWKDYSDQNMMLLEDTMVIVWCKDKG-
YP_006860588	--QFTCEKNRYAIAKTTDVGLLGABG---LTTTWREYKNNFELDDGLLRAVCKSGF-
YP_009407716	--GLBCNFELQYALAGNTSMSLLGPTA---LKTQWYQAADGVKIIDGVVTVICNKGI-
NP_777524	--AITCEPEYQYALARSKRIGPLGABD---LVTTWHDYKFDLKIQDPLVMVYCKNDQ-
YP_009109567	YNQVKVDRPDWHTLLQKDLKGVLSGKDGLYILRSNKVWVTGGSVIITDEFVTTPIGDHT
AIU36197	YNQVKVDRPDWHTLLQKDLKGVLSGKDGLYILRSNKVWVTGGSVIITDEFVTTPIGDHT
ABO21120	--AQTCNPEFMYALAKNTSIGSLGPES---LTTTRWYQLTSGFKLTDSTIEVTCVGAN-
AF144618_1	--QFSCRECYRYALAKTKDVGPLGAES---LTTTWVDYKRNQLDDGTVRAVCSNGY-
AAO26466	--QFACREDHRYALSKTKEIGPLGAKS---LTTTWBEHKRSLBLDDGIVKATCVRGF-
YP_009026415	--ALBCDTNFQYALAKGTKIGPLGABB---LTTTYRRLQPGEQQLTDGLVTITCTNHD-
YP_008992092	--AQTCNPEFMYALAKNTSIGSLGPES---LTTTRWYQLTSGFKLTDSTIEVTCVGAN-
AAX12371	--ALBCDTNFQYALAKGTKIGPLGABE---LTTTYRRLQPGEQQLTDGLVTITCTNHD-
AHW57610	--EITCEPFGQYALAKDKKIGPLGAES---LVTTWHDYTFDMKIQDPLVMVYCKNNR-

ВКЧС

ВД КРС

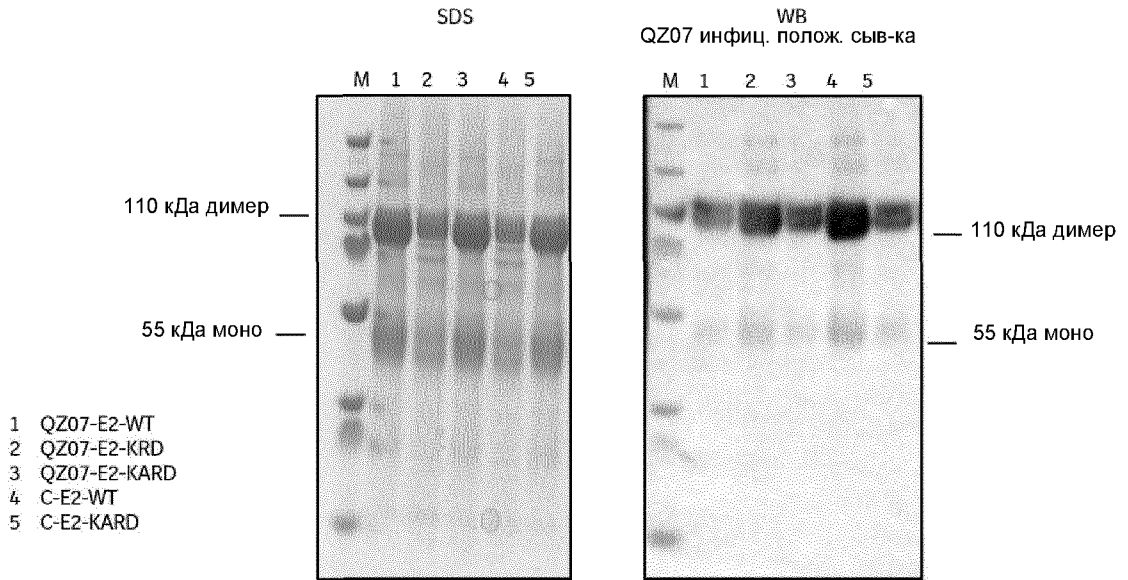
Другой  
пестивирус

ФИГ. 4

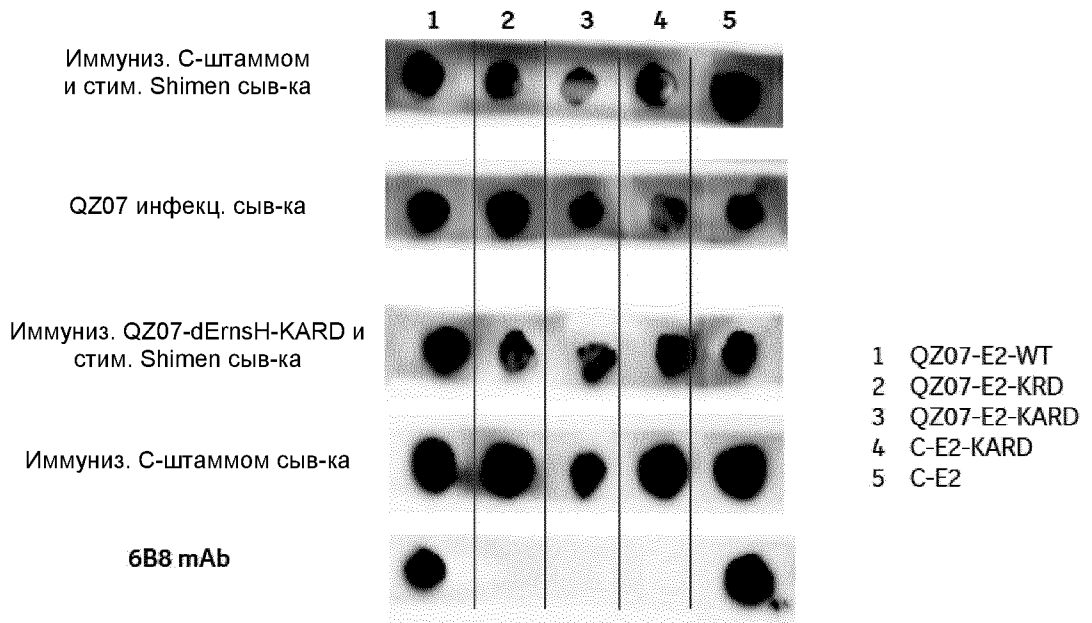
**A****Б****В**

ФИГ. 5

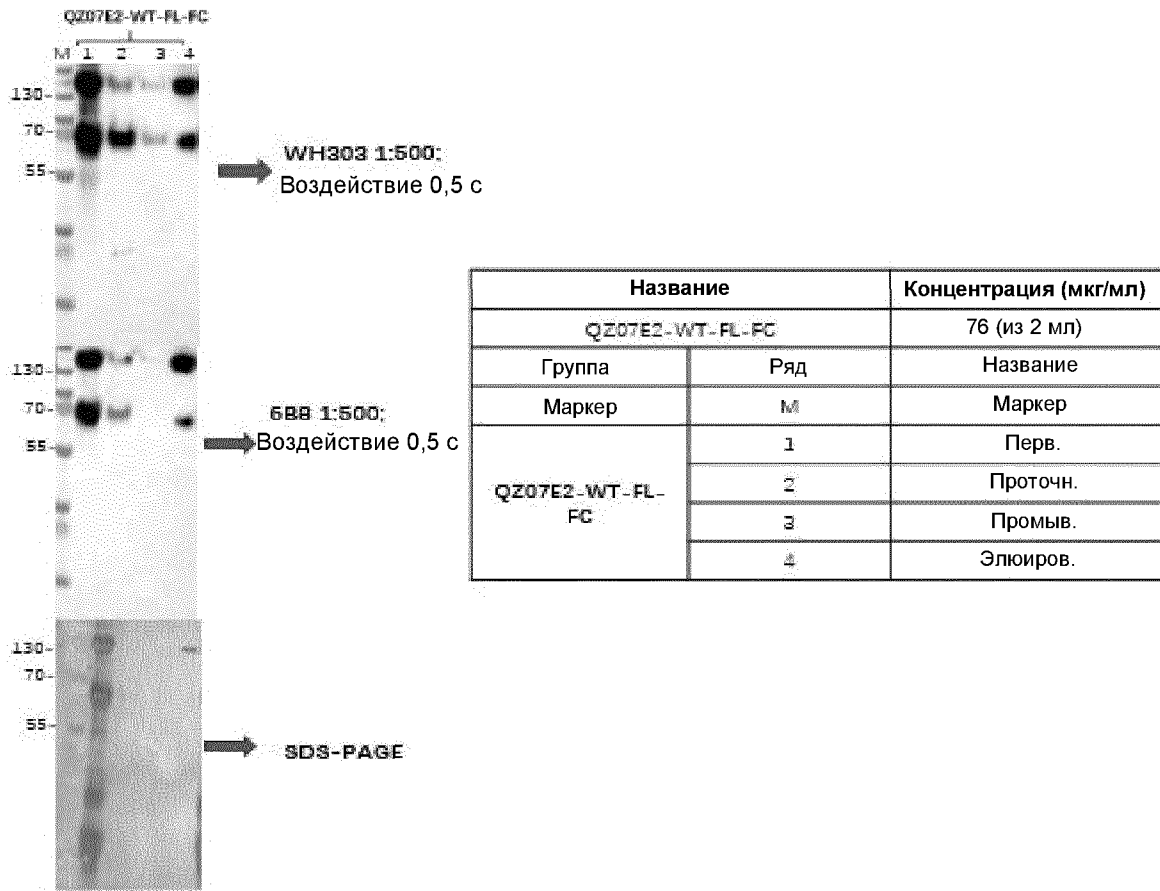
**A**



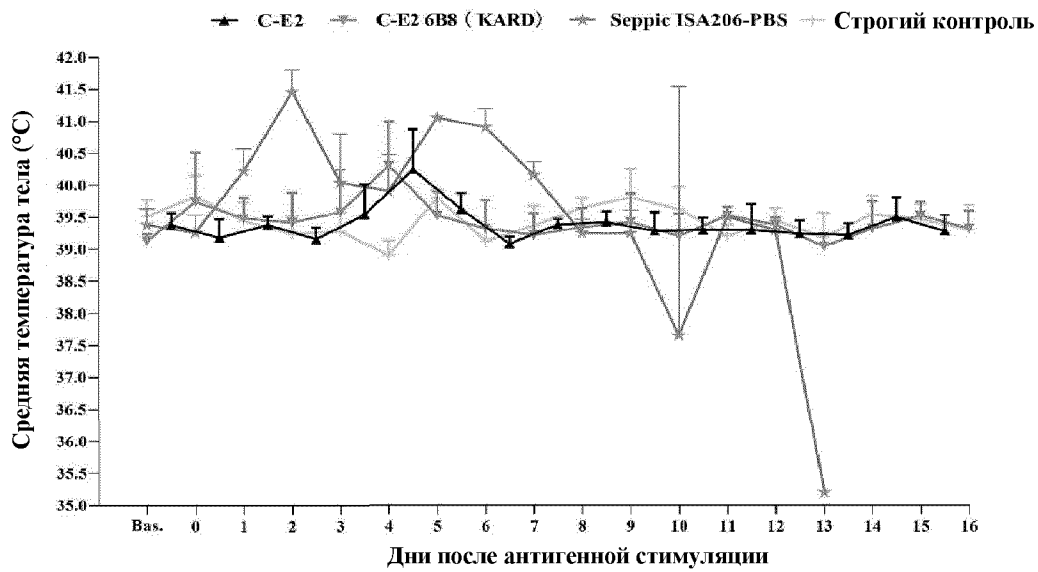
**Б**



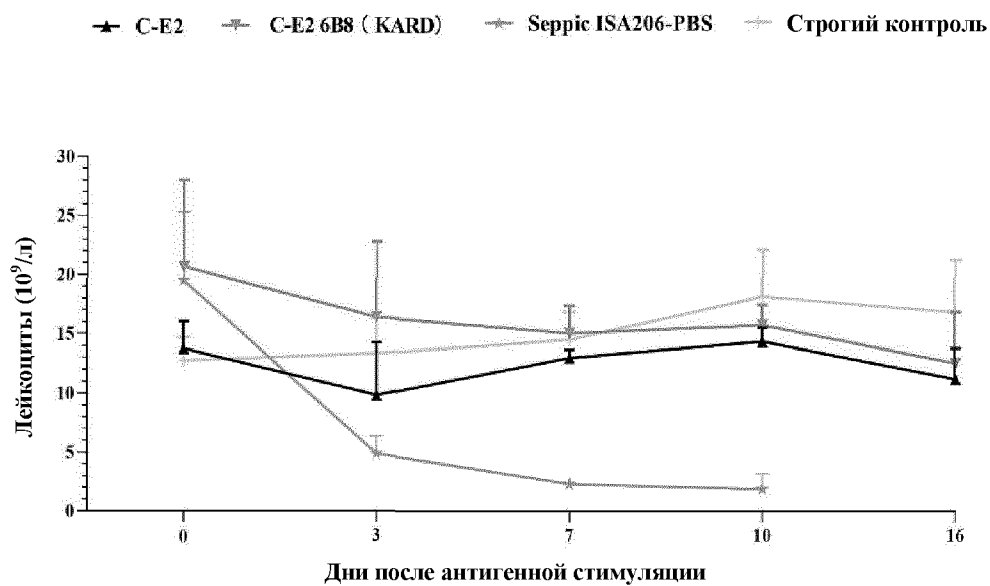
**ФИГ. 6**



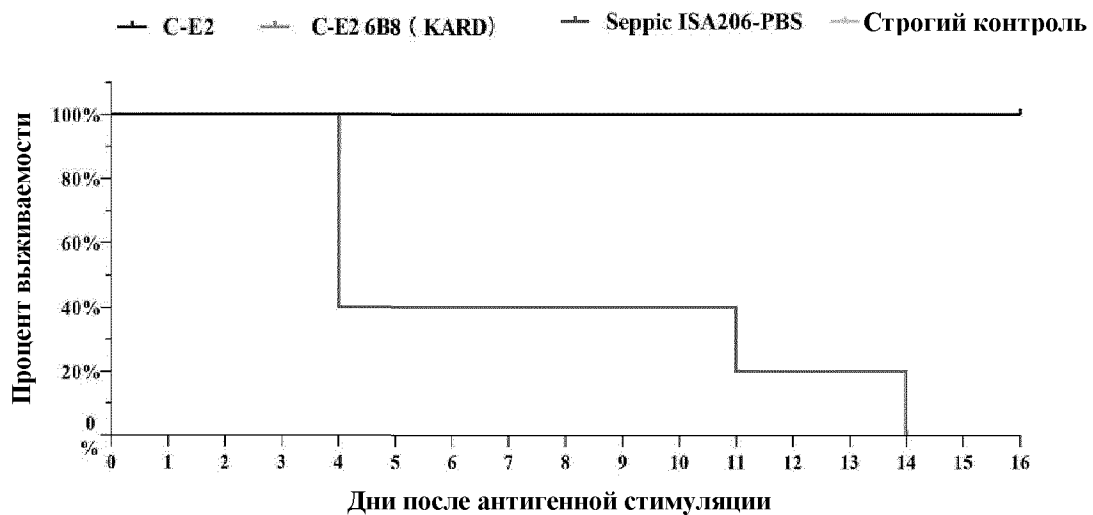
ФИГ. 7



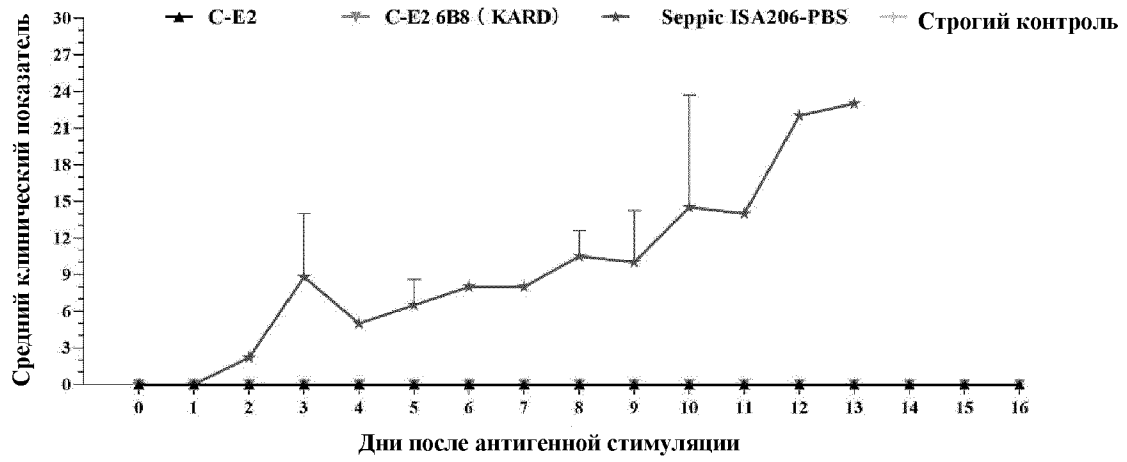
ФИГ. 8



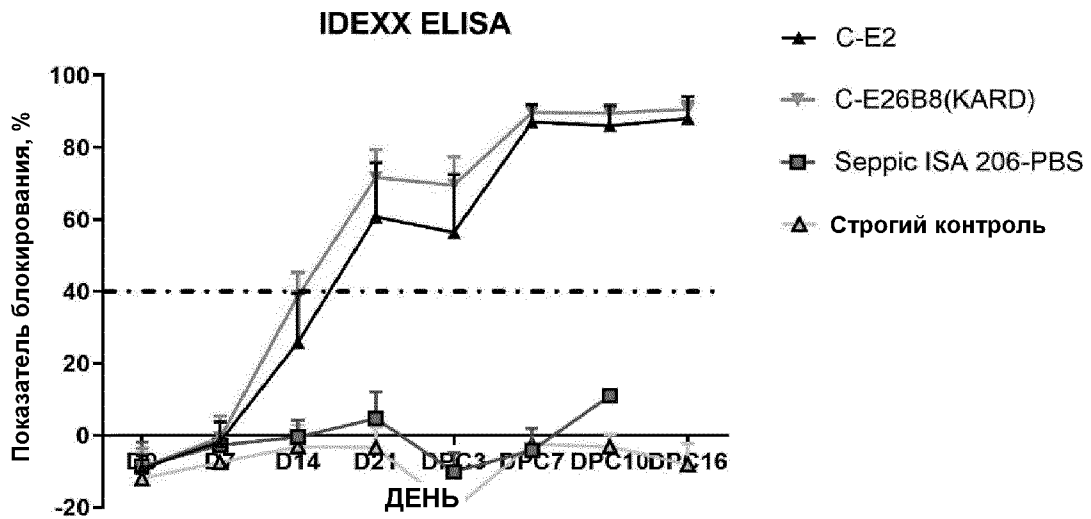
ФИГ. 9



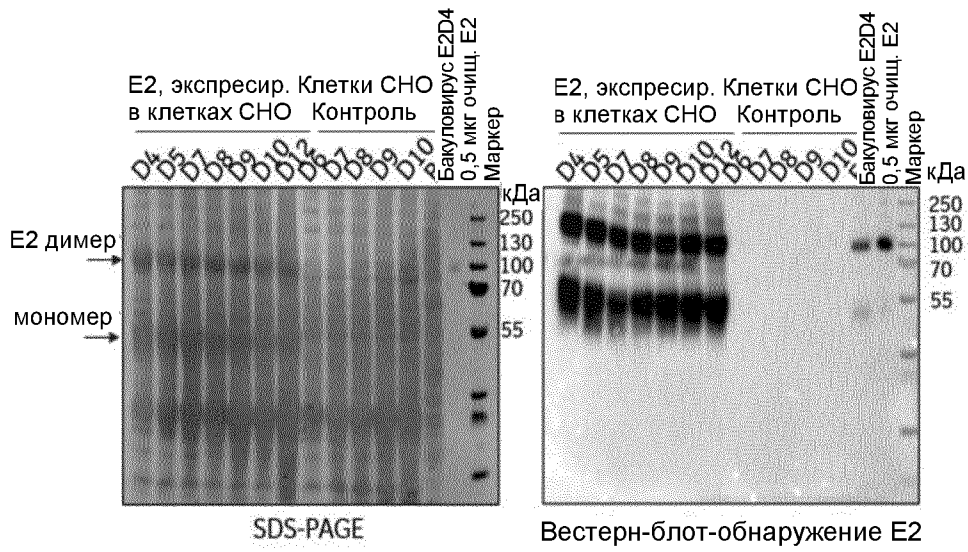
ФИГ. 10



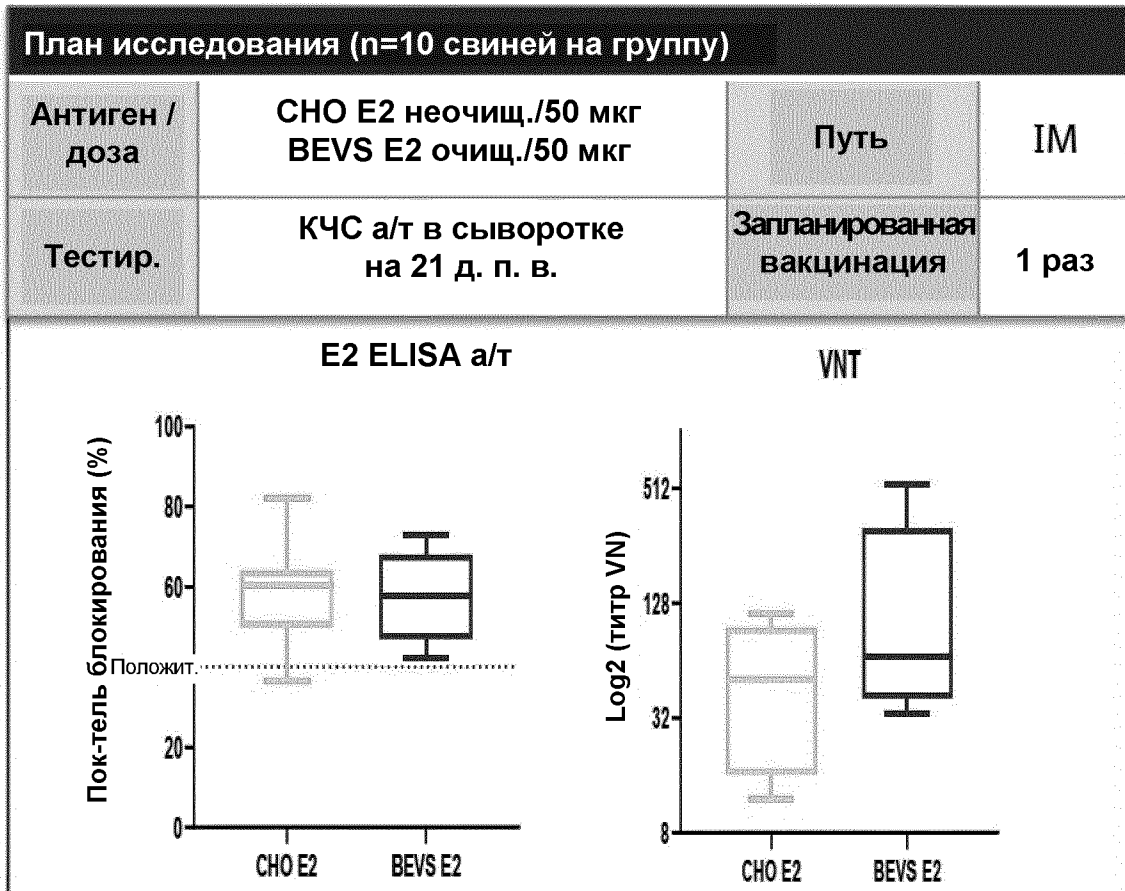
ФИГ. 11



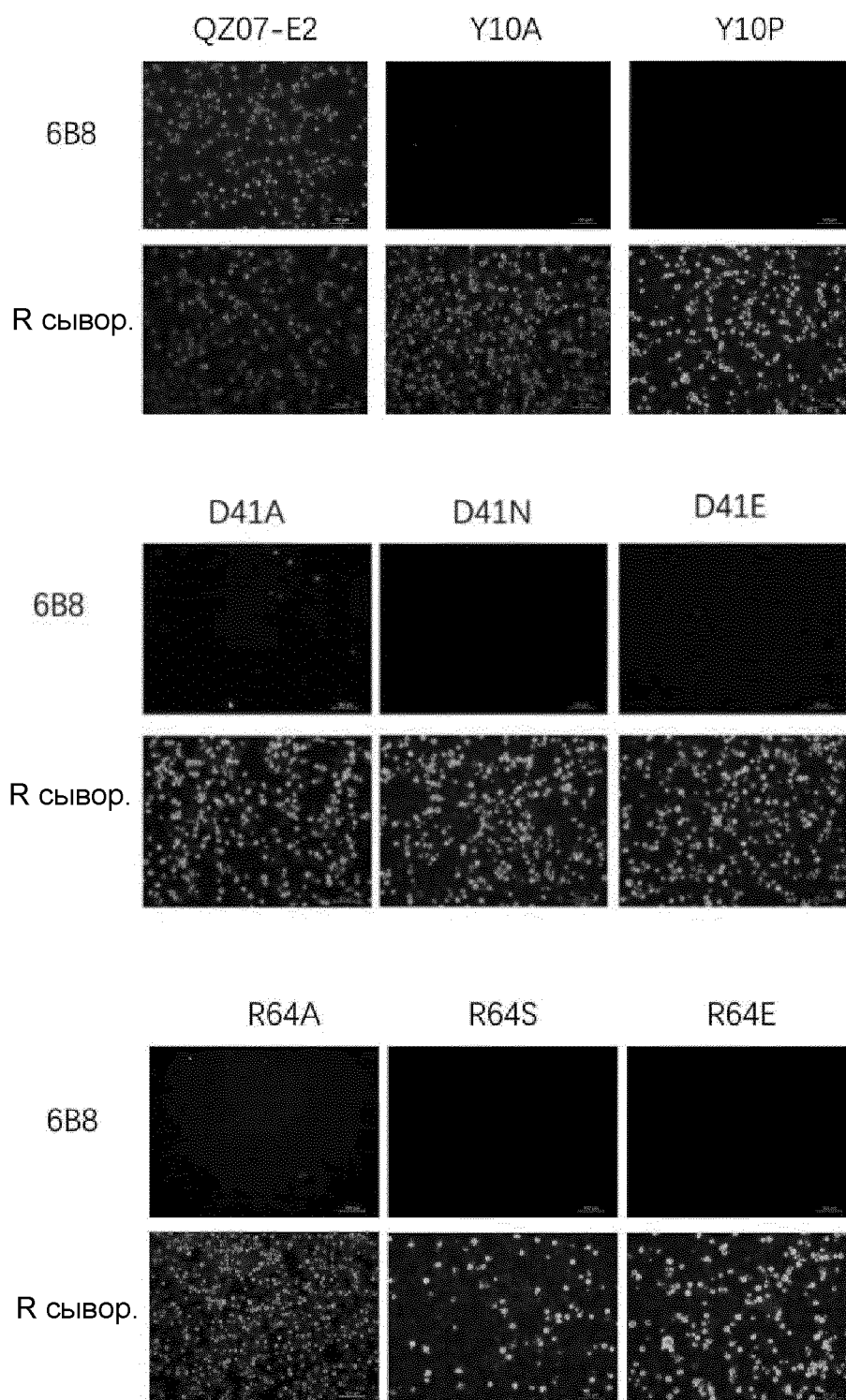
ФИГ. 12



ФИГ. 13

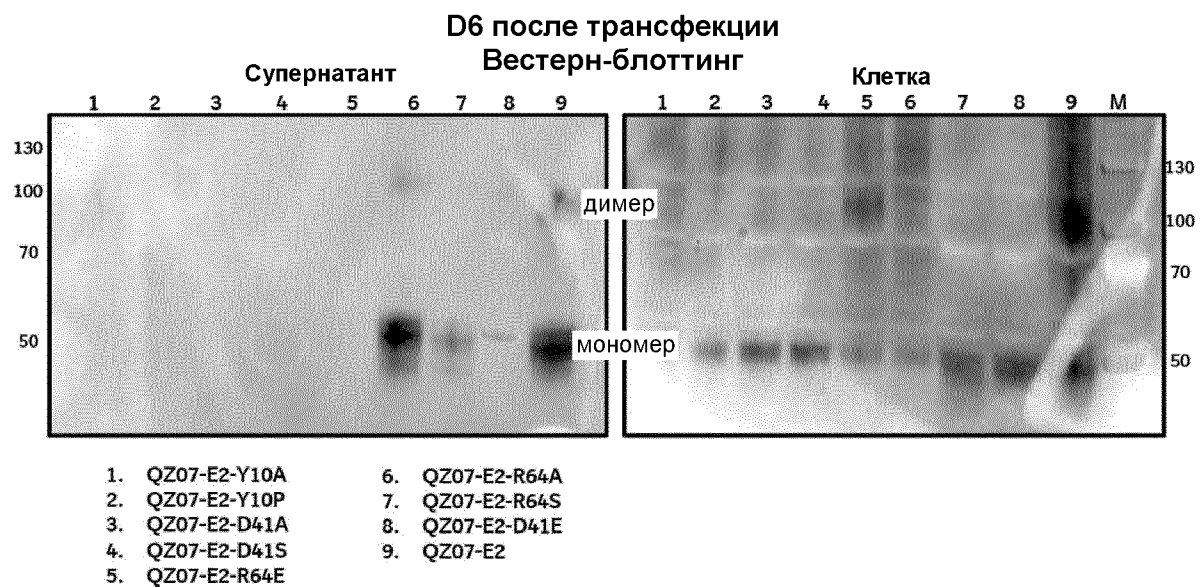


ФИГ. 14



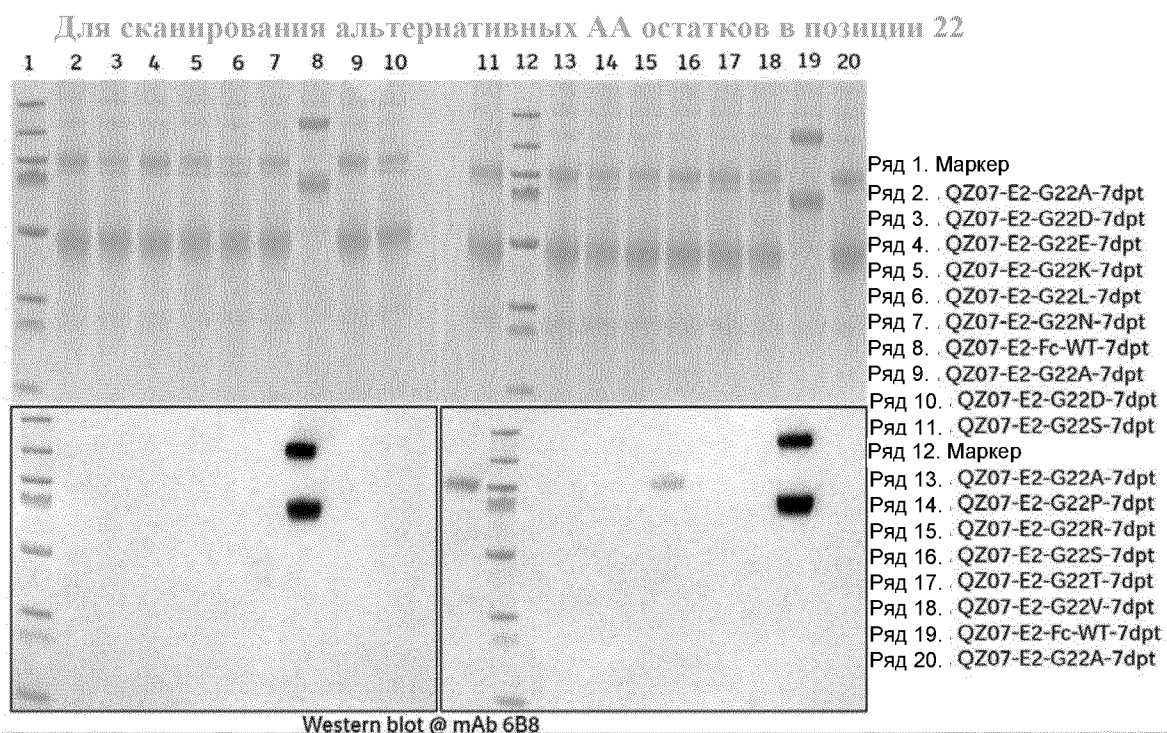
ФИГ. 15





ФИГ. 16

А



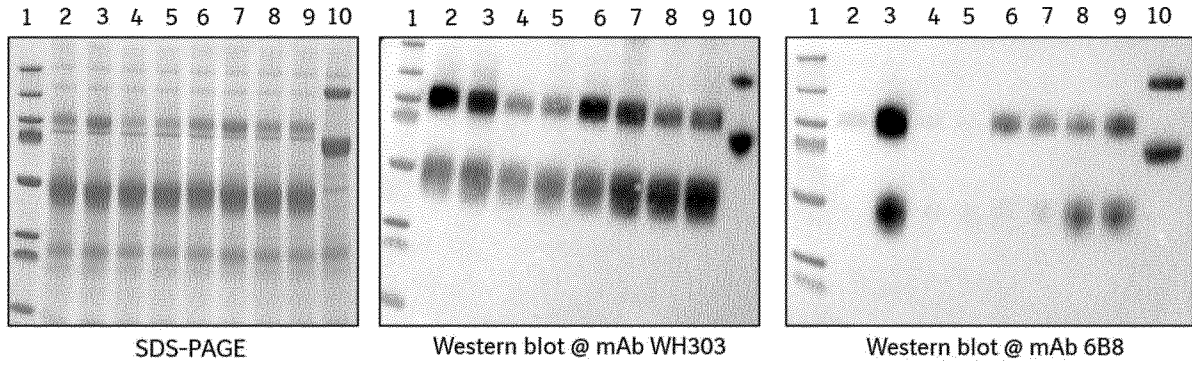
Б

Мутация	Выход	Реактивность
		mAb 6B8
QZ-E2-G22A	Хороший	Отр.
QZ-E2-G22D	Хороший	Отр.
QZ-E2-G22E	Хороший	Отр.
QZ-E2-G22K	Средний	Отр.
QZ-E2-G22L	Низкий	Отр.
QZ-E2-G22N	Хороший	Отр.
QZ-E2-G22P	Средний	Отр.
C-E2-G22Q	Хороший	Отр.
QZ-E2-G22R	Низкий	Отр.
QZ-E2-G22S	Хороший	Сл. пол.
QZ-E2-G22T	Средний	Отр.
QZ-E2-G22V	Средний	Отр.

ФИГ. 17

А

Для сканирования альтернативных АА остатков в позиции 24



Ряд 1. Маркер

Ряд 3. QZ07-E2-E24A-7dpt

Ряд 5. QZ07-E2-E24I-7dpt

Ряд 7. QZ07-E2-E24P-7dpt

Ряд 9. QZ07-E2-E24V-7dpt

Ряд 2. QZ07-E2-E24R-7dpt

Ряд 4. QZ07-E2-E24D-7dpt

Ряд 6. QZ07-E2-E24K-7dpt

Ряд 8. QZ07-E2-E24S-7dpt

Ряд 10. QZ07-E2-Fc-WT-7dpt

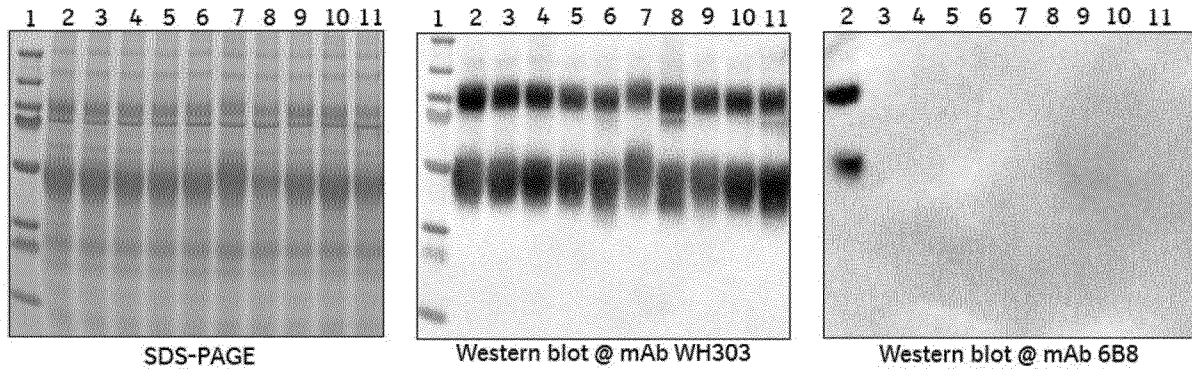
Б

Мутация	Выход	Реактивность	
		mAb 6B8	mAb WH303
QZ-E2-E24R	Хороший	Сл. пол.	Пол.
QZ-E2-E24A	Хороший	Сил. пол.	Пол.
QZ-E2-E24D	Низкий	Отр.	Пол.
QZ-E2-E24I	Низкий	Отр.	Пол.
QZ-E2-E24K	Хороший	Пол.	Пол.
C-E2-G24K	Хороший	Отр.	Пол.
QZ-E2-E24P	Хороший	Пол.	Пол.
QZ-E2-E24S	Средний	Пол.	Пол.
QZ-E2-E24T	Хороший	Сил. пол.	Пол.
QZ-E2-E24V	Средний	Пол.	Пол.

ФИГ. 18

А

Для сканирования альтернативных АА остатков в позиции 25



Ряд 1. Маркер  
 Ряд 3. QZ07-E2-G25D-7dpt  
 Ряд 5. QZ07-E2-G25K-7dpt  
 Ряд 7. QZ07-E2-G25N-7dpt  
 Ряд 9. QZ07-E2-G25R-7dpt  
 Ряд 10. QZ07-E2-G25V-7dpt

Ряд 2. QZ07-E2-G25A-7dpt  
 Ряд 4. QZ07-E2-G25E-7dpt  
 Ряд 6. QZ07-E2-G25L-7dpt  
 Ряд 8. QZ07-E2-G25P-7dpt  
 Ряд 10. QZ07-E2-G25T-7dpt

Б

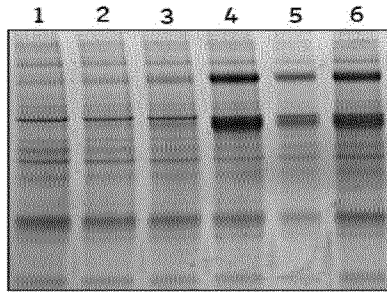
Мутация	Выход	Реактивность	
		mAb 6B8	mAb WH303
QZ-E2-G25A	Хороший	Сил. пол.	Пол.
QZ-E2-G25D	Хороший	Отр.	Пол.
QZ-E2-G25E	Хороший	Отр.	Пол.
QZ-E2-G25K	Хороший	Отр.	Пол.
QZ-E2-G25L	Хороший	Отр.	Пол.
QZ-E2-G25N	Хороший	Отр.	Пол.
QZ-E2-G25P	Средний	Отр.	Пол.
QZ-E2-G25R	Хороший	Отр.	Пол.
C-E2-G25S	Хороший	Пол.	Пол.
QZ-E2-G25T	Хороший	Отр.	Пол.
QZ-E2-G25V	Хороший	Отр.	Пол.

ФИГ. 19



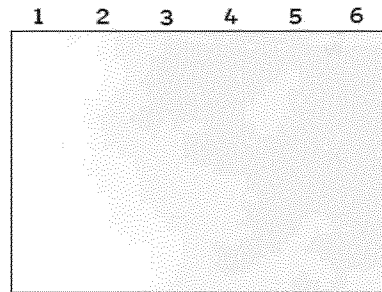
А

Для сканирования альтернативных АА остатков в позиции 64



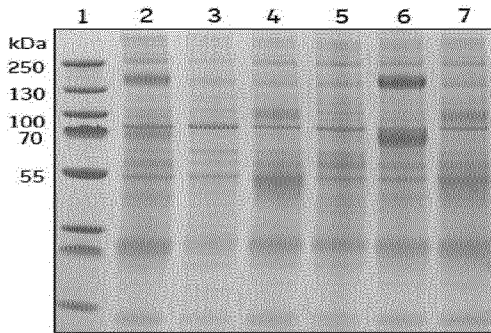
SDS-PAGE

Ряд 1. QZ07-E2-Fc-R64D-7dpt  
 Ряд 3. QZ07-E2-Fc-R64H-7dpt  
 Ряд 5. QZ07-E2-Fc-R64T-7dpt



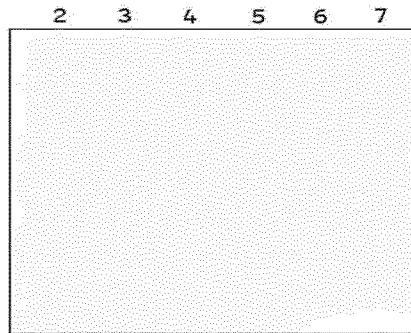
Western blot @ mAb 6B8

Ряд 2. QZ07-E2-Fc-R64G-7dpt  
 Ряд 4. QZ07-E2-Fc-R64K-7dpt  
 Ряд 6. QZ07-E2-Fc-R64W-7dpt



SDS-PAGE

Ряд 1. Маркер  
 Ряд 3. QZ07-E2-Fc-R64P-7dpt  
 Ряд 5. QZ07-E2-R64E-7dpt  
 Ряд 7. QZ07-E2-R64S-7dpt



Western blot @ mAb 6B8

Ряд 2. QZ07-E2-Fc-R64L-7dpt  
 Ряд 4. QZ07-E2-R64A-7dpt  
 Ряд 6. QZ07-E2-Fc-R64K-7dpt

Б

Мутация	Выход	Реактивность	
		mAb 6B8	mAb WH303
QZ-E2-R64D-Fc	Оч. низкий	Отр.	Сл. пол.
QZ-E2-R64G-Fc	Низкий	Отр.	Пол.
QZ-E2-R64H-Fc	Низкий	Отр.	Пол.
QZ-E2-R64K-Fc	Хороший	Отр.	Пол.
QZ-E2-R64T-Fc	Средний	Отр.	Пол.
QZ-E2-R64W-Fc	Хороший	Отр.	Пол.
QZ-E2-R64L-Fc	Сред./низк.	Отр.	Пол.
QZ-E2-R64P-Fc	Низкий	Отр.	Пол.
QZ-E2-R64A	Сред./хор.	Отр.	Пол.
QZ-E2-R64E	Низкий/нет	Отр.	Пол.
QZ-E2-R64S	Сред./низк.	Отр.	Пол.

ФИГ. 20