РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 663 004**(13) **C2**

(51) МПК
C07K 14/09 (2006.01)
C12N 15/42 (2006.01)
A61K 39/135 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07K 14/005 *(2006.01);* ***C12N 2770/32122*** *(2006.01);* ***C12N 2770/32134*** *(2006.01);* ***A61K 39/135*** *(2006.01)*

(21)(22) Заявка: **2015145327, 25.03.2014**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.03.2014

Дата регистрации:
31.07.2018

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
26.03.2013 EP 13161139.4

(43) Дата публикации заявки: **02.05.2017** Бюл. № 13

(45) Опубликовано: **31.07.2018** Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **26.10.2015**

(86) Заявка PCT:
EP 2014/055904 (25.03.2014)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2014/154655 (02.10.2014)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):
КОТЕЧА Абхай (GB),
СТЮАРТ Дэвид (GB),
ФРАЙ Элизабет (GB),
ЭСНУФ Роберт (GB)

(73) Патентообладатель(и):
ДЗЕ ПИРБРАЙТ ИНСТИТЬЮТ (GB)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 20040001864 A1, 01.01.2004. WO 2012032348 A1, 15.03.2012. US 2011236416 A1, 29.09.2011. WO 2011007339 A2, 20.01.2011. CURRY S. et al. Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. JOURNAL OF VIROLOGY. 1995, v.69, No.1, p.430 - 438 (c. 436-437). RU 2467014 C2, (Учреждение Российской академии наук Центр** (см. прод.)

(54) СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ КАПСИДЫ FMDV

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к биотехнологии. Описан способ получения мутантного белка VP2 вируса ящура (FMDV), отличающийся тем, что мутантный белок VP2 получают путем замены по меньшей мере одной аминокислоты парентеральной αA-спирали белка VP2 на аминокислоту, выбранную из группы, включающей в себя: Q, N, V, I, F, Y, W и H, с получением αA-спирали, отличной от αA-спирали дикого типа, где мутанты выбирают из группы, состоящей из: 1) мутантов H87V, V90N, Y91F, S93H, S93Y, S93F, S93W, S93Q, L94V, S97V, S97I, S97Q и Y98F серотипа O; 2) мутантов H93F и H93Q серотипа A; 3) мутантов S93H, S93Y, S93W, S93F и Y98F серотипа SAT-2, где все номера положений указаны в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1. Изобретение расширяет арсенал средств для предотвращения ящура. 10 ил., 1 табл., 3 пр.

RU 2663004 C2

RU 2663004 C2

(56) (продолжение):
"Боинженерия" РАН; Российская Федерация, от имени которой выступает Министерство образования и науки), 20.11.2012, (формула изобретения, реферат).

RU 2663004 C2

RU 2663004 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 663 004**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
C07K 14/09 (2006.01)
C12N 15/42 (2006.01)
A61K 39/135 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C07K 14/005 (2006.01); *C12N 2770/32122* (2006.01); *C12N 2770/32134* (2006.01); *A61K 39/135* (2006.01)

(21)(22) Application: **2015145327, 25.03.2014**

(24) Effective date for property rights:
25.03.2014

Registration date:
31.07.2018

Priority:
(30) Convention priority:
26.03.2013 EP 13161139.4

(43) Application published: **02.05.2017** Bull. № **13**

(45) Date of publication: **31.07.2018** Bull. № **22**

(85) Commencement of national phase: **26.10.2015**

(86) PCT application:
EP 2014/055904 (25.03.2014)

(87) PCT publication:
WO 2014/154655 (02.10.2014)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3, OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):
KOTECHA Abkhaj (GB),
STYUART Devid (GB),
FRAJ Elizabet (GB),
ESNUF Robert (GB)

(73) Proprietor(s):
DZE PIRBRAJT INSTITYUT (GB)

RU 2663004 C2

RU 2663004 C2

(54) STABILISED FMDV CAPSIDS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method for producing a foot-and-mouth disease virus (FMDV) VP2 protein mutant, characterised in that the VP2 protein mutant is prepared by replacing at least one parenteral amino acid αA helix of the VP2 protein with an amino acid selected from the group consisting of: Q, N, V, I, F, Y, W and H, to obtain αA-helix, different from wild-type αA-helix, wherein the mutants are selected from the group consisting of: 1) mutants H87V, V90N, Y91F, S93H, S93Y, S93F, S93W, S93Q, L94V, S97V, S97I, S97Q and Y98F of serotype O; 2) mutants H93F and H93Q of serotype A; 3) mutants S93H, S93Y, S93W, S93F and Y98F of serotype SAT-2, where all position numbers are indicated in accordance with the amino acid numbering used in SEQ ID NO: 1.

EFFECT: invention widens the range of means for preventing foot and mouth disease.

1 cl, 10 dwg, 1 tbl, 3 ex

Настоящее изобретение относится к области ветеринарии и вирусологии. В частности, изобретение относится к мутантному белку VP2 вируса ящура (FMDV), к капсиду вируса ящура, содержащему мутантный белок вируса ящура VP2, к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, к клетке-хозяину, живому рекомбинантному микроорганизму-носителю и к вакцине против ящура. Кроме того, изобретение относится к нескольким способам получения и применения указанных вариантов осуществления.

Ящур (FMD) представляет собой острое, системное и очень заразное заболевание, поражающее парнокопытных млекопитающих; отряд Artiodactyla. Помимо многих диких видов основными характерными мишенями данного вируса являются сельскохозяйственные животные, такие как крупный рогатый скот, буйволы, свиньи, овцы и козы. Типичные симптомы включают в себя волдыри на языке и копытах; отсюда и название болезни. Данное заболевание не только вызывает особый дискомфорт и вторичные инфекции, но также лихорадку и иногда смерть. Кроме того, заболевание вызывает значительный экономический ущерб, поскольку пораженные животные перестают двигаться и есть. Ящур является заболеванием, подлежащим регистрации, и многие страны не разрешают импорт животных из FMD-положительных регионов; это обеспечивается международной системой экспортной сертификации (Paton et. al. 2009, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. Vol. 364, p. 2657).

FMD вызывается вирусом ящура (FMDV), который представляет собой вирус семейства пикорнавирусов, и является типичным видом рода Aphtovirus. Его вирион содержит одноцепочечный положительный смысловой РНК-геном размером примерно 8 кб, который содержится в не имеющем оболочке капсиде. Капсид имеет диаметр около 30 нм в диаметре и характеризуется икосаэдральной симметрией. Капсид состоит из правильно расположенных 60 копий каждого из четырех структурных вирусных белков: VP1, VP2, VP3 и VP4. Они организованы в протомерные единицы с коэффициентом седиментации 5S, содержащие по одному из VP1-4; пять из указанных протомеров образуют пентамер с коэффициентом седиментации 12S, а полный капсид состоит из 12 пентамеров. Он может представлять собой не способный к инфицированию пустой капсид с коэффициентом седиментации примерно 70S, или капсид вириона с коэффициентом седиментации примерно 146S, содержащий вирусную РНК, который может вызывать инфекцию (Fry et al., 2005, Curr. Top. Microbiol. Imm., vol. 288, p. 71).

Икосаэдральная структура капсида FMDV имеет три природных вида осей симметрии: пятерная ось, где протомеры собираются в пентамер, а также две оси, где встречаются пентамерные субъединицы: двойная ось симметрии, где взаимодействуют соседние белки VP2-VP2, и тройная ось симметрии, где взаимодействуют белки VP2-VP3; см. фигуру 1.

В случае природной репликации вируса вирусные белки FMDV экспрессируются в виде длинного полипротеинового предшественника, называемого P1, который содержит VP4-2-3-1. Поэтому VP FMDV иногда обозначают в соответствии с порядком их расположения в P1, а именно: VP1 обозначают 1D, VP2 обозначают 1B, VP3 обозначают 1C, а VP4 обозначают 1A. Посттрансляционное расщепление P1 на более мелкие части осуществляется неструктурными белками 2 A-C и 3 A-D, кодируемыми FMDV. (Chapter: Picornaviridae, in: Fields Virology, 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN-10: 0781718325).

Традиционные меры, предпринимаемые для уменьшения встречаемости или тяжести FMD, а также распространения FMDV, включают в себя вакцинацию, селективную выбраковку и ограничение перемещения. Однако в некоторых странах вакцинация разрешена только в условиях вспышки инфекции, так как система сертификации экспорта

определяет, является ли животное серологически положительным по FMDV. Следовательно, разрабатываются маркерные вакцины, которые позволяют различить вакцинацию и инфекцию дикого типа.

Традиционные вакцины против FMD представляют собой адъювант-содержащие эмульсии инактивированных препаратов целых вирусов, которые индуцируют защитные уровни антител, нейтрализующих вирус. Однако из-за высокой инфекционности частиц FMDV манипуляции с вирусом и получение таких вакцин следует проводить в условиях биологической безопасности высокого уровня при эффективном контроле качества, особенно по инактивации вирусов.

FMDV является высоко вариабельным агентом и в настоящее время имеет семь основных серотипов: O, A, C, SAT (южноафриканские территории)-1, SAT-2, SAT-3 и Asia 1. В указанных серогруппах существует много антигенных вариантов, подтипов и квази-видов. Соответствующую информацию можно найти в Carrillo et al. (2005, J. of Gen.Virol., vol. 79, p. 6487), где приведены результаты выравнивания транслируемых геномных последовательностей более 100 изолятов FMDV всех серотипов.

Поскольку существует небольшая перекрестная защита против основных серотипов, как правило, вакцина FMD содержит отдельный компонент каждого серотипа, против которого нужно выработать защиту, и, как правило, представляет собой комбинированную вакцину.

Что касается распространенности, серотипы A и O присутствуют практически во всем мире, тогда как вспышки серотипа C не наблюдаются с 2004 года. Три серотипа SAT встречаются в ряде регионов Африки и Ближнего Востока, а серотип Азия 1 встречается в Азии и на Ближнем Востоке.

Семь серотипов также различаются по биофизическим свойствам, в основном, по стабильности. Они относятся к FMDV и, помимо высокой контагиозности, также являются очень неустойчивыми и легко инактивируются при нагревании, в кислых условиях, при гидродинамическом усилии и т.д. Тем не менее, все вакцины против FMD необходимо транспортировать и хранить в соответствии со строгими условиями холодовой цепи логистики. Это является особым недостатком в (суб-)тропических и развивающихся регионах мира, где FMD является эндемическим заболеванием. В данном отношении вирионы серотипа A и Азия 1 относительно более стабильны, чем вирионы других серотипов, и имеют реальный срок годности 6 месяцев или более. Однако вакцины серотипа O имеют очень ограниченный биологический период полужизни, составляющий, как правило, только несколько месяцев. Еще хуже ситуация для трех серотипов SAT, которые, как известно, обладают низкой стабильностью, позволяющей получать вакцины с низкой защитной способностью, даже при многократном введении.

Следовательно, остается потребность в разработке и совершенствовании безопасных, стабильных и эффективных вакцин против FMD.

В течение многих лет также исследуются вакцины против FMD, полученные путем экспрессии ДНК с использованием рекомбинантных технологий. Например, вакцины могут быть получены путем экспрессии субъединиц или эпитопов FMDV в разных системах, включающих в себя как бесклеточные системы, так и прокариотические или эукариотические клетки, в том числе растительные клетки.

Другим вариантом является применение пустых капсид FMDV; они более безопасны для производства, чем целые вирусы, и являются эффективными иммуногенами (Rweyemamu, et al., 1979, Arch. Virol., vol. 59, p. 69). Такие пустые капсиды можно эффективно получать в рекомбинантных системах экспрессии, таких как E.coli (Lewis et al., 1991 , J. of Virol., vol. 65, p. 6572; Lee et. al., 2009, J. Biomed. Sci. vol. 16, p. 69), или

вирусные системы экспрессии, например, с использованием рекомбинантного вируса коровьей оспы (Abrams et al., 1995, J. of Gen. Virol., vol. 76, p. 3089); рекомбинантного бакуловируса, или с использованием клеток насекомых (Cao et al., 2009, Vet. Microbiol., vol. 137, p. 1; Charleston et al., WO 2011/048353; Subramanian et al., 2012, Antivir. Res., Vol. 96, p. 288) или шелковичных червей (Li et al., 2012, PLoS One. 2012;7(8): e43849); или с использованием живого рекомбинантного вектора, такого как рекомбинантный аденовирус (Lu et al., 2008, vaccine, vol. 26, Suppl. 6, p. G48).

К сожалению, пустые капсиды часто оказываются даже менее стабильными, чем капсиды вирионов; по-видимому, сама вирусная геномная РНК оказывает некоторое стабилизирующее влияние на структуру капсида FMDV.

В нескольких группах исследуют характеристики стабильности капсида FMDV, который быстро диссоциирует на пентамеры при температуре выше физиологической и значении pH ниже физиологического. Для применения в качестве вакцин это является нежелательным свойством, так как пентамеры 12S являются гораздо менее иммуногенными, чем интактные капсиды. См.: Doel et al. (1981, Arch. of Virol., vol. 70, p. 21) и Hegde et al. (2009, in: Editorial, Vaccine, vol. 27, p. 2199). Twomey et al. (1995, Virology, vol. 206, p. 69) исследуют природные варианты серотипа A FMDV, которые являются менее чувствительными к кислым условиям в результате аминокислотных замен в положениях 131 и 133 белка VP2.

Для улучшения термо- и/или кислотоустойчивости капсида FMDV исследователи из некоторых групп вводят мутации в один или несколько вирусных структурных белков и затем используют такие мутанты VP для получения капсидов вирионов FMDV с последующим тестированием их по биофизическим свойствам; такие методы называют капсидной инженерией.

Как правило, результаты варьируют; в некоторой степени чувствительность к кислоте можно уменьшить путем введения мутаций по остаткам гистидина в положениях 140-145 VP3: Martin-Acebes et al., (2011, J. of Virol., vol. 85, p. 2733), Liu et al. (CN 101270155), и Ellard et al. (J. of Gen. Virol., vol. 80, p. 1911). Martin-Acebes et al. (выше) вводят замену: VP1 N17D (это означает, что аспарагин в положении 17 VP1 заменяют на аспарагиновую кислоту).

Подобным образом, термостабильность капсида FMDV можно несколько улучшить путем введения аминокислотных мутаций в некоторые участки белков VP2 и VP3: Mateo et al. (2008, J. of Virol., vol. 82, p. 12232), King et al. (WO 2002/000251) и Fowler et al. (WO 2011/032348). Обзор: Mateu (2011, Prot. Eng., Des. & Sel., vol. 24, p. 53). Mateo et al. (выше) вводят замену VP2 A65H и сочетание замен: VP3 D69E/VP2 T188A. Fowler et al. (выше) вводят замены: в VP2: L78S, E79A, K80R, T88A, E131K или A193S; и в VP3: H85P или E196A.

Способ King et al. (выше) отличается от данной работы тем, что он включает в себя попытку стабилизировать капсид FMDV путем введения скорее ковалентных, чем нековалентных связей. Путем замены аминокислоты в VP2 на цистеин они вводят неприродный дисульфидный мостик между двумя смежными белками VP2 с двойной осью симметрии. Однако данный способ можно использовать для стабилизации только пустых капсидов, но не капсидов вирионов. Это связано с тем, что полученные с помощью данного способа капсиды являются постоянно фиксированными и после инфицирования клетки-хозяина капсиды вирионов больше не могут образовывать покрытие.

King et al. (выше) осуществляют аминокислотную замену в положении 93 белка VP2 (которое указано в WO 2002/000251 как аминокислотное положение 179 в

последовательности с идентификационным номером 38). Данное аминокислотное положение находится в участке белка VP2, который в результате укладки нативной структуры образует α-спираль: αA-спираль белка VP2 охватывает (в случае серотипа O) аминокислоты 88-98 VP2 (см. Acharya et al., 1989, Nature, vol. 337, p. 709). Данный участок также исследуют в связи с механизмом удаления покрытия у другого пикорнавируса, человеческого энтеровируса (Wang et al., 2012, Nature Str. & Mol. Biol., vol. 19, p. 424), однако этот механизм отличается от аналогичного механизма, присутствующего в FMDV. Wang et al. не осуществляют или не предполагают введение каких-либо мутаций в данном участке.

Несмотря на все усилия, предпринимаемые на предшествующем уровне техники, в настоящее время отсутствует общепременимая и иммунологически эффективная вакцина против FMD, полученная с использованием рекомбинантных капсид FMDV.

Целью настоящего изобретения является получение альтернативной вакцины против FMD, применимой ко всем серотипам FMDV, с использованием либо пустых капсидов FMDV, либо капсидов вирионов FMDV. Другой целью является получение усовершенствованной вакцины против FMD.

При попытке применить технологию, описанную King et al. (выше), авторы настоящего изобретения были разочарованы, поскольку им не удалось применить данный подход для получения пустых капсидов FMDV, относящегося к серотипу, отличному от серотипа A. Например, цистеиновые замены осуществляли в αA-спиральном участке белка VP2 FMDV серотипа O либо в положении 93, или в других положениях спирального участка. Были предприняты попытки получить пустые капсиды, однако капсиды либо совсем не образовывались, либо сильно агрегировали, что делало их непригодными для применения в качестве вакцин.

Неожиданно было обнаружено, что указанную цель можно достичь и, следовательно, недостатки предшествующего уровня техники можно преодолеть путем получения мутантного белка VP2 FMDV, который содержит определенную аминокислотную замену в αA-спиральном участке белка VP2, без необходимости введения ковалентной связи.

Такой мутантный белок VP2 FMDV можно ввести в капсиды FMDV, которые в результате приобретают значительно повышенную биофизическую стабильность. Полученные стабилизированные капсиды FMDV можно использовать для получения усовершенствованных вакцин против FMD на основе капсидов вирионов или пустых капсидов.

С учетом того, что точный механизм действия не известен, авторы настоящего изобретения без связи с какой-либо теорией или моделью, выдвинули предположение, что благоприятный эффект такой замены в указанном участке обусловлен гидрофобной и/или электростатической стабилизацией капсида FMDV на молекулярном уровне. Предположительно это происходит в результате усиления межмолекулярных взаимодействий между двумя смежными белками VP2 в области двойной оси симметрии капсида FMDV. Это укрепляет взаимодействие между соседними пентамерами, приводя к значительному повышению стабильности капсида FMDV в целом.

Повышенная стабильность капсидов FMDV приводит к ряду преимуществ по сравнению с капсидами FMDV, содержащими немодифицированный исходный белок VP2: капсиды, содержащие мутантный белок VP2, можно получать в больших количествах, их можно транспортировать с менее строгими требованиями к холодовой цепи логистики, и они вызывают улучшенный иммунный ответ.

Указанные результаты являются неожиданными, поскольку мутации, обеспечивающие

нековалентное связывание, в данном конкретном участке белка VP2 не были описаны ранее, или не было оснований предполагать, что такие мутации могут привести к значительным улучшениям стабильности капсидов FMDV и полученным из них вакцин против FMD.

Следовательно, в одном аспекте изобретение предлагает мутантный белок VP2 вируса ящура (FMDV), который содержит замену, по меньшей мере, одной аминокислоты, расположенной в αA-спиральном участке белка VP2, на аминокислоту, выбранную из группы, включающей в себя: Q, N, V, I, L, M, F, Y, W и H.

"Вирус ящура" в соответствии с настоящим изобретением представляет собой вирус, имеющий характеристические признаки ряда таксономических видов FMDV. Он также включает в себя FMDV, который относится к любому из подразделов указанных видов, такому как подвид, квазивид, штамм, изолят, генотип, серотип, серовар, вариант, подтип и т.п. Для специалиста в данной области очевидно, что, хотя микроорганизм в настоящее время может называться FMDV, это является таксономической классификацией, которая может подвергаться изменениям по мере появления новых фактов, приводящих к переклассификации с образованием новой или другой таксономической группы. Однако, поскольку такое изменение не затрагивает микроорганизм или его характеристические признаки, а только его название или классификацию, считается, что такие переклассифицированные организмы продолжают входить в объем настоящего изобретения.

Термин "белок VP2" в соответствии с настоящим изобретением относится к белку вируса FMDV номер 2, который известен как структурный белок капсида FMDV. Он содержит примерно 218 аминокислот и имеет молекулярную массу примерно 24 кДа. Специалистам в данной области хорошо известно, что изменчивость, присущая FMDV, обуславливает наличие природных вариаций размера и аминокислотной последовательности белка VP2. Аминокислотную последовательность белка VP2, полученную из большого числа изолятов FMDV, можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank™, или Swiss Prot™.

Мутантный белок VP2 в соответствии с настоящим изобретением может иметь биологическое или синтетическое происхождение, и может быть получен путем выделения, очистки, сборки и т.д. Предпочтительно мутантный белок VP2 получают с использованием рекомбинантной технологии, путем экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей мутантный белок VP2.

Белок VP2 для применения в настоящем изобретении можно получить из FMDV, например, путем получения из FMDV нуклеиновой кислоты, кодирующей белок VP2, или его нуклеотидную последовательность. Такой FMDV, в свою очередь, можно получить (при соблюдении соответствующих мер биологической безопасности) из разных источников, включающих в себя исходный полевой изолят или депозитарные учреждения, такие как ATCC или CNCM, или его можно получить из разных лабораторий и институтов, таких, как Пирбрайтский институт (Pirbright, Woking, UK), который является всемирной справочной лабораторией FAO и ВОЗ по стандартизации FMD (WRL FMD).

FMDV, подходящий для применения в настоящем изобретении, включает в себя один или несколько FMDV из серотипов A, O, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 или Asia1; предпочтительно FMDV, подходящий для применения в настоящем изобретении, включает в себя один или несколько FMDV, циркулирующих в поле в определенное время.

Более предпочтительными являются один или несколько FMDV, выбранные из

серотипов O, SAT-1, SAT-2 или SAT-3, поскольку проблемы, касающиеся низкой стабильности данных серотипов, вызывают наибольшее внимание в данной области.

Альтернативно предпочтительными являются FMDV, рекомендованные WRL FMD как высоко приоритетные кандидаты для получения вакцин; например в их последнем докладе указаны: O Manisa, O PanAsia-2, O BFS, O Campos, A 24 Cruzeiro, Asia 1 Shamir, A Iran-05, A 22 Iraq, SAT-2 Saudi Arabia и SAT-2 Eritrea, или эквивалент любого из указанных вирусов (ежеквартальный доклад WRL FMD, октябрь-декабрь 2012).

Термин "мутант" в соответствии с настоящим изобретением относится к объекту, который ранее не был широко известен или доступен, либо в природе, либо в лаборатории. Таким образом, мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения отличается от белка VP2, описанного на уровне техники, предшествующем настоящему изобретению. В частности, на сегодняшний день не известно ни одной аминокислотной последовательности белка VP2 FMDV, квалифицируемой как мутантный белок VP2 настоящего изобретения. Тем не менее, мутантный белок VP2 настоящего изобретения можно получить из природной среды, однако предпочтительно его получают искусственным путем.

Следовательно, в одном варианте осуществления мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения содержит замену, по меньшей мере, одной аминокислоты, расположенной в αA-спиральном участке белка VP2, на аминокислоту, выбранную из группы, включающей в себя: Q, N, V, I, L, M, F, Y, W и H, при условии, что указанная замена не приводит к получению белка VP2 с аминокислотной последовательностью, известной на предшествующем уровне техники.

Таким образом, в другом варианте осуществления мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения содержит замену, по меньшей мере, одной аминокислоты, расположенной в αA-спиральном участке белка VP2, на аминокислоту, выбранную из группы, включающей в себя: Q, N, V, I, L, M, F, Y, W и H, при условии, что указанная замена не приводит к получению белка VP2, содержащего одну или несколько (или все) из нижеследующих аминокислотных последовательностей:

- 90V в FMDV серотипа O (например, как в штамме 01BFS и/или 01M_87), и/или не 90V в серотипе C (например, CS8c1), и/или не 90V в серотипе Asia 1 (например, ASIA1_Bar2003), и/или не 90V в серотипе A (например, A22_Iraq_95), и/или не 90I в серотипе SAT-1 (например, SAT1_bot), и/или не 90I в серотипе SAT-2 (например, SAT2_ZIM7_83), и/или не 90I в серотипа SAT-3 (например, SAT3_KNP10_90);
- 91Y;
- 93H в FMDV серотипа A (например, как в штамме A22_Iraq_95), и/или не 93Q в серотипе SAT-1 (например, SAT1_bot);
- 94L в FMDV серотипа O (например, как в штамме O1BFS и/или O1M_87), и/или не 94L в серотипе C (например, CS8c1), и/или не 94L в серотипе Asia 1 (например, ASIA1_Bar2003), и/или не 94L в серотипе A (например, A22_Iraq_95), и/или не 94L в серотипа SAT-1 (например, SAT1_bot), и/или не 94L в серотипе SAT-2 (например, SAT2_ZIM7_83), и/или не 94M в серотипа SAT-3 (например, SAT3_KNP10_90);
- 95V в FMDV серотипа C (например, как в штамме CS8c1), и/или не 95M в серотипе Asia 1 (например, как в штамме ASIA1_Bar2003), и/или не 95V в серотипе A (например, A22_Iraq_95), и/или не 95V в серотипе SAT-1 (например, SAT1_bot), и/или не 95L в серотипе SAT-3 (например, SAT3_KNP10_90);
- 98Y в FMDV серотипа O (например, как в штамме O1BFS и/или O1M_87), и/или не 98Y в серотипе C (например, CS8c1), и/или не 98Y в серотипе Asia 1 (например, ASIA1_Bar2003), и/или не 98F в серотипе A (например, A22_Iraq_95), и/или не 98H в

серотипе SAT-1 (например, SAT1_bot), и/или не 98Y в серотипе SAT-2 (например, SAT2_ZIM7_83), и/или не 98H в серотипе SAT-3 (например, SAT3_KNP10_90).

Способы получения такого мутантного белка VP2 настоящего изобретения могут быть основаны на технологии случайных или направленных мутаций; например, мутанты можно идентифицировать и выбрать из случайных полевых изолятов. Кроме того, чтобы индуцировать мутации, можно проводить пассажи вирус-клетка, например, пассажи FMDV в присутствии мутагенного вещества с последующим отбором FMDV, содержащего мутантный белок VP2 настоящего изобретения, способствующий образованию более стабильного капсида. Стабильность можно тестировать с использованием селективного уровня кислотности, температуры, гидродинамического усилия, воздействия химических веществ и т.п., сравнивая пересеваемые и непересеваемые изоляты в отношении интактности и инфекционности, например, как описано и подтверждено примерами в данном описании.

В предпочтительном варианте осуществления мутантный белок VP2 настоящего изобретения анализируют, используя методы структурного анализа in silico, и получают с помощью направленных методов молекулярной биологии, включающих в себя, например, клонирование, трансфекцию, рекомбинацию, селекцию и амплификацию. Такие методы подробно описаны в известных справочниках, таких как: Current Protocols в Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989); Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., N.Y. (1986); и: Sambrook & Russell, 2001, in: 'Molecular cloning: a laboratory manual', 3rd edn. New York, USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Методы введения мутаций в белок VP2 также подробно описаны и проиллюстрированы примерами в данном описании. Таким образом, специалист в данной области техники может легко применить, адаптировать, модифицировать и усовершенствовать указанные методы, используя только рутинные методы и материалы.

В данном описании термин "содержит" (а также его вариации, такие как "содержать", "содержал" и "содержащий") относится ко всем элементам, в любом возможном сочетании подходящих для настоящего изобретения, которые, упоминаются или включены в раздел, абзац, пункт и т.д. текста, в котором этот термин используется, даже если такие элементы или сочетания явно не цитируются; но не исключает какой-либо из таких элементов или их сочетаний. Следовательно, любой такой раздел, абзац, пункт и т.д. текста также может относиться к одному или нескольким вариантам осуществления, в которых термин "содержит" (или его варианты) заменяют такими терминами, как "состоит из", "состоящий из" или "по существу состоит из".

"Замена" представляет собой замещение одного элемента другим; в настоящем изобретении данный термин относится к мутации, включающей в себя замену одной аминокислоты или нуклеиновой кислоты на другую, в зависимости от того, является ли подвергающийся мутации объект молекулой белка, ДНК или РНК. Заменяемый элемент представляет собой элемент, который встречается в немодифицированной, исходной, или относящейся к дикому типу версии белка или нуклеиновой кислоты. В результате замена в соответствии с настоящим изобретением приводит к образованию αA-спирали, которая отличается от исходной или относящейся к дикому типу αA-спирали, т.е. замена приводит к образованию модифицированной αA-спирали, которая отличается от αA-спирали версии дикого типа. Любая αA-спираль дикого типа имеет проблемы со стабильностью, описанные выше. Настоящее изобретение предлагает αA-спираль, отсутствующую в природе и усовершенствованную в отношении ее способности стабилизировать пустые капсиды.

"αA-спираль" представляет собой участок белка VP2 FMDV, который в нативной

конформации капсида может укладываться в альфа-спиральную структуру.

Используемая в настоящем изобретении в качестве стандарта "SEQ ID NO: 1" представляет собой аминокислотную последовательность белка VP2, полученную из белка P1 FMDV серотипа O, штамм 1BFS, опубликованную в GenBank под номером доступа: AAT01758; белок VP2 включает в себя аминокислоты 287-504 полноразмерного полипротеина P1. В SEQ ID NO: 1 αA-спираль содержит в длину 12 аминокислот, и занимает участок от аминокислотного положения 87 до положения 98, включая его.

Вследствие природной вариабельности FMDV положение указанной αA-спирали в белке VP2 других изолятов или серотипов FMDV может варьировать, например, αA-спираль может быть смещена на одну или несколько аминокислот в N-концевом или C-концевом направлении. Тем не менее, αA-спираль можно легко идентифицировать в аминокислотной последовательности VP2, с помощью, например, стандартной компьютерной программы для молекулярно-биологического анализа. Следовательно, в данном изобретении аминокислотные положения αA-спирали VP2, указанные в отношении SEQ ID NO: 1, могут отличаться от положений, занимаемых αA-спиралью в других изолятах FMDV.

Таким образом, в настоящем изобретении αA-спираль белка VP2 занимает участок длиной примерно 12 аминокислот, который находится между аминокислотными положениями 87 и 98 VP2, где номера положений указаны в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1.

Предпочтительно αA-спираль белка VP2 занимает участок от аминокислотного положения 87 до положения 98, включая его, где номера положений указаны в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1.

Только для иллюстрации уровня вариабельности последовательности среди разных изолятов FMDV, известных на момент даты подачи, на фигуре 2 приведены результаты множественного выравнивания аминокислотных последовательностей αA-спирали белка VP2 ряда типичных изолятов FMDV. Carrillo et al. (выше) описывают, что единственными высоко консервативными аминокислотами в участке αA-спирали белка VP2 являются остатки глицина в положениях 89 и 92 (в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1).

Обозначения аминокислот: "Q, N, V, I, L, M, F, Y, W и H" приведены в хорошо известном 1-буквенном коде в соответствии со стандартом IUPAC. В 3-буквенном стандартном коде IUPAC указанные аминокислоты имеют следующие обозначения: "Gln, Asn, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp и His". Среди указанных аминокислот Q и N содержат полярные незаряженные боковые цепи, как и H; V, I, L, M, F, Y и W содержат гидрофобные боковые цепи; а аминокислоты F, Y, W, H содержат ароматические боковые цепи.

Предпочтительные для замены аминокислоты включают в себя одну или несколько из аминокислот с гидрофобной боковой цепью, выбранных из группы, состоящей из: V, I, L, M, F, Y, и W, или одну или несколько из аминокислот с ароматической боковой цепью, выбранных из группы, состоящей из: F, Y, W и H. Более предпочтительные для замены аминокислоты включают в себя одну или несколько из аминокислот с ароматической боковой цепью, выбранных из группы, состоящей из: F, Y, W и H.

Это предпочтение основывается на неожиданном открытии, что аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями, а особенно аминокислоты с ароматическими боковыми цепями, хотя и являются относительно большими, неожиданно хорошо подходят к участку капсида FMDV с двойной осью симметрии, и, как обнаружено, оказывают значительное стабилизирующее действие на капсид FMDV, содержащий

мутантный белок VP2 с такой заменой.

В соответствии с настоящим изобретением, ароматическая аминокислота представляет собой аминокислоту, содержащую ароматическую боковую цепь. Боковая цепь является ароматической, если она содержит циклическую структуру, удовлетворяющую правилу Хюккеля.

В некоторых положениях αA-спирали белка VP2 аминокислотные замены настоящего изобретения являются особенно предпочтительными.

Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления мутантного белка VP2 FMDV настоящее изобретение предлагает замену аминокислоты, по меньшей мере, в одном положении, выбранном из группы, включающей в себя: 87, 90, 91, 93, 94, 97 и 98, где нумерация аминокислотных положений белка VP2 соответствует нумерации аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления замену в соответствии с настоящим изобретением вводят в αA-спираль белка VP2 по одному или нескольким из положений 87 и/или 98 αA-спирали белка VP2, где нумерация аминокислотных положений белка VP2 соответствует нумерации аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1. Неожиданно было обнаружено, что введение замен в указанных аминокислотных положениях, расположенных на N- и C-концах αA-спирали белка VP2, приводит к стабилизации капсида FMDV, содержащего такой мутантный белок VP2.

В предпочтительном варианте осуществления положения в αA-спирали белка VP2, подходящие для замещения в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя одно или несколько из положений 90, 93 и 97, где нумерация аминокислотных положений белка VP2 соответствует нумерации аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что боковые цепи аминокислот в указанных положениях αA-спирали белка VP2 направлены к противоположному белку VP2 поперек двойной оси симметрии. Это обуславливает стабилизацию капсида в результате введения отдельных мутаций в данных положениях.

Следовательно, нековалентные молекулярные взаимодействия, индуцированные аминокислотными заменами в указанных положениях, эффективно обеспечивают стабилизацию поперек двойной оси симметрии.

В более предпочтительном варианте осуществления положение αA-спирали белка VP2, подходящее для замещения в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой положение 93, в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1. Установлено, что данное аминокислотное положение находится посередине αA-спирали белка VP2, а боковая цепь аминокислоты ориентирована в направлении эквивалентного остатка противоположного белка VP2. Следовательно, введение замены в указанном положении аминокислотной последовательности белка VP2 FMDV может привести к образованию ковалентного взаимодействия поперек двойной оси симметрии, что может существенно стабилизировать капсид FMDV, содержащий такой мутантный белок VP2.

В качестве иллюстрации на фигуре 3 приведено 3D-изображение нековалентного (гидрофобная укладка) взаимодействия поперек двойной оси симметрии в капсиде FMDV, содержащем замену VP2 93W.

В соответствии с настоящим изобретением, нековалентные химически взаимодействия представляют собой межмолекулярные взаимодействия посредством атомных сил, такие как ионные, водородные, ван-дер-Ваальсовы или гидрофобные взаимодействия.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутантный белок FMDV VP2 настоящего изобретения содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену,

выбранную из группы, включающей в себя: 87V, 87M; 90N, 90L; 91 F; 93Y, 93F, 93W, 93H, 93V, 93L, 93I, 93M, 93Q; 94V; 97I, 97M, 97V, 97Q; 98F и 98H, где нумерация аминокислотных положений белка VP2 соответствует нумерации аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1.

Как описано выше, данный вариант осуществления также ограничен условием, что аминокислотная замена в VP2 не приводит к получению одной или нескольких (или всех) из нижеследующих аминокислотных последовательностей, известных на предшествующем уровне техники для белков VP2 FMDV:

- 93H в FMDV серотипа A, и/или не 93Q в серотипе SAT-1,
- 98F в серотипе A, и/или не 98H в серотипе SAT-1, и/или не 98H в серотипе SAT-3.

В соответствии с настоящим изобретением, такое обозначение, как "VP2 93F", относится к замене любой исходной аминокислоты в положении 93 VP2 (в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1) на указанную аминокислоту (здесь: фенилаланин).

Сочетания нескольких предпочтительных аминокислотных замен также входят в объем настоящего изобретения. Так, например, мутантный белок VP2 настоящего изобретения может содержать замену 93Y, 93F или 93H наряду с заменой 97I или 97M, и/или 90N. Другие примеры конкретных сочетаний замен, входящих в объем настоящего изобретения, включают в себя двойные замены в мутантных белках VP2, выбранные из группы, включающей в себя: 93Y и 97I; 90N и 93Y; 87V и 93F; 93H и 98F; 93F и 98F; 91F и 98F; 95V и 98F; и 87V и 98F. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предлагает мутантные белки VP2, содержащие тройные замены, выбранные из группы, включающей в себя: 93H, 95V и 98F; 93F, 94V и 98F; 87V, 90L и 93Q; 90L, 93Q и 98F; а также 90A, 93Q и 98F. Примером мутантного белка VP2, содержащего 4 замены, является мутантный белок VP2, содержащий: 87V, 90L, 93Y и 97I. Все аминокислотные положения в белке VP2 пронумерованы в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей в себя: 93Y, 93F, 93W, 93H, 93V, 93L, 93I, 93M и 93Q, где аминокислотные положения в белке VP2 пронумерованы в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1, при условии, что указанная замена не приводит к получению белка VP2, содержащего одну или несколько (или все) из нижеследующих аминокислотных последовательностей: 93H в FMDV серотипа A, и/или не 93Q в серотипе SAT-1.

В одном варианте осуществления мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей в себя: 93Y, 93F, 93W, 93V, 93L, 93I и 93M, где аминокислотные положения в белке VP2 пронумерованы в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей в себя: 93Y, 93F, 93W и 93H, где аминокислотные положения в белке VP2 пронумерованы в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1, при условии, что замена не приводит к получению белка VP2 с аминокислотной последовательностью FMDV серотипа A, содержащей 93H.

В одном варианте осуществления мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену, выбранную

из группы, включающей в себя: 98F и 98H, где аминокислотные положения в белке VP2 пронумерованы в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1, при условии, что замена не приводит к получению белка VP2, содержащего одну или несколько (или все) из нижеследующих аминокислотных последовательностей: 98F в FMDV серотипа A, и/или не 98H в серотипе SAT-1, и/или не 98H в серотипе SAT-3.

В одном варианте осуществления мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения представляет собой белок VP2 из FMDV, относящегося к серотипу, выбранному из группы, включающей в себя следующие серотипы: O, Asia 1, SAT-1, SAT-2 и SAT-3, где VP2 содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей в себя: 93Y, 93F, 93W и 93H, где аминокислотные положения в белке VP2 пронумерованы в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения представляет собой белок VP2 из FMDV, относящегося к серотипу, выбранному из группы, включающей в себя следующие серотипы: A, O, Asia 1, SAT-2 и SAT-3, где VP2 содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей в себя: 93Y, 93F, 93W, 93H и 93Q, где аминокислотные положения в белке VP2 пронумерованы в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте осуществления мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения представляет собой белок VP2 из FMDV любого серотипа, где мутантный белок VP2 содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей в себя: 93Y, 93F и 93W, где аминокислотные положения в белке VP2 пронумерованы в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1. Как описано ниже, указанные замены в данном положении приводят к получению капсидов FMDV, содержащих такой мутантный белок VP2, которые обладают наивысшей относительной стабильностью.

Предпочтительные аминокислотные замены в мутантном белке VP2 настоящего изобретения идентифицируют с помощью сочетания методов, с использованием экспериментов in silico, in vitro и in vivo.

В таблице 1, в разделах A, B и C, приведены результаты анализа стабильности капсидов FMDV, содержащих мутантные белки VP2, для разных серотипов FMDV. Относительная стабильность разных мутант VP2-содержащих капсидов приведена в виде произвольного значения: "0", "-" или "+", где ноль обозначает уровень стабильности капсида, содержащего незамещенный исходный белок VP2, символ минус обозначает относительно нестабильные капсиды, т.е. менее устойчивые, чем исходные капсиды, символ плюс обозначает относительно стабильные капсиды, т.е. более стабильные, чем исходные капсиды. Относительные различия между мутантными капсидами обозначаются числом символов плюс или минус, например, "++++" относится к гораздо более стабильному капсиду, чем "+".

Для иллюстрации в таблице 1 также приведены значения относительной стабильности белков VP2, содержащих некоторые замены, которые, как известно, не стабилизируют капсиды FMDV, например: тогда как замена VP2 H87V в FMDV серотипа O оказывает благоприятное влияние на стабильность капсида (относительная оценка +), замена H87D является очень неблагоприятной (относительная оценка ---). Подобным образом, приведены значения относительной стабильности в результате замен в участке белка VP2, который находится за пределами αA-спирали: VP2 Q57E, Q57L, R60G и R60L. Поскольку в данном случае относительная стабильность варьирует от - до ---, указанные

замены оказывают неблагоприятное действие на стабильность капсида FMDV, содержащего мутантный белок VP2 с такой заменой.

Таблица 1A

Относительная стабильность капсидов FMDV серотипа O

	Мутация	Относительная стабильность
Серотип O		
	VP2 дикого типа	0
	VP2 H87V	+
	VP2 H87D	---
	VP2 V90N	+
	VP2 Y91F	++
	VP2 S93H	++
	VP2 S93Y	+++
	VP2 S93F	+++
	VP2 S93W	++
	VP2 S93Q	++
	VP2 L94V	++
	VP2 S97V	++
	VP2 S97I	++
	VP2 S97Q	++
	VP2 Y98F	+++
	VP2 R60G	---
	VP2 R60L	---
	VP2 Q57E	--
	VP2 Q57L	--

Таблица 1B

Относительная стабильность капсидов FMDV серотипа A

	Мутация	Относительная стабильность
Серотип A		
	VP2 дикого типа	0
	VP2 H93F	++
	VP2 H93Q	+

Таблица 1C

Относительная стабильность капсидов FMDV серотипа SAT-2

Мутация	Относительная стабильность
Серотип SAT-2	
VP2 дикого типа	0
VP2 S93H	++
VP2 S93Y	+++
VP2 S93W	++++
VP2 S93F	+++
VP2 Y98F	++

Чтобы получить капсид, содержащий мутантный белок FMDV VP2, вначале с помощью методов рекомбинантных ДНК in vitro получают рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует мутантный белок VP2 настоящего изобретения, содержащий желаемую аминокислотную замену (замены). Это можно осуществить путем получения и суб-клонирования ПЦР-фрагментов, с последующей экспрессией белка in vitro в составе других белков FMDV, например, в виде полипротеина P1-2A, с совместной экспрессией протеазы FMDV 3C.

Необходимые молекулярно-биологические методы хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в известных руководствах, таких как упомянутые выше "Current Protocols in Molecular Biology" и "Molecular cloning: a laboratory manual".

Для получения капсидов инфекционных вирионов FMDV, содержащих мутантный белок VP2 настоящего изобретения, можно использовать несколько методов, например, с использованием конструкции инфекционного клона FMDV, которой можно манипулировать в качестве кДНК, кодирующей желательную замену в белке VP2, с последующей трансфекцией в подходящие клетки-хозяева. Инфекционные клоны FMDV давно известны и описаны, например, в Zibert et al. (1990, J. of Virol., vol. 64, p. 2467); Liu et al. (2004, Virus Res., vol. 104, p. 157); и: Blignaut et al. (2010, J. of Gen. Virol., vol. 92, p. 849).

Альтернативно можно получить пустой капсид FMDV путем экспрессии соответствующей нуклеиновой кислоты в рекомбинантной системе экспрессии, как описано ниже.

С помощью указанных технологий можно получить капсид FMDV, содержащий мутантный белок VP2 настоящего изобретения, который может представлять собой либо пустой капсид, либо капсид вириона.

Капсиды вирионов FMDV, содержащие мутантный белок VP2 настоящего изобретения, выделяют из клеточной культуры, очищают и анализируют на стабильность, например, в условиях повышенной температуры, пониженных значений pH и химической инактивации. Затем обработанные капсиды вирионов тестируют на отсутствие изменений в градиенте сахарозы с последующим анализом методом электронной микроскопии или гель-электрофореза, с использованием 12S Elisa (Harmsen et al., 2011, Vaccine, vol. 29, p. 2682) или термофлуориметрического анализа (Walter et al., 2012, J. of Virol. Meth., vol. 185, p. 166). Капсиды вирионов также тестируют на

жизнеспособность с помощью анализов бляшкообразования. Результаты демонстрируют, что мутации белка VP2 настоящего изобретения значительно повышают стабильность капсида.

Например, капсиды инфекционных вирионов FMDV, содержащие мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретению, получают из серотипа SAT-2, содержащего либо замену VP2 S93H, либо замену VP2 S93Y. В соответствии с результатами термофлуориметрического анализа указанные мутантные вирусы являются высоко стабильными: мутант S93H является стабильным при температуре до 51°C, а мутант S93Y является стабильным при температуре до 53°C. Это является большим достижением по сравнению со стабильностью исходного инфекционного вируса SAT-2, который является стабильным лишь до 47°C. Инфекционные вирионы FMDV, капсиды которых содержат указанные мутантные белки VP2, также хорошо реплицируются в клетках BHK-21, причем уровень репликации в целом сравним с уровнем репликации вируса дикого типа.

Результаты описаны в приведенном ниже разделе Примеры. Методы и материалы, необходимые для проведения таких процедур, хорошо известны в данной области и подробно описаны в данном документе. Поэтому специалисты в данной области могут легко их применять, используя только рутинные методы и материалы.

Следовательно, в следующем аспекте настоящее изобретение предлагает капсид FMDV, содержащий мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения.

"Капсид" FMDV в соответствии с настоящим изобретением известен в данной области и представляет собой макромолекулярную структуру икосаэдрической симметрии, которая состоит из структурных вирусных белков FMDV, расположенных в строгом порядке. Капсид FMDV настоящего изобретения может представлять собой пустой капсид FMDV, или капсид РНК-содержащего вириона FMDV. Такой капсид вириона FMDV может быть инфекционным или нет, в зависимости от состояния содержащегося в нем генетического материала вируса.

В предпочтительном варианте осуществления капсид FMDV настоящего изобретения представляет собой капсид вириона FMDV.

Капсид вириона FMDV настоящего изобретения может относиться к любому серотипу и может содержать любой мутантный белок VP2 настоящего изобретения.

В другом предпочтительном варианте осуществления капсид вириона FMDV настоящего изобретения содержит мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения, который несет аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей в себя: 93Y, 93F, 93W и 93H, где нумерация аминокислот белка VP2 соответствует нумерации аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1, при условии, что замена не приводит к образованию белка VP2 с аминокислотной последовательностью серотипа A FMDV, содержащей 93H.

В предпочтительном варианте осуществления капсид FMDV настоящего изобретения представляет собой пустой капсид FMDV.

Пустой капсид FMDV настоящего изобретения может относиться к любому серотипу и может содержать любой мутантный белок VP2 настоящего изобретения.

В другом предпочтительном варианте осуществления пустой капсид FMDV настоящего изобретения содержит мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения, который несет аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей в себя: 93Y, 93F, 93W и 93H, где нумерация аминокислот белка VP2 соответствует нумерации аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1, при условии, что замена не приводит к образованию белка VP2 с аминокислотной последовательностью серотипа A FMDV,

содержащей 93H.

Капсид FMDV настоящего изобретения можно получить разными способами. Например, капсид вириона FMDV настоящего изобретения можно получить путем манипуляций с генетическим материалом FMDV, трансфекции его в подходящие клетки-хозяева и амплификации полученного инфекционного FMDV, содержащего мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения, в подходящих клетках-хозяевах, таких как клетки BHK-21.

Альтернативно пустой капсид FMDV настоящего изобретения можно получить in vitro с использованием клеточной системы экспрессии, причем данный способ имеет преимущества, связанные с выходом и безопасностью. Система экспрессии может включать в себя прокариотические или эукариотические клетки; в качестве эукариотических клеток-хозяев можно использовать клетки дрожжей, млекопитающих, насекомых или растений, как описано на предшествующем уровне техники.

Предпочтительной для применения in vitro системой экспрессии пустого капсида FMDV настоящего изобретения является система экспрессии, включающая в себя бакуловирус/клетки насекомых (BVES), поскольку данная система позволяет полностью использовать полезные свойства капсида настоящего изобретения. Это обусловлено тем, что культуральная среда, обычно используемая для клеток насекомых BVES, является достаточно кислой, ее pH, как правило, составляет примерно 6,5. Кроме того, экспрессию в клетках насекомых обычно проводят при 27°C в течение периода, составляющего до 5 дней. Оба условия несомненно являются неблагоприятными для нестабилизированного пустого капсида FMDV.

И действительно, обнаружено, что экспрессия пустых капсидов FMDV серотипа O дикого типа или одного из серотипов SAT в BVES является не очень эффективной и дает мало капсидного антигена. Однако путем экспрессии в BVES пустых капсидов FMDV, содержащих мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения, можно достичь высокого выхода антигенов пустых капсидов. Таким образом, было обнаружено, что стабилизированные капсиды FMDV настоящего изобретения лучше переносят условия BVES.

Экспрессию и сборку пустых капсидов FMDV настоящего изобретения можно проводить разными способами, при условии, что структурные белки FMDV, VP 1, 3, 4 и мутантный белок VP2, объединяются так, чтобы обеспечить сборку целых пустых капсидов. На практике этого можно достичь путем одновременной или раздельной экспрессии VP, или путем экспрессии в одинаковых или разных клетках-хозяевах. В предпочтительном варианте осуществления системы экспрессии, подходящей для применения в настоящем изобретении, экспрессию пустого капсида FMDV настоящего изобретениям осуществляют путем совместной экспрессии всех VP FMDV в одной клетке-хозяине. Это обеспечивает оптимальный контроль за полученным капсидным продуктом.

Если капсид FMDV настоящего изобретения получают с помощью одного из указанных способов, например, путем репликации капсидов вирионов, или путем экспрессии пустого капсида, то белок VP2 в указанных капсидах, как правило, полностью состоит из мутантного белка VP2 настоящего изобретения. Это обеспечивает наиболее стабильную конституцию полученного капсида.

Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления капсида FMDV настоящего изобретения белок VP2, входящий в состав капсида, преимущественно представляет собой мутантный белок VP2 настоящего изобретения.

Тем не менее, настоящее изобретение также предлагает капсиды FMDV, где не весь

белок VP2, входящий в состав капсида, представляет собой мутантный белок VP2 настоящего изобретения. В состав капсида можно ввести несколько молекул белка VP2 дикого типа путем внедрения или совместной экспрессии с получением VP2-химерных капсидов. Такие капсиды могут иметь преимущество, в частности, при работе с капсидами инфекционных вирионов FMDV настоящего изобретения, так как с их помощью можно осуществлять тонкую регуляцию стабильности полученного капсида вириона FMDV настоящего изобретения. Вполне возможно, что капсиды вирионов, содержащие только мутантный белок VP2, могут быть слишком стабильными для того, чтобы обеспечивать репликацию FMDV. Следовательно, включение нескольких белков VP2 дикого типа в состав капсида вириона FMDV может привести к уменьшению стабильности до приемлемого уровня. Однако предпочтительно содержание мутантного белка VP2 настоящего изобретения является максимально высоким, насколько это возможно, чтобы сохранить наивысший уровень стабильности, допустимый для данного инфекционного FMDV.

Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления капсида FMDV настоящего изобретения белок VP2, входящий в состав капсида вириона FMDV, содержит более 50% мутантного белка VP2 настоящего изобретения. Более предпочтительно, содержание мутантного белка составляет более 60, 70, 80, 90, 95 или 99%, в данном порядке предпочтения.

Описанные методы позволяют получить капсид FMDV, который содержит (частично или полностью) мутантный белок VP2 настоящего изобретения. Полученный капсид обладает полезными свойствами и может найти подходящее применение в соответствии с его повышенной биофизической стабильностью.

Таким образом, в следующем аспекте настоящее изобретение относится к способу повышения стабильности капсида FMDV, включающему в себя стадию получения капсида FMDV, содержащего мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения.

Термин "повышение стабильности" относится к улучшению биофизической стабильности капсидов FMDV, содержащих мутантный белок VP2, по сравнению с капсидами, содержащими белок VP2 дикого типа. Стабильность можно повысить в отношении разных физических параметров, включающих в себя температуру, кислотность, гидродинамическое усилие и другие факторы, воздействию которых может подвергаться капсид FMDV в процессе получения и применения в качестве вакцинного антигена.

Примеры таких факторов, встречающихся при применении традиционных, связанных с вакцинами, технологий, включают в себя, например, химическую инактивацию в случае капсидов вирионов, хранение и транспортировку при разных температурах, а также композиции, содержащие адъювант.

Достигнутый уровень повышения стабильности можно определить с помощью ряда методов, таких как, например, центрифугирование в градиенте плотности сахарозы, гель-электрофорез, электронная микроскопия, термофлуориметрический анализ и т.д., как описано в данном документе.

Детали и варианты осуществления стадии "получения капсида FMDV, содержащего мутантный белок VP2 FMDV" описаны выше, и могут быть легко выполнены с использованием разных технологий рекомбинантных ДНК, включающих в себя совместную экспрессию и смешивание, приводящих к получению капсида FMDV.

В данном и других способах получения и применения мутантного белка VP2 FMDV настоящего изобретения предпочтительно используют технологию рекомбинантных ДНК, которая включает в себя применение молекулы нуклеиновой кислоты, способной

экспрессировать такой мутантный белок VP2 настоящего изобретения.

Таким образом, в следующем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения.

Термин "выделенный" следует понимать как: выделенный из природной среды посредством целенаправленного воздействия или вмешательства человека; например, с помощью процедуры биохимической очистки in vitro.

В данном описании термин молекула нуклеиновой кислоты, "кодирующая" белок, как правило, относится к: открытой рамке считывания (ORF), кодирующей мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения, и означает, что нежелательные стоп-кодоны, способные преждевременно остановить трансляцию белка, отсутствуют.

В соответствии с настоящим изобретением молекула нуклеиновой кислоты кодирует полноразмерный белок VP2 FMDV и может иметь природное или синтетическое происхождение.

В настоящем изобретении точная нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения не имеет большого значения при условии, что нуклеотидная последовательность обеспечивает экспрессию желательной аминокислотной последовательности, здесь: целевого мутантного белка VP2 FMDV. Однако в данной области хорошо известно, что один и тот же белок могут кодировать разные нуклеиновые кислоты вследствие "вырожденности генетического кода". Следовательно, две разные нуклеиновые кислоты, различие в последовательностях которых может составлять до 30%, все еще способны кодировать один и тот же белок.

В соответствии с настоящим изобретением молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой молекулу ДНК или РНК. Это зависит от исходного материала, используемого для выделения указанной молекулы, и от предполагаемого применения. Опытным специалистам в данной области хорошо известны способы выделения молекулы одного или другого типа из разных исходных материалов, а также способы превращения одного типа в другой.

Выделенную молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения можно вставить в вектор, такой как ДНК-плазмида, если она находится в виде ДНК. Это позволяет проводить ее амплификацию, например в бактериальных культурах, и манипулировать с ней с использованием разных методов молекулярной биологии. В продаже имеется широкий ряд подходящих плазмидных векторов.

Чтобы выделенная молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения могла в действительности экспрессировать мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения, необходимы соответствующие сигналы контроля экспрессии и соответствующие условия. Например, молекула нуклеиновой кислоты должна быть функционально связана с промоторным элементом, находящимся выше по ходу считывания, и должна содержать сигнал остановки транляции в конце кодирующей последовательности. Как правило, плазмиды и векторы, используемые в конкретной системе экспрессии, содержат такие сигналы. Био-молекулярные механизмы транскрипции и трансляции, как правило, предоставляются клеткой-хозяином, используемой для такой экспрессии. Путем изменения разных указанных элементов можно оптимизировать экспрессию мутантного белка VP2 настоящего изобретения, например, по времени, уровню и качество; причем такая оптимизация относится к сфере компетенции рядового специалиста в данной области.

Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения также содержит сигналы,

контролирующие экспрессию.

Рекомбинантная система экспрессии, подходящая для применения в настоящем изобретении, как правило, включает в себя клетку-хозяина, которую можно культивировать in vitro. В данной области в качестве клеток-хозяев, подходящих для применения в системах экспрессии, широко используют клетки бактерий, дрожжей, грибков, растений, насекомых или позвоночных.

Следовательно, в другом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей мутантный белок VP2 FMDV настоящего изобретения, капсид FMDV настоящего изобретения и/или выделенную молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения.

Клетку-хозяина настоящего изобретения, экспрессирующую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, можно эффективно использовать для получения мутантного белка VP2 FMDV настоящего изобретения. Предпочтительно клетка-хозяин настоящего изобретения также экспрессирует другие VP FMDV и обеспечивает сборку пустого капсида FMDV настоящего изобретения. В зависимости от характеристик и параметров системы экспрессии пустой капсид можно затем получить либо из клетки-хозяина, например, после лизиса, либо из культуральной среды с последующей обработкой и очисткой. Альтернативно клетку-хозяина, содержащую мутантный белок VP2 FMDV или пустой капсид FMDV настоящего изобретения, можно использовать как таковую, например, для применения в качестве вакцины.

Хорошо известный и эффективный способ экспрессии и/или доставки мутантного белка VP2 FMDV, капсида FMDV и/или выделенной молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения целевому животному включает в себя применение живого рекомбинантного микроорганизма-носителя (LRCM). LRCM может инфицировать целевое животное и реплицироваться в животном, или в его клетках. В данном способе молекула нуклеиновой кислоты, мутантный белок VP2 FMDV или капсид FMDV настоящего изобретения предоставляются иммунной системе целевого животного иначе, чем при инъекции вакцинной композиции. Такой способ может обеспечивать более эффективную стимуляцию иммунной системы.

Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к живому рекомбинантному микроорганизму-носителю (LRCM), содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения.

Такие LRCM включают в себя, например, рекомбинантные бактерии, паразиты, вирусы или дрожжевые клетки, способные выживать в целевых животных, подлежащих вакцинации против FMD. Доставка молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения может, например, стимулировать экспрессию такой молекулы в антиген-презентирующих клетках-мишенях целевого животного, с последующей презентацией полученного белка иммунной системе в составе MHC1 и/или MHC2, и тем самым индуцировать эффективный иммунный ответ.

Еще одно преимущество LRCM заключается в их способности к самораспространению, которая позволяет использовать для иммунизации лишь небольшие количества рекомбинантного носителя.

Следовательно, предпочтительные LRCM настоящего изобретения представляют собой микроорганизмы, которые могут реплицироваться в целевом животном, нуждающемся в вакцинации против FMD и включающем в себя крупный рогатый скот, буйволов, свиней, овец и коз. Кроме того, LRCM не должен быть (слишком) патогенным для целевого животного. Примеры таких подходящих LRCM включают в себя ослабленные или непатогенные изоляты бактерий, таких как E. coli, Salmonella;

паразитов, таких как Toxoplasma или Neospora; или вирусов, таких как вирус оспы (вакцинии, коровьей оспы), аденовирус, вирус герпеса или вирус бешенства. Специалист в данной области может сделать соответствующий выбор и провести адаптацию к конкретному целевому животному.

Чтобы сконструировать LRCM, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения стабильно внедряют в геном LRCM с помощью хорошо известного метода гомологичной рекомбинации in vitro. Альтернативно выделенную молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения можно ввести в LRCM экстрахромосомально с обеспечением временной или эписомальной экспрессии.

Как описано выше, предпочтительным способом применения вариантов осуществления настоящего изобретения является ветеринарное медицинское применение, в частности, для вакцинации против FMD.

Как хорошо известно в данной области, капсиды FMDV, которые являются более стабильными in vitro, при использовании в виде вакцин индуцируют более интенсивный гуморальный иммунный ответ. Причина этого заключается в том, что в образце присутствует больше неповрежденных капсидов; фактически это приводит к более высокой дозе антигена, обладающего повышенной иммуногенностью.

Тем не менее, для подтверждения, а также для иллюстрации успешного применения изобретения был проведен ряд экспериментов in vivo с использованием капсидов FMDV, содержащих мутантный белок VP2, либо в виде пустых капсидов, либо в виде капсидов вирионов, на основе которых получают вакцинные композиции против FMD, используемые для вакцинации животных. Подробное описание указанных экспериментов приведено ниже.

Вакцина против FMD, полученная на основе капсида, содержащего мутантный белок VP2 FMDV, подобного серотипу SAT-2, способна вызывать у морских свинок - даже после хранения в течение 1 месяца - вирус-нейтрализующий иммунный ответ у значительно большего числа вакцинированных животных, чем вакцина исходного штамма SAT-2 дикого типа: нейтрализующий уровень антител наблюдается у 10/10 животных, получающих капсиды настоящего изобретения, и только у 2/10 животных, получающих капсиды с незамещенным белком VP2.

Данный эксперимент повторяют с подобными мутантными и дикого типа вакцинами SAT-2, за исключением того, что в данном случае их хранят в течение 6 месяцев. Морских свинок вакцинируют и через 12 дней после вакцинации тестируют на сероконверсию. Серологический анализ демонстрирует, что у морских свинок, получающих вакцину на основе капсида, содержащего белок VP2 дикого типа, сероконверсия отсутствует, тогда как у 6/10 морских свинок, получающих вакцину на основе капсида, содержащего мутантный белок VP2, наблюдаются высокие уровни вирус-нейтрализующих антител. Подробное описание и результаты данных экспериментов можно найти в разделе Примеры.

Следовательно, в следующем аспекте настоящее изобретение относится к мутантному белку VP2 FMDV, капсиду FMDV, выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, клетке-хозяину и/или LRCM настоящего изобретения, которые подходят для применения в качестве вакцины против FMD.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к мутантному белку VP2 FMDV, капсиду FMDV, выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, клетке-хозяину и/или LRCM настоящего изобретения, которые можно использовать для вакцинации против FMD.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к вакцине против FMD,

содержащей мутантный белок VP2 FMDV, капсид FMDV, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, клетку-хозяина и/или LRCM настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению мутантного белка VP2 FMDV, капсида FMDV, выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, клетки-хозяина и/или LRCM настоящего изобретения, для промышленного получения вакцины против FMD.

"Вакцина" индуцирует у целевого животного иммунный ответ, который обеспечивает предотвращение заболевания или расстройства, улучшение состояния заболевания или расстройства, уменьшение восприимчивости к заболеванию или расстройству, или лечение заболевания или расстройства, возникающего в результате инфекции микроорганизма. Индуцированная вакциной защита достигается в результате введения, по меньшей мере, одной молекулы антигена, полученного из указанного микроорганизма. Указанная защита вызывает у целевого животного уменьшение числа микроорганизмов или интенсивности их функционирования, или клинических признаков, вызываемых микроорганизмом. Это может быть результатом уменьшения инвазии микроорганизма или уровня заболеваемости, обусловленной микроорганизмом, что приводит к сокращению числа или тяжести поражений и последствий, вызванных микроорганизмом, либо результатом ответа целевого животного на вакцину.

Термин "вакцина" подразумевает применение иммунологически эффективного количества антигенного соединения в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Антигенные соединения настоящего изобретения включают в себя мутантный белок VP2 FMDV, капсид FMDV, клетку-хозяина и/или LRCM настоящего изобретения.

В случае выделенной молекулы нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, указанная нуклеиновая кислота сама по себе не является антигеном, но продуцирует антиген при экспрессии в соответствующих условиях.

Иммунологически эффективное количество вакцины против FMD настоящего изобретения зависит от желаемого эффекта и от конкретных характеристик используемой вакцины. Определение эффективного количества относится к компетенции рядовых специалистов в данной области и может включать в себя, например, мониторинг иммунного ответа после вакцинации, или после инфицирования, например, путем регистрации клинических симптомов заболевания у целевого животного, серологических параметров, или повторного выделения возбудителя, и сравнения полученных результатов с ответами, наблюдающимися у животных, получающих суррогатную вакцину.

Эффективность вакцины настоящего изобретения определяют путем сравнения животных, получающих вакцину настоящего изобретения, и животных, получающих суррогатную вакцину. Способы оценки эффективности вакцины хорошо известны в данной области техники.

"FMD" представляет собой заболевание, которое характеризуется хорошо известными симптомами, и может быть диагностировано с помощью разных диагностических или микробиологических методов, хорошо известных в данной области.

Специалист в данной области может легко установить изменение уровня клинических симптомов FMD, вызываемое вакциной против FMD настоящего изобретения у целевого животного, путем регистрации уровня симптомов заболевания, обычно вызываемого FMDV, который выражают, например, в виде клинической оценки, с последующим сравнением влияния вакцинации на клинические оценки у животных, получающих вакцину настоящего изобретения, и у животных, получающих суррогатную вакцину.

"Фармацевтически приемлемый носитель" способствует эффективному введению активного соединения вакцины, не вызывая (тяжелого) неблагоприятного влияния на здоровье целевого животного, которому его вводят. Такой носитель может представлять собой, например, стерильную воду или стерильный физиологический солевой раствор. В более сложной форме носитель может представлять собой, например, буфер, который может содержать другие добавки, такие как стабилизаторы или консерванты. Подробное описание и примеры фармацевтически приемлемых носителей можно найти, например, в хорошо известных руководствах, таких как: "Remington: the science and practice of pharmacy" (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472), и: "Veterinary vaccinology" (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0444819681).

Другой благоприятный эффект вакцинации в соответствии с настоящим изобретением включает в себя предотвращение или уменьшение распространения FMDV в географической зоне, или в популяции, то есть предотвращение или уменьшение так называемого горизонтального распространения инфекции. Данный эффект способствует уменьшению распространенности FMDV. В данном варианте осуществления вакцина блокирует или, по меньшей мере, уменьшает передачу FMDV.

Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления вакцину против FMD настоящего изобретения можно использовать для уменьшения распространенности ящура в географической зоне.

Вакцина против FMD настоящего изобретения, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты настоящего изобретения в виде ДНК, фактически представляет собой так называемую "ДНК-вакцину". В таком варианте осуществления целевому животному вводят молекулу ДНК, которая после поглощения клетками экспрессируется с получением белка, презентируемого иммунной системе целевого животного, генерируя иммунный ответ. В данном случае экспрессируемый белок предпочтительно представляет собой пустой капсид FMDV настоящего изобретения. ДНК-вакцину можно вводить разными способами, и она может существовать в виде разных форм, например, в виде голой или модифицированной ДНК, или она может быть присоединена к носителю, или инкапсулирована в носитель, такой как золотые частицы.

Прямая ДНК-вакцинация успешно проводится для получения многих разных белков, например, как описано в Donnelly et al. (1993, The Immunologist, vol. 2, p. 20-26). ДНК-вакцинация в случае FMDV описана в Kim et al. (2006 J. of Gene Med., vol. 8, p. 1182).

Хотя капсид FMDV настоящего изобретения обладает повышенной биофизической стабильностью, вакцина против FMD настоящего изобретения может содержать стабилизатор, например, чтобы защитить чувствительные компоненты от деградации, увеличить срок годности вакцины, и/или повысить эффективность сушки из замороженного состояния. Как правило, стабилизаторы представляют собой крупные молекулы с высокой молекулярной массой, такие как липиды, углеводы или белки; их примерами являются молочный порошок, желатин, сывороточный альбумин, сорбит, трегалоза, спермидин, декстран или поливинилпирролидон, а также буферы, такие как растворы фосфатов щелочных металлов.

Предпочтительно стабилизатор не содержит соединений животного происхождения, или даже: с определенным химическим составом, как описано в WO 2006/094974.

Вакцина также может содержать консерванты, такие как тимеросал, мертиолат, фенольные соединения и/или гентамицин.

Само собой разумеется, что добавление к вакцинам настоящего изобретения других соединений, таких как носители, разбавители, эмульсии и т.п., также входит в объем настоящего изобретения. Такие добавки описаны в хорошо известных руководствах,

таких как: "Remington", и "Veterinary Vaccinology" (указаны выше).

По соображениям, например, стабильности или экономии, вакцина против FMD настоящего изобретения может находиться в лиофилизированном состоянии. Как правило, это обеспечивает длительное хранение при температуре выше нуля °C, например, при 4°C.

Способы лиофилизации известны специалистам в данной области техники, а оборудование для сушки из замороженного состояния в разных масштабах имеется в продаже.

Таким образом, в более предпочтительном варианте осуществления вакцина против FMD настоящего изобретения находится в лиофилизированном виде.

Чтобы восстановить лиофилизированную вакцинную композицию, ее суспендируют в физиологически приемлемом разбавителе. Обычно это делают непосредственно перед применением, чтобы гарантировать наилучшее качество вакцины. В качестве разбавителя можно использовать, например, стерильную воду или физиологический солевой раствор. Разбавитель, используемый для восстановления вакцины, сам может содержать дополнительные соединения, такие как адъювант. В другом варианте осуществления лиофилизированную вакцину можно суспендировать в эмульсии, как описано в EP 382.271

В другом варианте осуществления лиофилизированной вакцины настоящего изобретения разбавитель для вакцины поставляется отдельно от лиофилизированного кека, содержащего остаток вакцины, и предпочтительно представляет собой забуференный разбавитель. В данном случае лиофилизированная вакцина и композиция разбавителя образуют набор частей, который входит в объем настоящего изобретения.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления лиофилизированной вакцины против FMD настоящего изобретения, вакцина входит в состав набора, содержащего, по меньшей мере, два типа контейнеров, один из которых содержит лиофилизированную вакцину, а другой содержит водный разбавитель.

Вакцина против FMD настоящего изобретения может дополнительно содержать так называемое "средство доставки"; это соединение, к которому прилипают белки, нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева и/или LRCM настоящего изобретения, не образуя с ним ковалентных связей. Такие средства доставки включают в себя, в числе прочего, известные в данной области биомикрокапсулы, микроальгинаты, липосомы, макрозоли, гидроксид, фосфат, сульфат или оксид алюминия, диоксид кремния, Kaolin™ и Bentonite™.

Примером может служить средство доставки, в котором антиген частично встроен в иммуностимулирующий комплекс, так называемый ISCOM™ (EP 109.942, EP 180.564, EP 242.380).

Кроме того, вакцина против FMD настоящего изобретения может содержать один или несколько подходящих поверхностно-активных веществ или эмульгаторов, например компонент из семейства Span™ или Tween™.

Мишенью для применения вакцины против FMD настоящего изобретения, несомненно, являются животные, восприимчивые к инфекции FMDV, как описано выше. Однако возраст, вес, пол, иммунологический статус и другие параметры целевого животного, подлежащего вакцинации, не являются критическими. Тем не менее, очевидно, что вакцинацию предпочтительно проводить среди здоровых особей и как можно раньше, чтобы предотвратить любую полевую инфекцию. Целевые животные, подлежащие вакцинации против FMD настоящего изобретения могут быть сероположительными или сероотрицательными по FMDV или антителам против FMDV.

Поскольку инфекция FMDV может появиться уже в молодом возрасте, вакцину против FMD настоящего изобретения можно применять в течение первых 2 недель после рождения; однако в целях эффективной вакцинации в молодом возрасте нужно учитывать присутствие материнских антител.

Вакцина против FMD настоящего изобретения, которую в равной степени можно использовать в профилактических и терапевтических целях, препятствует как появлению, так и развитию инфекции FMDV или клинических симптомов вызываемого ею заболевания.

Вакцину против FMD настоящего изобретения можно эффективно использовать для примирующей вакцинации, которая может сопровождаться и усиливаться бустерной вакцинацией с использованием вакцины настоящего изобретения, или вакцины на основе инактивированного целого вируса FMDV.

Схема применения вакцины против FMD настоящего изобретения может включать в себя введение целевому животному одной или нескольких доз, которые можно вводить одновременно или последовательно с помощью способа, совместимого с используемой дозировкой и композицией, в количестве, иммунологически эффективном для целевого животного.

Схему введения вакцины против FMD настоящего изобретения предпочтительно интегрируют в существующие графики вакцинации данного целевого животного другими вакцинами.

В районах, где вакцинация против FMD широко распространена, стандартная процедура включает в себя повторяющиеся вакцинации с 6-месячными интервалами. Следовательно, вакцину против FMD настоящего изобретения предпочтительно используют в полугодовой дозе.

Вакцину против FMD настоящего изобретения можно вводить в дозах, содержащих от 0,1 до 1000 мкг капсида FMDV настоящего изобретения. В принципе, можно использовать более низкие или более высокие дозы; предпочтительно вакцинная доза включает в себя от 10 до 1000 мкг капсида FMDV настоящего изобретения.

Вакцину против FMD настоящего изобретения можно вводить в объеме, который является приемлемым для целевого животного, например, одна доза вакцины может составлять от 0,1 до 10 мл. Предпочтительно объем одной дозы составляет от 0,25 до 5 мл.

Вакцину против FMD настоящего изобретения можно вводить целевому животному с помощью способов, известных в данной области техники. Предпочтительный способ включает в себя парентеральное введение, например, путем любых инъекций в кожу или через кожу, таких как внутримышечные, внутривенные, внутрибрюшинные, внутрикожные, подслизистые или подкожные инъекции.

Само собой разумеется, оптимальный способ введения зависит от конкретной используемой вакцинной композиции и от конкретных характеристик целевого животного.

Предпочтительный способ введения вакцины против FMD настоящего изобретения включает в себя внутримышечную или подкожную инъекцию.

Вакцину против FMD настоящего изобретения можно эффективно использовать в качестве маркерной вакцины, если вакцина содержит пустой капсид FMDV настоящего изобретения. Маркерная вакцина известна как вакцина, которая позволяет различать вакцинированных и инфицированных субъектов (так называемый: принцип DIVA). Такое различие можно детектировать, например, путем регистрации характеристического спектра антител против маркерной вакцины, который отличается

от спектра антител, индуцированного инфекционным агентом дикого типа. В настоящем изобретении это различие можно определить, например, в отношении антител против неструктурных белков FMDV; такие антитела генерируются в случае инфекции реплицирующегося вириона FMDV, но не в случае введения пустого капсида. Такую детекцию удобно проводить методом серологического анализа, такого как ELISA или иммунофлуоресцентный анализ.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления вакцина против FMD настоящего изобретения представляет собой маркерную вакцину.

Дальнейшая оптимизация вакцины против FMD настоящего изобретения относится к компетенции специалиста в данной области. Как правило, такая оптимизация включает в себя тонкую регуляцию эффективности вакцины, чтобы она обеспечивала достаточную иммунную защиту. Указанную регуляцию можно проводить путем адаптации дозы, объема или антигенного состава вакцины; путем применения вакцины в другой форме или в составе другой композиции; путем адаптации других компонентов вакцины (например, стабилизатора или адъюванта); или путем введения вакцины посредством другого способа.

Вакцина против FMD настоящего изобретения может дополнительно содержать другие соединения, такие как адъювант, дополнительный антиген, цитокин, и т.д. Альтернативно вакцину против FMD настоящего изобретения можно объединяют с фармацевтическим компонентом, таким как антибиотик, гормон или противовоспалительное средство.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина против FMD настоящего изобретения содержит адъювант.

"Адъювант" представляет собой хорошо известный ингредиент вакцины, который, как правило, представляет собой вещество, способное стимулировать неспецифический иммунный ответ у целевого животного. В данной области известно много разных адъювантов. Примеры адъювантов включают в себя: полный и неполный адъювант Фрейнда, витамин Е, неионные блок-полимеры и полиамины, такие как сульфат декстрана, карбопол и пиран, соединения алюминия, такие как фосфат алюминия или гидроксид алюминия, сапонин, предпочтительно QuilA™ и др. Кроме того, в качестве адъюванта можно эффективно использовать такие пептиды, как мурамилдипептиды, диметилглицин, туфтсин, а также минеральное масло, например, Bayol™ или Markol™, Montanide™ или светлое парафиновое масло, растительные масла или комбинированные продукты, такие как ISA™ от Seppic™, или DiluvacForte™. Эмульсия может относиться, например, к типу вода в масле (в/м), масло в воде (м/в), вода в масле в воде (в/м/в), или двойная масляная эмульсия (DOE).

Предпочтительным адъювантом для вакцины против FMD настоящего изобретения является адъювант, содержащий композицию квасцов или масляную эмульсию. Более предпочтительным является сочетание квасцов и масляной эмульсии.

Само собой разумеется, другие способы добавления адъювантов, средств доставки или разбавителей, эмульгирования или стабилизации вакцины также входят в объем настоящего изобретения. Такие добавки описаны, например, в известных справочниках.

Вакцину против FMD настоящего изобретения можно эффективно сочетать с другим антигеном.

Следовательно, в более предпочтительном варианте осуществления вакцина против FMD настоящего изобретения представляет собой комбинированную вакцину, содержащую другой иммуноактивный компонент.

"Другой иммуноактивный компонент" может представлять собой антиген, вещество,

усиливающее иммунный ответ и/или вакцину; все они могут содержать адъювант.

Если другой иммуноактивный компонент используется в качестве антигена, он может включать в себя любой антигенный компонент, имеющий применение в ветеринарии. Например, он может содержать биологическую или синтетическую молекулу, такую как молекула белка, углевода, липополисахарида или нуклеиновой кислоты, кодирующей белковый антиген. Кроме того, клетку-хозяина, содержащую такую нуклеиновую кислоту, или LRCM, содержащий такую молекулу нуклеиновой кислоты, можно использовать в качестве средства доставки молекулы нуклеиновой кислоты или другого иммуноактивного компонента. В качестве альтернативы другой иммуноактивный компонент может содержать фракционированный или убитый микроорганизм, такой как паразит, бактерия или вирус, или субъединицу любого из них.

Другой иммуноактивный компонент (компоненты) может находиться в виде вещества, усиливающего иммунный ответ, такого как хемокин, или иммуностимуляторная нуклеиновая кислота, содержащая мотив CpG. Альтернативно вакцину против FMD настоящего изобретения саму можно добавить к вакцине.

В предпочтительном варианте осуществления вакцина настоящего изобретения может содержать сочетание одного или нескольких из мутантных белков VP2, капсида FMDV и/или вакцины против FMDV настоящего изобретения, чтобы обеспечить эффективную иммунную защиту против определенного серотипа FMDV.

В другом предпочтительном варианте осуществления вакцина настоящего изобретения может содержать сочетание одного или нескольких из мутантных белков VP2, капсида FMDV и/или вакцины против FMDV настоящего изобретения, полученных из разных серотипов FMDV, чтобы обеспечить эффективную и широкую иммунную защиту против нескольких серотипов FMDV.

В другом предпочтительном варианте осуществления вакцину настоящего изобретения можно объединить с вакциной против FMDV, которая не является вакциной настоящего изобретения, такой как вакцина на основе инактивированного FMDV или субъединицы FMDV, с получением комбинированной вакцины против FMD широкого спектра действия.

В другом предпочтительном варианте осуществления вакцина против FMD в соответствии с настоящим изобретением содержит антигены, полученные из нескольких серотипов FMDV; более предпочтительно, вакцина против FMD является поливалентной и защищает от нескольких вариантов, относящихся к определенному серотипу FMDV, причем фактическое сочетание антигенов определяется преобладанием в географической зоне.

В предпочтительном варианте осуществления комбинированная вакцина настоящего изобретения характеризуется тем, что другой иммуноактивный компонент, или молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая другой иммуноактивный компонент, представляет собой микроорганизм, способный инфицировать животное, которое в тоже время является целевым животным для вакцины против FMD настоящего изобретения, или другой иммуноактивный компонент получен из такого микроорганизма.

Преимущество такой комбинированной вакцины настоящего изобретения заключается в том, что она индуцирует иммунный ответ не только против FMD, но и против других патогенов, и при этом требует лишь однократной вакцинации целевых животных, что позволяет избежать у целевых животных ненужного стресса от вакцинации и снизить затраты времени и расходы на оплату труда.

Примеры указанных других иммуноактивных компонентов включают в себя, по существу, все вирусные, бактериальные и паразитарные патогены, пригодные для

вакцинации животного, которое также является целевым животным для вакцины против FMD настоящего изобретения.

Например, для свиней в качестве другого иммуноактивного компонента можно использовать: цирковирус свиней, вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома, вирус псевдобешенства, свиной парвовирус, вирус классической чумы свиней, микоплазму пневмонии, Lawsonia intracellularis, кишечную палочку, стрептококки, сальмонеллу, клостридии, возбудитель актинобациллезной плевропневмонии, Pasteurella, Haemophilus, Erysipelothrix, Bordetella, токсоплазму, Isospora, трихинеллы и др.

Для крупного рогатого скота в качестве другого иммуноактивного компонента можно использовать: Neospora, Dictyocaulus, Cryptosporidium, Ostertagia, Babesia, Theileria, Anaplasma, Trypanosoma, Cowdria, токсоплазму, ротавирус крупного рогатого скота, вирус диареи крупного рогатого скота, коронавирус крупного рогатого скота, вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (вирус бычьего герпеса), бычий парамиксовирус, вирус бычьего парагриппа, бычий респираторно-синцитиальный вирус, вирус бешенства, вирус катаральной лихорадки, Pasteurella haemolytica, кишечную палочку, сальмонеллу, стафилококки, микобактерии, Brucella, клостридии, Mannheimia, Haemophilus, Fusobacterium и т.д.

Для овец или коз в качестве другого иммуноактивного компонента можно использовать: Toxoplasma, Neospora, Cowdria, Babesia, Theileria, Anaplasma, Eimeria, трипаносомы, вирус чумы мелких жвачных животных, вирус катаральной лихорадки, вирус Шмалленберга, микобактерии, бруцеллы, клостридии, Coxiella, кишечную палочку, хламидии, клостридии, Pasteurella, Mannheimia и др.

Вакцину против FMD настоящего изобретения получают с помощью способов, хорошо известных специалистам в данной области.

Таким образом, в следующем аспекте настоящее изобретение относится к способу получения вакцины против FMD настоящего изобретения, который включает в себя смешивание мутантного белка VP2 FMDV, капсида FMDV, выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, клетки-хозяина и/или LRCM настоящего изобретения с фармацевтически приемлемым носителем.

Вакцину против FMD настоящего изобретения можно получить с помощью описанных здесь способов, которые специалист в данной области может легко использовать. Например, капсид FMDV настоящего изобретения получают в промышленности в маленьких или больших объемах, либо путем репликации капсида вириона в соответствующих клетках-хозяевах, либо путем экспрессии пустого капсида в клетках-хозяевах системы экспрессии. Такие культуры собирают, либо в виде целых клеток или в виде клеточных лизатов.

В случае капсидов инфекционных вирионов FMDV конечный продукт культуры in vitro, как правило, сначала инактивируют. Инактивацию можно проводить несколькими способами, чаще всего, путем химической инактивации, например, формалином, бета-пропиолактоном (BPL), бинарным этиленимином (BEI) или бета-этаноламином (BEA).

Лизат можно получить физическими (с использованием френч-пресса, путем обработки ультразвуком) или химическими (путем обработки детергентами) способами. Суспензию можно дополнительно очистить или сконцентрировать, например, центрифугированием или фильтрацией. Затем полученный антигенный препарат смешивают с фармацевтически приемлемыми наполнителями с получением вакцины, после чего вакцинную композицию помещают в контейнеры соответствующих размеров. Протекание разных стадий производственного процесса контролируют с помощью подходящих анализов, таких как иммунологические анализы качества и количества

антигенов; микробиологическое тестирование на инактивацию, стерильность и отсутствие посторонних агентов; и, наконец, путем обследования животных с целью определения эффективности и безопасности вакцин. Все указанные анализы хорошо известны специалистам в данной области. После экстенсивного тестирования на качество, количество и стерильность такие вакцинные продукты поступают в продажу.

Общие методы и принципы, используемые для получения вакцин, хорошо известны в данной области и описаны, например, в правительственных постановлениях (Pharmacopoeia) и в руководствах, таких как: "Veterinary vaccinology" и "Remington" (выше).

Вакцина против FMD настоящего изобретения может находиться в виде любой формы, подходящей для введения целевым животным, и соответствующей желательному способу введения и от желательному эффекту.

Предпочтительно вакцину против FMD настоящего изобретения получают в виде формы, подходящей для инъекции, например, в виде жидкости для инъекций, такой как суспензия, раствор, дисперсия или эмульсия. Как правило, такие вакцины получают в стерильном виде.

Эмульсия для применения в настоящем изобретении может относиться, например, к типу в/м, м/в, в/м/в или DOE.

Как описано выше, вакцину против FMD настоящего изобретения можно использовать для введения соответствующим целевым животных разными способами.

Следовательно, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу вакцинации против FMD животного, восприимчивого к FMDV, включающему в себя стадию инокуляции животного с вакциной против FMD настоящего изобретения.

Далее настоящее изобретение описывается со ссылкой на нижеследующие неограничивающие примеры.

Примеры

1. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

1.1. Клетки и вирусы

Клетки почки детеныша хомячка (BHK) клона 13 (штамм 21; ATCC CCL-10) поддерживают в соответствии со стандартными процедурами. Исходные препараты FMDV амплифицируют и титруют в клетках BHK-21 с помощью стандартных методов. Культуры клеток BHK-21 также используют для РНК-трансфекции и выделения вируса. Кроме того, анализы бляшкообразования проводят на клетках IB-RS-2 (Instituto Biologico renal suino) или на клетках яичника китайского хомячка (CHO) (штамм K1; ATCC CCL-61), соответственно культивируемых в среде RPMI (Sigma) и в среде Хэма F-12 (Invitrogen) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS, Delta Bioproducts).

Одностадийный кинетический анализ роста капсидов вирионов FMDV проводят на клетках BHK-21. Кратко: клетки BHK-21 инфицируют вирусом в течение 1 ч при множественности заражения 2-4 БОЕ/клетку, промывают MBS-буфером (25 мМ морфолин-этансульфоновая кислота, 145 мМ NaCl, pH 5,5). После инкубации при 37°C в течение указанных интервалов времени, инфицированные клетки собирают через 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 и 20 ч после инфекции (p.i.) и замораживают при -70°C. Определяют титры вируса, выражая их в бляшкообразующих единицах на миллилитр (БОЕ/мл).

Выделение вируса после клонирования инфекционных копий проводят на первичных клетках почки свиньи (PK), как описано в Maree et al. (2010, Virus Res., vol. 153, p. 82). Культивирование, пассажи и амплификацию вирусов FMD дикого типа и рекомбинантных вирусов FMD проводят на клетках BHK-21; монослои инфицированных или трансфицированных клеток BHK-21 35 мм замораживают и оттаивают, после чего

1/10 часть объема используют для инокуляции свежего монослоя ВНК-21. После адсорбции вируса (при периодическом встряхивании в течение 60 мин при 37°C) добавляют среду для культивирования вируса (VGM; минимальная среда Игла (BME), содержащая 1% FCS, 1% HEPES и антибиотики) и культуру инкубируют в течение не более 48 ч при 37°C, после чего инфицированные клетки замораживают для последующих пассажей вирусов.

1.2. Инфекционные клоны FMDV

Технологию инфекционных клонов используют в качестве подходящего способа получения капсидов инфекционных вирионов, содержащих конкретный мутантный белок VP2. В основном используют процедуры, описанные в Rieder et., al. (1994, J. Virol., vol.68, p. 7092). Кратко:

1.2.1. Конструирование

Копию кДНК геномной длины вакцинного штамма SAT-2, ZIM/7/83, конструируют с помощью стратегии обмена кассет, используя клон FMDV A12 геномной длины в качестве матрицы, как описано (Rieder et al., 1993, J. of Virol., vol. 67, p. 5139; Van Rensburg et al., 2002, Ann. NY Acad. Sci. vol. 969, p. 83). Указанную исходную конструкцию используют для трансфекции синтезированных in vitro РНК-транскриптов, с последующим выделением инфекционных вирусных частиц. Затем проводят оптимизацию, чтобы обеспечить непосредственную трансфекцию клеток ВНК-21 ДНК с заменой участка, кодирующего внешнюю часть капсида. Данную систему используют для получения синтетической РНК или плазмидной ДНК для трансфекции клеток ВНК-21 и генерирования жизнеспособного SAT-2 FMDV.

1.2.2. Направленный мутагенез

Направленный мутагенез инфекционных клонированных плазмид проводят методом ПЦР с перекрыванием-удлинением ампликона, используя набор для мутагенеза QuickChange XLII™ (Clontech) в соответствии с инструкциями производителя (Papworth et al., 1996, Strategies, vol. 9, p. 4). Коротко говоря, каждый из процессов ПЦР включает в себя применение двух геном-специфичных перекрывающихся (обратно комплементарных) олигонуклеотидов для введения мутаций в разные продукты ПЦР. Конструируют мутагенные праймеры, содержащие от 40 до 49 нуклеотидов в длину и кодирующие желательную мутацию, с участком перекрывания с вирусной последовательностью, содержащем от 15 до 20 нуклеотидов, с обеих сторон от мутации. ПЦР проводят, используя полимеразу Pfu Ultra Taq™, в циклических условиях, включающих в себя: 95°C в течение 50 сек, 60°C в течение 60 сек, и 68°C в течение 6 мин (18 циклов).

Ампликоны ПЦР вырезают с помощью соответствующего фермента рестрикции и используют для трансфекции ультра-компетентных клеток E. coli XL10-Gold™. После подтверждения введения нуклеотидных мутаций путем секвенирования, фрагмент ДНК, содержащий участок, кодирующий мутантный белок VP2, вставляют в плазмиду для последующего клонирования ДНК.

1.2.3. Синтез РНК in vitro, трансфекция и выделение вируса

РНК синтезируют на линеаризованных матрицах, содержащих плазмидную ДНК, с помощью набора MEGAscript™ T7 (Ambion). РНК-транскрипты анализируют методом электрофореза в агарозном геле, чтобы оценить их целостность, и определяют концентрации РНК методом спектрофотометрии. Монослои клеток ВНК-21 в лунках для культивирования клеток размером 35 мм (Nunc™) трансфицируют полученной in vitro РНК с использованием Lipofectamine2000™ (Invitrogen). Среду для трансфекции удаляют через 3-5 ч, заменяя ее на среду для культивирования вируса, с последующей

инкубацией при 37°C в течение 48 ч в атмосфере 5% CO_2. После одного цикла замораживания-оттаивания супернатанты трансфицированных клеток используют для серийных пассажей на клетках ВНК-21. Монослои клеток ВНК-21 в лунках для культивирования клеток размером 35 мм инфицируют с использованием 1/10 объема осветленных супернатантов инфицированных клеток и инкубируют в течение 48 ч при 37°C. Затем вирусы собирают из инфицированных клеток после цикла замораживания-оттаивания и проводят четыре пассажа на клетках ВНК-21, используя 10% объема супернатанта от предыдущего пассажа. После выделения жизнеспособных (рекомбинантных) вирусов их целостность подтверждают еще раз методом автоматического секвенирования с использованием набора для проведения реакций циклического секвенирования ABI PRISM™ BigDye Terminator v3.0 (Perkin Elmer Applied Biosystems).

Как правило, перед анализом вирусы пересаживают четыре раза.

1.2.4. Экстракция РНК, синтез кДНК и ПЦР-амплификация

РНК экстрагируют из лизатов инфицированных клеток с использованием либо стандартного метода экстракции нуклеиновых кислот на основе гуанидина, либо реагента TRIzol™ (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя, и используют в качестве матрицы для синтеза кДНК. Вирусную кДНК синтезируют с помощью набора Superscript III™ (Life Technologies), как описано в Bastos et al. (2001, Arch. Virol., vol. 146, p. 1537).

1.3. Анализ нейтрализации вируса

Детекцию ответа, опосредованного вирус-нейтрализующими антителами, у вакцинированных животных проводят с помощью анализа микронейтрализации, в основном, следуя способу, описанному в OIE Manual of Standards (2009). Стандартную сыворотку крупного рогатого скота получают после двух последовательных вакцинаций (вакцинация на 0 день, бустер-вакцинация на 28 день и забор крови на 38 день) FMDV, который является аналогичным или эквивалентным вирусу, против которого развивается гуморальный ответ, детектируемый в данном анализе. Клетки IB-RS-2 используют в анализе нейтрализации в качестве индикаторной системы. Конечный титр сыворотки против гомологичных и гетерологичных вирусов рассчитывают как величину, обратную последнему разведению сыворотки, способному нейтрализовать 100 TCID50 вируса в 50% лунок. Рассчитывают односторонние антигенные отношения (значения R1) вирусов FMDV дикого типа и рекомбинантных вирусов FMDV по сравнению со стандартной сывороткой и выражают их в виде отношения титра гетерологичной/гомологичной сыворотки. Все определения титра нейтрализующих антител повторяют, по меньшей мере, дважды.

1.4. Очистка в градиенте плотности сахарозы

Разделение в градиенте плотности сахарозы используют для очистки капсидов вирионов, а также пустых капсидов, на разных стадиях продукции, инактивации или сбора.

Собирают пустые капсиды FMDV из системы экспрессии, например, на основе вируса коровьей оспы или бакуловируса, наносят на раствор сахарозы с градиентом 15-45% и центрифугируют в течение 20 ч при 22000 об/мин (ротор SW41, Beckman) при 12°C.

Капсиды вирионов FMDV собирают из клеточной культуры, осветляют, концентрируют с использованием 8% (масс/об) ПЭГ 6000 при 4°C. Осадок растворяют в 50 мМ HEPES (pH 8,0), содержащем 200 мМ NaCl и 1% NP40, и разделяют в градиенте плотности сахарозы 10-50% (масс/об) в HEPES/NaCl путем зонального центрифугирования при 36000×g в течение 16 ч при 4°C. Затем каждый градиент

фракционируют и фракции анализируют методом спектрофотометрии путем измерения поглощения при 260 нм. Фракции, содержащие вирионы 146S подвергают количественной оценке на основе поглощения и объединяют для анализа. Присутствие внешних белков капсида подтверждают методом белкового электрофореза в агаре-
5 геле с использованием стандартных методов SDS-PAGE или Вестерн-блоттинга. Целостность РНК в капсидах вирионов подтверждают методом ОТ-ПЦР и секвенирования участка, кодирующего VP1.

1.5. Бакуловирусная система экспрессии

Систему экспрессии бакуловирус/клетки насекомых (BVES) используют для
10 экспрессии пустых капсидов FMDV, содержащих либо исходный, либо мутантный белок VP2. Процедуры проводят, в основном, по способу, описанному в (Porta et al., 2013, J. Virol. Methods, vol. 187, p. 406). Кратко: клетки Sf9 выращивают в среде Insect-XPRESS™ (Lonza), содержащей 2% FCS и антибиотики при 27,5°C. Переносящий вектор AcMNPV и бакмиду K01629 (0,5 мкг каждого) смешивают в присутствии 3 мкл Fugene™ (Roche)
15 в течение 20 мин при комнатной температуре и используют для трансфекции клеток Sf9 при плотности $1,2\times10^6$/лунку в 6-луночном планшете.

Поскольку ДНК бакуловируса с нокаутом гена 1629 не инициирует инфекцию, если только она не подвергается спасению в результате рекомбинации с переносящим бакуловирусным вектором, то AcMNPV, собранный из культурального супернатанта
20 через 5 дней, представляет собой 100% рекомбинантный вирус. Исходные препараты вирусов получают путем инфицирования монослоев клеток Sf9 при 70% слиянии 200 мкл инокулята рекомбинантного вируса в колбе 175 $см^2$ и собирают из культуральных супернатантов через 5 дней. Альтернативно используют прилипшую клеточную культуру
25 в роллер-флаконах и суспензионные культуры объемом 2 л. Для экспрессии пустых капсидов клетки Sf9 с плотностью 1-2 10^6/мл инфицируют 1/10 объема исходного препарата бакуловируса. Через 3 дня вирус экстрагируют, используя 1% тритон X-100 в присутствии 5 мкл/мл смеси ингибиторов протеаз (Sigma).

1.6. Система экспрессии на основе вируса коровьей оспы

30 Систему экспрессии на основе вируса коровьей оспы используют для экспрессии пустых капсидов FMDV, содержащих либо белок VP2 дикого типа, либо мутантный белок VP2. Процедуры, которые в основном проводят по способу, описанному King et. al. (выше), применяют к серотипам O, SAT2 и A. Вкратце процедуры на примере A22 можно описать следующим образом.

35 1.6.1. Векторы-переносчики вируса коровьей оспы

Конструируют кассету экспрессии на основе последовательности A22 Iraq FMDV, синтезируют de novo (Geneart™) и клонируют в векторе pBG200, переносящем вирус коровьей оспы, ниже промотора T7. Замена фрагмента BstEII-SpeI на последовательность, кодирующую мутацию VP2 H93F, превращает плазмиду pBG200-
40 A22-wt в pBG200-A22-H93F.

1.6.2. Получение и отбор рекомбинантных вирусов коровьей оспы

Рекомбинантные вирусы коровьей оспы получают путем трансфекции плазмид pBG200-A22-wt и pBG200-A22-H93F в клетки CV-1, инфицированные штаммом WR вируса коровьей оспы (VV). Рекомбинантные VV (с прерывным геном тимидинкиназы)
45 отбирают в клетках HuTK-143 с использованием 5-бром-2-дезоксиуридина. После трех циклов очистки бляшек в сочетании со скринингом методом ПЦР с использованием FMDV-специфичных праймеров получают стабильные рекомбинантные VV. Их амплифицируют в клетках RK13 и исходные препараты вирусов титруют путем анализа

бляшкообразования на клетках BS-C-1. Все клетки млекопитающих выращивают при 37°C в среде DMEM, содержащей 10% FCS и соответствующие антибиотики.

1.6.3. Осаждение пустых капсидов, полученных путем экспрессии вируса коровьей оспы

Клетки RK13 в колбе 175 $см^2$ инфицируют либо vA22-wt, либо vA22-H93F при MOI 10 и vTF7.3 при MOI 5. Через 24 ч клетки собирают центрифугированием при 2000×g в течение 5 мин при 4°C и осадок ресуспендируют в 1 мл 0,5% Ipegal™ (Sigma) в растворе, содержащем 40 мМ фосфат натрия и 100 мМ NaCl, pH 7,6. Образцы инкубируют на льду в течение 20 мин, осветляют, загружают на градиент сахарозы 15-45% и центрифугируют в течение 20 ч при 22000 об/мин (ротор SW41, Beckman) при 12°C. Каждый градиент фракционируют на 12 фракций по 1 мл и аликвоты анализируют методом вестерн-блоттинга.

1.7. Анализы диссоциации капсидов

Капсиды FMDV, содержащие белок VP2 дикого типа и мутантный белок VP2, содержащий ящура, присутствующие в супернатантах клеточных культур или в образцах, очищенных в градиенте сахарозы, помещают в стандартный буфер TNE, и подвергают воздействию разных значений pH или температуры, чтобы оценить их стабильность.

1.7.1. pH-стабильность капсидов вирионов

Кратко: от 10^6 до 10^7 БОЕ/мл капсидов инфекционных вирионов FMDV смешивают с буфером TNE (предпочтительно pH выше 7) в соотношении 1:50 об/об соответственно. Затем смеси инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. В качестве контроля вирусные частицы смешивают со средой для культивирования вируса в том же соотношении. Затем образцы нейтрализуют 1 М трис (pH 7,4), 150 мМ NaCl, и титруют на клетках BHK-21. Альтернативно очищенные в градиенте сахарозы частицы с титром, составляющим примерно 4-8×10^6 БОЕ/мл подвергают воздействию pH 6,0 в течение разных временных интервалов с последующим разведением 1:50 буфером TNE.

1.7.2. Термостабильность капсидов вирионов

Альтернативно капсиды вирионов FMDV в буфере TNE (pH 7,4) подвергают воздействию температур 25, 37, 45 или 55°C в течение 30 минут на водяной бане, после чего образцы охлаждают на льду и титруют. Разведение 1:50 частиц, очищенных в градиенте сахарозы, гарантирует что стабилизирующий эффект сахарозы является незначительным. Кроме того, очищенные в градиенте сахарозы частицы с титром, составляющим примерно 4-8×10^6 БОЕ/мл нагревают при 42°C или 49°C в течение разных периодов времени.

Число капсидов инфекционных вирионов FMDV, остающееся после воздействия низких значений pH или высокой температуры, определяют путем титрования бляшек на клетках BHK-21. Соответствующие логарифмические значения титров вирусов в разные моменты времени подгоняют с получением линейной зависимости и определяют угол наклона. Также рассчитывают процент оставшихся инфекционных частиц и строят график с учетом экспоненциального снижения, используемого для расчета константы скорости инактивации.

1.7.3. Анализ стабильности пустых капсид

Аликвоту фракции, содержащей пустые капсиды, объемом 200 мкл, разводят 1:3 либо (i) фосфатным буфером, pH 7,6, с последующей инкубацией на водяной бане при 56°C в течение 2 ч, либо (ii) 50 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 4,6, до конечного значения pH 5,2 с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 15 мин перед нейтрализацией NaOH. Обработанные образцы загружают на градиент

сахарозы 15-45% и центрифугируют. Каждую фракцию осаждают равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония в течение ночи при 4°C. Осадки собирают центрифугированием при 16000×g в течение 15 мин при 4°C и анализируют методом вестерн-блоттинга.

1.8. Анализы методом ELISA

ELISA проводят по способу, описанному Harmsen et al. (выше). Коротко говоря, речь идет о сэндвич-методе ELISA с двойным набором антител для количественного определения капсидов FMDV, который проводят с использованием одного из двух однодоменных фрагментов антител, полученных из ламы и обладающих специфичностью к таким структурам FMDV, как капсид вириона 146S (антитело M170) или пентамер 12S (антитело M3). С помощью 146S-специфичного ELISA можно обнаружить только штаммы серотипа O, тогда как 12S-специфичный ELISA позволяет детектировать штаммы большинства серотипов. Тем не менее, концентрацию 146S в штаммах FMDV серотипов A и Asia 1 можно измерить косвенно с использованием 12S-специфичного ELISA после предварительного превращения частиц 146S в частицы 12S путем термообработки. Стабильность определяют путем термофлуориметрического анализа.

1.9. Электронная микроскопия

ЭМ используют для определения уровня интактности капсидов вирионов после химической инактивации и пустых капсидов после термической обработки.

Очищенные химически инактивированные капсиды вирионов дикого типа и содержащие VP2 S93Y анализируют методом электронной микроскопии после хранения в течение 10 суток при 4°C. Образцы оставляют прилипать на формваровых сетках с углеродным покрытием в течение 30 с, после чего дважды промывают водой и окрашивают 1% ацетатом уранила в течение 45 с. Избыток красителя удаляют путем промакивания и сетки анализируют с помощью электронного микроскопа FEI T12 при 80 кэВ. В случае пустых капсидов, очищенные капсиды дикого типа и капсиды, содержащие VP2 S93F, нагревают при 56°C в течение 2 часов и затем анализируют методом ЭМ.

1.10. Термофлуориметрические анализы

Анализ термофлуориметрического сдвига проводят по описанному способу (Walter et al., 2012, выше) с целью измерения и сравнения температурной стабильности капсидов инфекционных вирионов FMDV; стабильность капсидов FMDV, содержащих либо мутантный белок VP2, либо белок VP2 дикого типа, определяют по высвобождению вирусной РНК путем детекции РНК-специфичного флуоресцентного красителя SYBR Green™. Используют градиент температуры 25-95°C и высвобождение вирусного генома детектируют по увеличению флуоресценции в результате диссоциации капсида на пентамеры.

1.11. Инактивация FMDV

Мутантные и дикого типа FMDV собирают из монослоев инфицированных клеток BHK-21 и инактивируют 5 мМ бинарным этиленимином (BEI) в течение 26 ч при 26°C. Затем их концентрируют с использованием ПЭГ и очищают в градиенте сахарозы. BEI-инактивированные, очищенные в градиенте сахарозы антигены используют для получения вакцин, подходящих для вакцинации животных.

1.12. Эксперименты по вакцинации животных

Вакцины, полученные из капсидов FMDV, тестируют на стандартной серологической модели FMDV у морской свинки, чтобы оценить их иммуногенную активность и продолжительность гуморального ответа в зависимости от их антигенной стабильности.

Вакцинные антигены включают в себя либо капсиды FMDV дикого типа, либо капсиды, содержащие мутантный VP2 с заменой S93Y, штамма дикого типа. Их тестируют как в виде капсидов инактивированных вирионов, так и в виде пустых капсидов, относящихся к серотипу SAT-2, или к серотипу O, соответственно. Все эксперименты на животных проводят в полном соответствии с установленными законом правилами по содержанию животных. Группы из 10 морских свинок получают 0,2 мл дозы тестируемой или контрольной вакцины путем внутримышечного введения, заборы крови осуществляют в нулевой день и в разные моменты времени на протяжении эксперимента. Содержание FMDV-нейтрализующих антител в сыворотке определяют с использованием теста нейтрализации вируса (VN) в соответствии с руководствами OIE.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

2.1. Анализы термостабильности

2.1.1. Стабильность капсидов инфекционных вирионов

Кинетика диссоциации

Капсиды инфекционных вирионов подвергают анализам с целью определения кинетики диссоциации, сравнивая капсиды вирионов дикого типа и капсиды вирионов, содержащие мутантный белок VP2. Капсиды вирионов обоих типов с титром $2\text{-}10\times10^5$ БОЕ/мл инкубируют при 49°C в течение 2 часов. Определяют число инфекционных частиц, оставшихся интактными после данной обработки. Профили температурной инактивации частиц соответствуют линейной кинетике, а лабильность разных вирусов выражают в виде найденных значений константы скорости инактивации; указанные значения составляют для SAT-2 дикого типа: 0,0155/мин; для SAT-2 VP3 E198A: 0,0163/мин; и для SAT-2 VP2 S93Y: 0,0075/мин.

Полученные результаты демонстрируют, что скорости инактивации частиц дикого типа и содержащих заместительный мутант VP3 (контроль) являются практически одинаковыми, тогда как скорость инактивации мутанта VP2 S93Y значительно ниже. Это свидетельствует о повышенной термостабильности капсидов FMDV, содержащих мутантный белок VP2 настоящего изобретения, по сравнению с капсидами, содержащими белок VP2 дикого типа, или с капсидами, содержащими белок VP2 с произвольными заменами.

В результате определения процента капсидов инфекционных вирионов FMDV, оставшихся после тепловой обработки, было обнаружено, что после инкубации при 49°C в течение 2 часов остается примерно 15% капсидов вирионов SAT-2 VP2 S93Y и лишь 1,4% вируса SAT-2 дикого типа и заместительного мутанта SAT-2 VP3 E198A.

Термофлуориметрические анализы

Анализ термофлуориметрического сдвига используют для непосредственного измерения стабильности капсидов FMDV при изменении температуры. В данном анализе определяют высвобождение РНК при диссоциации капсида путем детекции РНК-специфического флуоресцентного красителя, который связывается с вирусным геномом. Вирионы очищают в градиенте сахарозы и инактивируют BEI. Концентрации вирионов в образцах составляют от 140 до 420 мкг/мл. В качестве контроля используют изолят 24 FMDV серотипа A.

Поскольку острые четкие пики обычно наблюдаются в первой производной флюоресценции при постоянном нагревании, пиковые температуры используют в качестве непосредственного показателя температуры диссоциации для данной вирусной конструкции. Получают следующие результаты: SAT-2 VP2 S93Y диссоциирует при 53°C, SAT-2 VP2 S93H при 51°C, и SAT-2 дикого типа при 47°C, см. фигуру 4.

Контрольные образцы: вирус FMDV A24, который имеет наивысшую температуру диссоциации 55°C, однако это только на 2 градуса выше, чем температура диссоциации мутанта SAT-2 VP2 S93Y. Капсид вириона, содержащий заместительный мутант SAT-2 VP2 S113G (не показан на фигуре 4), используют в качестве отрицательного контроля. Температура его диссоциации снижена до 45°C, то есть, она даже на несколько градусов ниже, чем температура диссоциации вируса SAT-2 дикого типа.

Следовательно, капсид вириона SAT-2 VP2 S93Y характеризуется максимальным повышением температуры диссоциации по сравнению с температурой диссоциации вируса дикого типа, составляющим 6°C. Это хорошо согласуется со степенью стабилизации, наблюдаемой в кинетическом анализе термоинактивации (выше).

Стабильность капсидов вирионов FMDV серотипа O, изолят O1 Manisa, также определяют с помощью термофлуориметрических анализов. Данные анализы проводят в другом буфере при pH 7,0, следовательно их фоновый уровень отличается от приведенного на фигуре 4. Результаты представлены на фигуре 10, которая разделена на две панели, чтобы предотвратить загромождение изображений. Найдены следующие пиковые значения:

Панель A: O1M дикого типа: 40°C; 93F: 43°C; 93Y: 44°C.

Панель B: O1M дикого типа: 40°C; 93W: 42°C; 97Q: 42°C; 98F: 44°C.

2.1.2. Стабильность пустых капсидов

Стабильность пустых капсидов FMDV тестируют разными способами. Во-первых, очистка в градиенте сахарозы уже надежно демонстрирует целостность капсида: если капсиды распадаются, при центрифугировании в градиенте сахарозы не образуются четкие полосы.

Далее, термостабильность анализируют методами гель-электрофореза и вестерн-блоттинга: очищенные в градиенте сахарозы пустые капсиды нагревали при 45°C в течение 1 ч (фигура 5, панель A), или при 56°C в течение 2 ч (фигура 5, панель B). Затем образцы загружают на другой градиент плотности сахарозы 15-45%, центрифугируют и собирают 12 фракций по 1 мл. 500 мкл каждой фракции осаждают путем добавления 500 мкл насыщенного сульфата аммония и осадок подвергают электрофорезу на SDS-геле. И наконец, получают отпечаток геля промоканием и инкубируют его с антителами против VP1.

Пустые капсиды, сохранившиеся интактными после инкубации при нагревании, собирают чуть ниже середины градиента сахарозы, заканчивая фракциями 4 и 5, и их присутствие подтверждают гель-полосами, соответствующими этим фракциям. Тогда как распавшиеся (частично) капсиды являются менее плотными и остаются в верхней части градиента, что подтверждается гель-полосами, соответствующими фракциям 10 и 11.

Результаты демонстрируют, что пустые капсиды FMDV дикого типа, серотип O, подтип 1 Manisa, быстро распадаются и обнаруживаются во фракциях 10-11 при обеих температурах. Неожиданно было обнаружено, что капсиды, содержащие мутантный белок VP2, являются гораздо более устойчивыми к тепловой обработке: все капсиды FMDV, содержащие мутантный белок VP2 с заменами S93H и S93F, являются полностью интактными после нагревания при 45°C в течение 1 ч (фигура 5, панель A). После нагревания при 56°C в течение 2 часов мутант S93H не является стабильным (все вещество присутствует во фракциях 10-11; фигура 5, панель B); мутант S93Y является частично стабильным (примерно 10% вещества присутствует во фракции 10, остальное вещество - во фракции 4); и S93F является полностью устойчивым (все вещество присутствует во фракции 4).

Образец препарата пустого капсида, содержащего мутантный белок VP2 S93F, полученного после нагревания при 56°C в течение 2 ч, также анализируют методом электронной микроскопии, который подтверждает результаты гель-электрофореза: все указанные капсиды являются интактными и образование пентамеров не наблюдается (фигура 6, см. ниже).

Если пустые капсиды FMDV, серотип O, изолят O1 Manisa, экспрессируют с использованием системы экспрессии бакуловирус/клетки насекомых, пустые капсиды O1M дикого типа невозможно получить после культивирования в течение 5 дней в стандартных условиях. А пустые капсиды, содержащие мутантный белок VP2 с заменой S93F, можно получить как в роллер-флаконах, так и в суспензионных культурах объемом 2 л. Это позволяет получить стабилизированные мутантные капсиды в количестве, достаточном для анализа, например, методом вестерн-блоттинга, центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, ELISA или ЭМ, а также для экспериментов по вакцинации морских свинок.

2.2. Анализы методом ELISA

Анализы методом ELISA используют для определения уровня диссоциации живого инфекционного FMDV в процессе инкубации при 49°C в течение 1 часа. Сравнивают FMDV дикого типа, серотип O (фигура 7, панель A), и FMDV серотипа O, содержащий мутантный белок VP2, а именно VP2 S93Y (фигура 7, панель B). Полосы соответствуют общим количествам частиц 146S или 12S, которые детектируются с течением времени, после анализа пустого контрольного образца. Более интенсивный сигнал 12S свидетельствует о более сильном распаде капсида.

В случае FMDV дикого типа уровень капсидов вирионов уменьшается, а уровень 12S постоянно увеличивается в процессе инкубации в течение 1 ч. Пустой образец остается на пороговом уровне, как и ожидалось. Однако в случае капсидов вирионов, содержащих мутантный белок VP2, увеличение уровня частиц 12S не наблюдается, что указывает на значительное улучшение термостабильности по сравнению с капсидами вирионов дикого типа.

2.3. Стабильность после химической инактивации

Капсиды вирионов FMDV подвергают стандартной химической инактивации под действием BEI и анализируют методом электронной микроскопии. Анализ проводят либо непосредственно после химической инактивации, или после хранения при 4°C в течение 10 дней. Тестируемые капсиды FMDV либо относятся к FMDV дикого типа, серотип O, подтип 1 Manisa, либо представляют собой капсиды соответствующих вирионов, содержащие мутантный белок VP2 с заменой VP2 S93Y.

Анализ методом ЭМ демонстрирует, что вначале отношение количества пентамеров к количеству интактных капсидов вирионов составляет 10:90% для капсидов вирионов дикого типа, и 0:100% для капсидов, содержащих мутантный белок VP2. После хранения на холоду разница становится гораздо больше; в препаратах дикого типа отношение пентамеров к интактным капсидам вирионов составляет 80:20% (фигура 8, панель A), а в препаратах капсидов вирионов, содержащих мутантный белок VP2, указанное отношение составляет 10:90% (фигура 8 панель B).

2.4. Результаты исследований по вакцинации животных

2.4.1. Вакцинация пустыми капсидами:

Пустые капсиды FMDV, серотип O, подтип 1 Manisa, экспрессируют в системе бакуловирус/клетки насекомых; пустые капсид либо относятся к дикому типу, либо содержат мутантный белок VP2 с заменой VP2 S93F. К сожалению, пустые капсиды исходного серотипа O1M являются настолько нестабильными, что их трудно

детектировать после экспрессии в клетках насекомых (5 дней при 27°C, с использованием стандартной среды для культивирования клеток насекомых, pH 6,5). Поэтому для вакцинации морских свинок используют только пустые капсиды, содержащие мутантный белок VP2. Композицию капсидного антигена получают в виде стандартной эмульсии в/м/в в дозах, эквивалентных 5 или 20 мкг антигена 146S на конечный объем вакцины. В качестве контроля вводят стандартную вакцину на основе инактивированного целого вируса FMDV типа O1M.

Результаты анализа нейтрализации вируса на 3 и 4 неделе после вакцинации демонстрируют, что титры VN у морских свинок, индуцированные вакциной на основе пустых капсидов, содержащих мутант S93Y, сопоставимы с титрами, индуцированными классической вакциной против FMDV. Был сделан вывод, что активность вакцины на основе экспрессированных in vitro пустых капсидов FMDV, содержащих мутантный белок VP2, подтверждает выдвинутую концепцию.

2.4.2. Вакцинация капсидами инактивированных вирионов

Капсиды вирионов FMDV серотипа SAT-2, включающие в себя капсиды дикого типа и капсиды, содержащие мутантный белок VP2, несущий замену VP2 S93Y, тестируют на морских свинках. Капсиды вирионов инактивируют BEI. Вначале определяют количество антигена капсида интактного вириона и затем образцы разводят так, чтобы конечная концентрация вакцины составляла 5 мкг/мл. Образцы получают в виде стандартной эмульсии в/м/в и хранят в течение 1 мес при 4°C. Иммунизируют две группы морских свинок, по 10 животных в каждой, и берут образцы крови на нулевой день, и через 1 и 6 месяцев после иммунизации. Клетки IB-RS-2 используют в качестве индикаторной системы, а FMDV SAT-2/ZIM/7/83 дикого типа используют в качестве контрольного вируса. В данной системе принимают, что значения Log2 титра вирус-нейтрализующих антител, равные 5 и выше, свидетельствуют о наличии защиты.

В день введения вакцины FMDV-нейтрализующие антитела не обнаруживаются. У вакцинированных животных, получающих капсиды вирионов FMDV дикого типа отсутствуют серологические реакции, превышающие фоновый уровень, тогда как у всех животных, получающих капсиды вирионов, содержащие мутантный белок VP2, наблюдается защитный уровень серологического ответа, как через 1 месяц, так и через 6 месяцев после вакцинации. Различие средних значений титров нейтрализующих антител в разных группах является значимым ($p > 0,05$) в обеих временных точках (планки погрешностей = SEM). Результаты представлены на фигуре 9.

Тот факт, что вакцина на основе капсидов вирионов FMDV дикого типа не индуцирует защитный серологический ответ, скорее всего, объясняется нестабильностью нативных капсид после инактивации и хранения в течение 1 месяца.

Однако капсиды вирионов, содержащие мутантный белок VP2 настоящего изобретения, являются настолько стабильными, что они выживают после химической инактивации и хранения, и сохраняют способность индуцировать устойчивый защитный гуморальный иммунитет, даже после единственной вакцинации, и даже в течение 6 месяцев после вакцинации. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что это справедливо даже для вакцины против FMDV серотипа SAT-2.

3. Текущие и планируемые эксперименты

3.1. Эксперименты по вакцинации морских свинок

Планируется эксперимент по вакцинации морских свинок, в котором будут использовать вакцину на основе пустых капсидов FMDV серотипа O1 Manisa, включающих в себя либо исходные пустые капсиды, либо пустые капсиды, содержащие мутантный белок VP2 с заменой VP2 S93Y. В эксперименте будет участвовать несколько

экспериментальных и контрольных групп; группы по 5 морских свинок в каждой будут получать разные капсидные антигены (дикого типа или мутантные), входящие в состав композиций, присутствующих в виде эмульсий в/м и содержащих легкое минеральное масло в качестве адъюванта.

Кроме того, аналогичный эксперимент на морских свинках планируется для тестирования композиции, содержащей другой адъювант: капсиды FMDV серотипа O и, возможно, серотипа A, будут входить в состав композиции, присутствующей в виде эмульсии масло в воде и содержащей легкое парафиновое масло.

3.2. Исследования по вакцинации-стимуляции антигеном крупного рогатого скота

Планируется проведение двух независимых исследований по вакцинации-стимуляции антигеном крупного рогатого скота в лабораториях с высоким уровнем защиты.

В первом исследовании будет проводиться вакцинация с использованием капсидов инактивированных вирионов FMDV серотипа SAT-2, содержащих или не содержащих мутантный белок VP2 S93Y. В соответствии со схемой исследования небеременным телкам дают одну дозу вакцины и стимулируют их штаммом FMDV SAT-2 дикого типа.

Авторы настоящего изобретения планируют разделить 26 особей крупного рогатого скота на пять групп:

группа 1: 6 особям крупного рогатого скота будут водить вакцину FMDV SAT-2 дикого типа в коммерческом адъюванте;

группа 2: 6 особей крупного рогатого скота получат антиген SAT-2, содержащий мутантный белок 93Y VP2 в коммерческом адъюванте;

группа 3: 6 особей крупного рогатого скота получат мутантный белок SAT-2 93H VP2 в коммерческом адъюванте;

группа 4: 6 особей крупного рогатого скота получат мутантный белок SAT-2 93H VP2 в альтернативном адъюванте;

группа 5: 2 особи крупного рогатого скота получат суррогатную вакцинацию.

Сыворотку будут собирать через определенные промежутки времени, вначале каждые 2 дня, а затем раз в неделю и раз в месяц, и тестировать путем анализа VN. После того, как титры VN начнут падать, животных будут стимулировать, в условиях высокой защиты, путем интрадермолингвального ведения 10^4 живых вирусных частиц FMDV, адаптированных для крупного рогатого скота.

В аналогичном эксперименте крупный рогатый скот будут вакцинировать в соответствии со стандартным протоколом типа PD50, согласно Европейской Фармакопее, пустыми капсидами FMDV серотипа O1 Manisa, содержащими или не содержащими мутантный белок VP2 с заменой VP2 S93Y. В качестве контроля одна группа будет получать стандартную вакцину FMDV серотипа O. Протокол включает в себя вакцинацию и последующую стимуляцию путем инфицирования штаммом FMDV серотипа O дикого типа. В данном эксперименте будут проводить анализы, включающие в себя полный серологический анализ, а также повторное выделение вируса, используемого для стимуляции.

Описание чертежей

Фигура 1: схематическая структура икосаэдрического капсида FMDV. VP обозначают следующим образом: 1=VP1, 2=VP2 и 3=VP3. Субъединица пентамера выделена жирными линиями.

Оси икосаэдральной симметрии указаны следующим образом: пятерная: пятиугольник, тройная: треугольник, и двойная: овал. (Mateo et al., 2003, J. Biol. Chem., vol. 278, p. 41019, Fig. 1, panel A.)

Фигура 2: множественное выравнивание аминокислотных последовательностей αA-

спирального участка белка VP2 ряда типичных изолятов FMDV; в верхней части приведена нумерация для аминокислотной последовательности изолята 1 BFS FMDV серотипа O, описанной в SEQ ID NO: 1.

Фигура 3: графическое изображение структуры 3-мерной модели капсида FMDV с двойной осью симметрии, демонстрирующее гидрофобные взаимодействия двух соседних мутантных белков VP2 с заменой 93W, обеспечивающие стэкинг.

Фигура 4: показательные результаты термофлуориметрического анализа капсидов живых вирионов FMDV серотипа SAT-2. Пики указывают температуру, при которой происходит максимальное высвобождение РНК, детектируемое по РНК-специфичному флуоресцентному красителю и соответствующее полной диссоциации капсида вириона FMDV. Данная температура представляет собой температуру диссоциации.

A24 = изолят 24 FMDV серотипа A дикого типа; 93Y = FMDV SAT-2 VP2 S93Y; 93H = FMDV SAT-2 VP2 S93H; WT = FMDV SAT-2 дикого типа.

Фигура 5: анализ методом вестерн-блоттинга термостабильных пустых капсидов FMDV серотипа O, подтип 1 Manisa, которые нагревают при 45°C в течение 1 часа (панель A), или при 56°C в течение 2 часов (панель B), и затем загружают на градиент плотности сахарозы 15-45%.

Пустые капсиды FMDV, содержащие мутантный белок VP2 S93F или VP2 S93H, остаются интактными при 45°C FMDV и в процессе центрифугирования мигрируют в градиенте до фракций 4 и 5, тогда как капсиды, содержащие белок VP2 дикого типа, распадаются при термообработке, оставаясь в верхней части градиента во фракциях 10 и 11. При повторении эксперимента пустые капсиды, содержащие мутантный белок S93F VP2, являются удивительно стабильными даже после нагревания при 56°C в течение 2 ч; из капсидов, содержащих VP2 S93Y, распадается примерно 10%, а капсиды, содержащие VP2 S93H, являются нестабильными.

Фигура 6: электронная микрофотография пустых капсидов FMDV, содержащих мутантный белок VP2 с заменой S93F, после термообработки. Мутантные капсиды инкубируют при 56°C в течение 2 часов, после чего образцы анализируют методом электронной микроскопии. Обнаружено, что капсиды являются полностью интактыми. Отрезок указывает масштаб.

Фигура 7: результаты определения уровня диссоциации инфекционных вирионов FMDV после инкубации при 49°C в течение 1 часа методом ELISA. Сравнивают FMDV серотипа O дикого типа (панель A) и FMDV серотипа O, содержащий мутантный белок VP2, а именно VP2 S93Y (панель B). Кривые соответствуют количеству частиц 146S или 12S, детектируемых с течением времени, наряду с пустым контрольным образцом.

Фигура 8: электронные микрофотографии капсидов химически инактивированных вирионов FMDV серотипа O, подтип 1 Manisa, которые хранили после инактивации в течение 10 дней при температуре 4°C. На панели A показан образец FMDV дикого типа, а на панели B показан образец такого же исходного количества капсидов соответствующих вирионов, содержащих мутантный белок VP2 с заменой S93Y. Обнаружено, что примерно 80% инактивированных капсидов дикого типа диссоциирует с образованием пентамеров. A инактивированные мутантные капсиды VP2 S93Y примерно на 90% являются интактными.

Фигура 9: графическое изображение результатов эксперимента по вакцинации животных с использованием капсидов инактивированных вирионов FMDV SAT-2, содержащих мутантный белок VP2 с заменой VP2 S93Y. На графике приведены средние значения log2 титров вирус-нейтрализующих антител в группах, содержащих 10 морских свинок, через 1 месяц и 6 месяцев после вакцинации. Планки погрешностей соответствуют

s.e.m.

Вакцину получают с использованием либо капсидов инактивированных вирионов FMDV серотипа SAT2 дикого типа, либо капсидов вирионов, содержащих мутантный белок VP2 с заменой VP2 S93Y.

Считают, что значения Log2 титров вирус-нейтрализующих антител, равные 5 и выше, свидетельствуют о наличии защиты.

SAT S93Y = SAT-2 VP2 S93Y; SAT wt= SAT-2 дикого типа.

Фигура 10: результаты термофлуориметрического анализа капсидов вирионов FMDV серотипа O, изолят O1 Manisa. Графики разделяют на две панели, чтобы предотвратить загромождение изображения. Данные анализы проводят в буфере при pH 7,0.

WT = FMDV серотипа O, изолят 1 Manisa, дикого типа; 93Y = FMDV серотипа O, изолят 1 Manisa VP2 S93Y; 93F = FMDV серотипа O, изолят 1 Manisa VP2 S93F; 93W = FMDV серотипа O, изолят 1 Manisa VP2 S93W; 97Q = FMDV серотипа O, изолят 1 Manisa VP2 S97Q; 98F = FMDV серотипа O, изолят 1 Manisa VP2 Y98F.

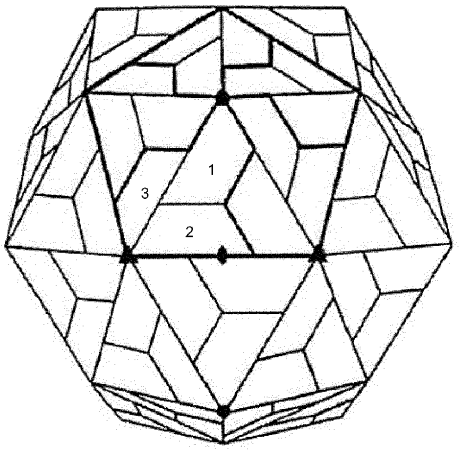
(57) Формула изобретения

Способ получения мутантного белка VP2 вируса ящура (FMDV), отличающийся тем, что мутантный белок VP2 получают путем замены по меньшей мере одной аминокислоты парентеральной αA-спирали белка VP2 на аминокислоту, выбранную из группы, включающей в себя: Q, N, V, I, F, Y, W и H, с получением αA-спирали, отличной от αA-спирали дикого типа, где мутанты выбирают из группы, состоящей из: 1) мутантов H87V, V90N, Y91F, S93H, S93Y, S93F, S93W, S93Q, L94V, S97V, S97I, S97Q и Y98F серотипа O; 2) мутантов H93F и H93Q серотипа A; 3) мутантов S93H, S93Y, S93W, S93F и Y98F серотипа SAT-2, где все номера положений указаны в соответствии с нумерацией аминокислот, используемой в SEQ ID NO: 1.

1

528510

Фиг. 1



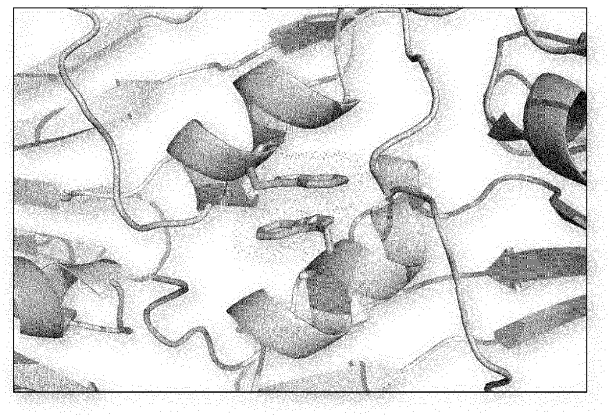
2

Фиг. 2

Серотипы FMDV	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
O1BFS	H	K	G	V	Y	G	S	L	T	D	S	Y
O1M_87	H	K	G	V	Y	G	S	L	T	D	S	Y
CS8c1	P	K	G	V	Y	G	G	L	V	K	S	Y
ASIA1_Bar2003	H	K	G	V	Y	G	G	L	M	A	S	Y
A22_Iraq_95	H	K	G	V	Y	G	H	L	V	D	S	F
SAT1_bot	H	K	G	I	Y	G	Q	L	V	D	S	H
SAT2_ZIM7_83	H	K	G	I	Y	G	S	L	T	D	A	Y
SAT3_KNP10_90	H	K	G	I	Y	G	A	M	L	D	S	H

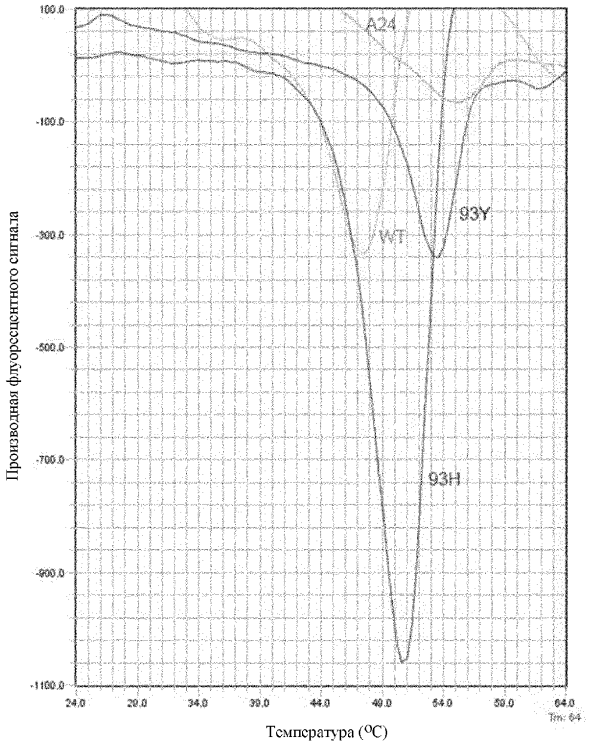
3

Фиг. 3

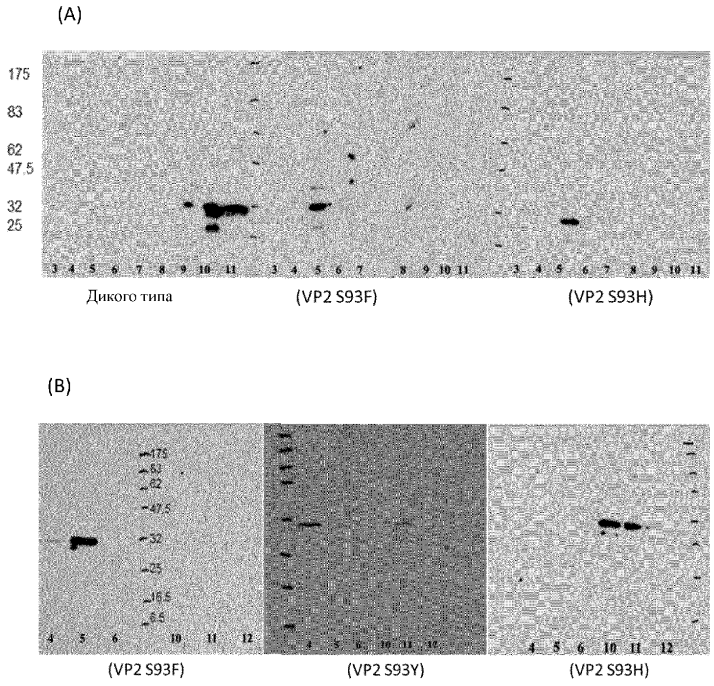


4

Фиг. 4

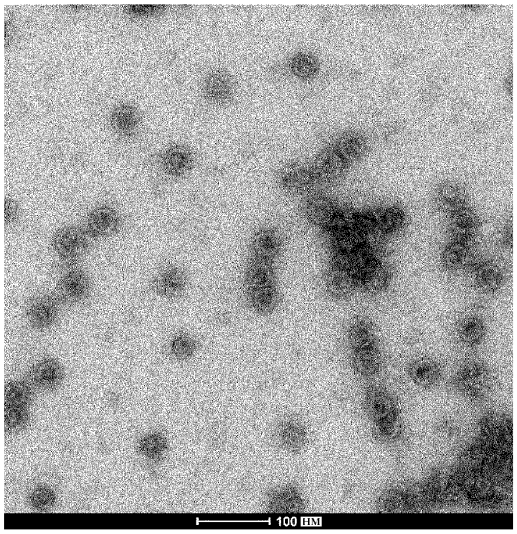

A24
WT
93Y
93H
Производная флуоресцентного сигнала
Температура (°C)

Фиг. 5


(A)
175
83
62
47.5
32
25
Дикого типа
(VP2 S93F)
(VP2 S93H)
(B)
(VP2 S93F)
(VP2 S93Y)
(VP2 S93H)

6

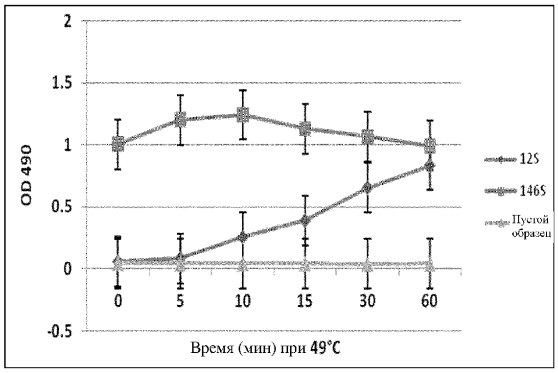
Фиг. 6



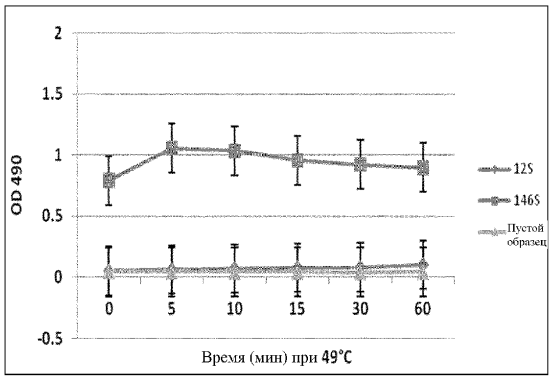
7

Фиг. 7

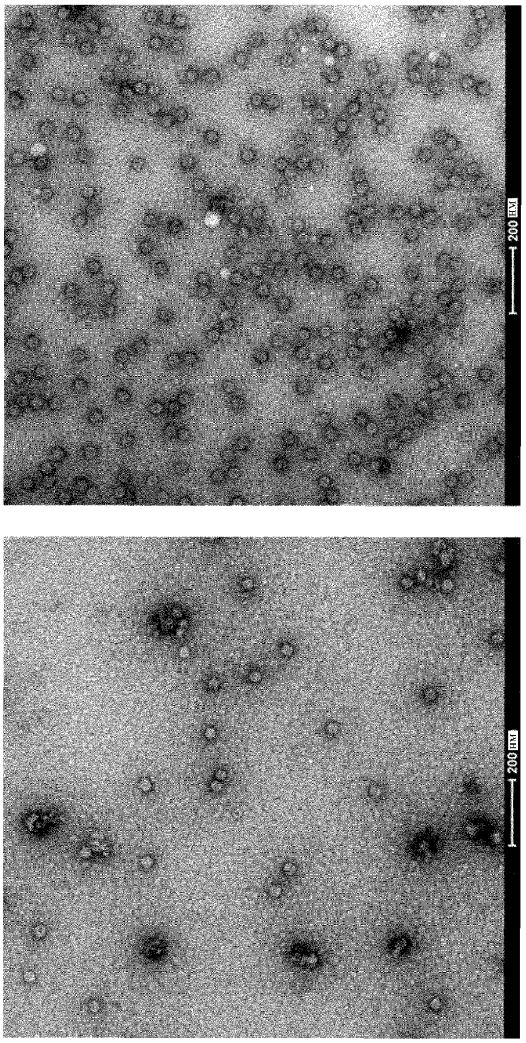
(A)


2
1.5
1
0.5
0
-0.5
OD 490
0
5
10
15
30
60
Время (мин) при 49°C
12S
146S
Пустой образец

(B)


2
1.5
1
0.5
0
-0.5
OD 490
0
5
10
15
30
60
Время (мин) при 49°C
12S
146S
Пустой образец

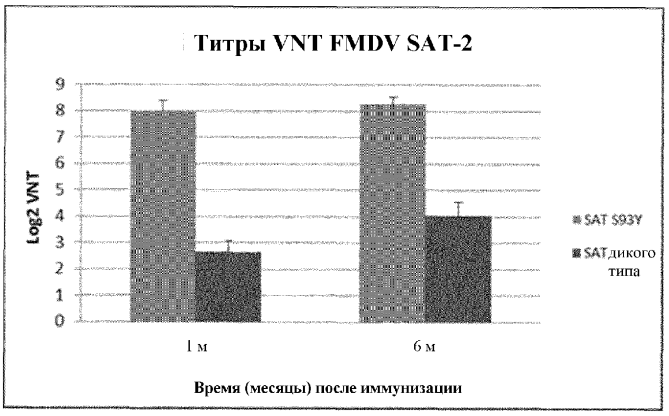
8



Фиг. 8

9

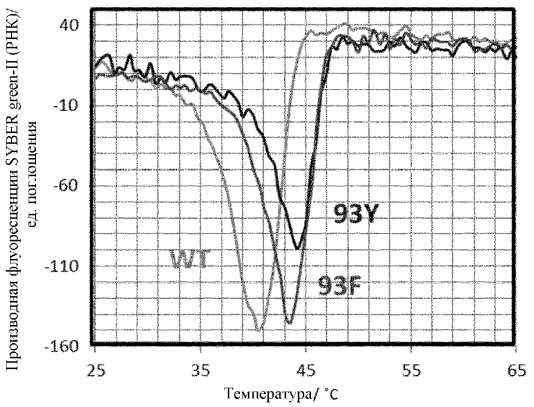
Фиг. 9


Титры VNT FMDV SAT-2
Log2 VNT
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1 м
6 м
Время (месяцы) после иммунизации
SAT S93Y
SAT дикого типа

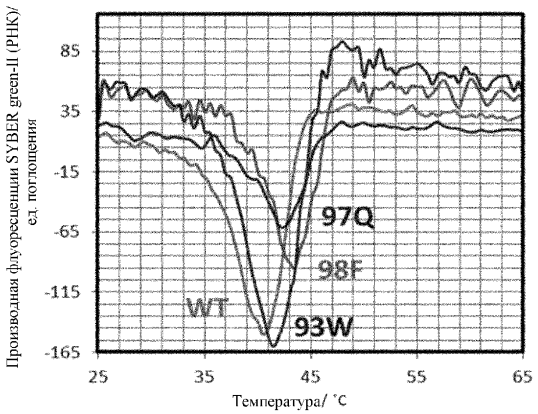
10

Фиг. 10

A


Производная флуоресценции SYBER green-II (РНК)/ ед. поглощения
40
-10
-60
-110
-160
25
35
45
55
65
Температура/ °C
93Y
WT
93F

B


Производная флуоресценции SYBER green-II (РНК)/ ед. поглощения
85
35
-15
-65
-115
-165
25
35
45
55
65
Температура/ °C
97Q
98F
WT
93W