



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 103501

(13) C2

(51) МПК

C12N 7/04 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2011 06460	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US6001613 A, 14.12.1999. US6015795 A, 18.01.2000. RONECKER S, ZIMMER G, HERRLER G, GREISER-WILKE I, GRUMMER B.: "Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains." J GEN VIROL., vol. 89, no. 9, September 2008 (2008-09), pages 2114-2121. VAN GENNIP H. G. P. ET AL.: "Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 4-5, 15 October 2000 (2000-10-15), pages 447-459. DONG XN, CHEN YH.: "Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines." VACCINE, vol. 25, no. 2, 7 August 2006 (2006-08-07), pages 205-230. BEER M, REIMANN I, HOFFMANN B, DEPNER K.: "Novel marker vaccines against classical swine fever." VACCINE., vol. 25, no. 30, 4 January 2007 (2007-01-04), pages 5665-5670. DE SMIT A J ET AL.: "Chimeric (marker) C-strain viruses induce clinical protection against virulent classical swine fever virus (CSFV) and reduce transmission of CSFV between vaccinated pigs" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 11-12, 8 December 2001 (2001-12-08), pages 1467-1476. GRIPSHOVER E.M. ET AL.: "Variation in Erns viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine diarrhoea virus" VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 125, 2007, pages 11-21. GREGO E, USLENGHI F, STRASSER M, LUZZAGO C, FRIGERIO M, PELETTI S, ROSATI S.: "Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine viral diarrhoea antibody based on Erns glycoprotein expressed in a baculovirus system." J VET DIAGN INVEST., vol. 19, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 21-27. REIMANN I ET AL.: "An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 322, no. 1, 25 April 2004 (2004-04-25), pages 143-157. VILCEK S ET AL.: "Pestiviruses in wild animals" VETERINARY MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 116, no. 1-3, 25 August 2006 (2006-08-25), pages 1-12. WEHRLE F, RENZULLO S, FAUST A, BEER M, KADEN V, HOFMANN MA.: "Chimeric pestiviruses: candidates for live-attenuated classical swine fever marker vaccines." J GEN VIROL., vol. 88, no. 8, August 2007 (2007-08), pages 2247-2258.
(22)	Дата подання заявки:	23.11.2009		
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.10.2013		
(31)	Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/119,594, 61/173,363		
(32)	Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	03.12.2008, 28.04.2009		
(33)	Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву:	US, US		
(41)	Публікація відомостей про заяву:	10.08.2011, Бюл.№ 15		
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	25.10.2013, Бюл.№ 20		
(86)	Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/IB2009/055291, 23.11.2009		
(72)	Винахідник(и):	Анкенбауер Роберт Герард (US), Луо Юйган (US), Велч Сайо-Кун Ван (US), Юань Ін (US)		
(73)	Власник(и):	ПФАЙЗЕР ІНК., 235 East 42nd Street, New York, NY 10017, United States of America (US)		
(74)	Представник:	Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30		

(54) ВІРУС БИЧАЧОЇ ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ З МОДИФІКОВАНИМ E^{RNS} БІЛКОМ

UA 103501 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до химерних пестивірусів, які можна застосовувати у якості імуногенних композицій та вакцин, особливо до способів та наборів для пошуку відмінності між вакцинованими та інфікованими вірусом дикого типу тваринами.

Вірус бичачої вірусної діареї з модифікованим ERNS білком

Заявлений винахід стосується нових химерних пестивірусів та їх застосування у імунотерапевтичних композиціях та вакцинах. Він також стосується способів та наборів для лікування або попередження поширення інфекції вірусу діареї великої рогатої худоби. Заявлений винахід також стосується застосування химерних пестивірусів у способах та наборах для пошуку відмінностей між вакцинованими тваринами та тваринами, інфікованими вірусом дикої типу.

Пестивіруси, які містять вірус діареї великої рогатої худоби (вірус BVD, або BVDV), який був виділений з деяких видів диких та свійських тварин. Визначеними хазяями BVDV є буфало, антилопа, північний олень та різні види оленів, в той час як унікальні види пестивірусів були знайдені у жирафів та у вилорогів. BVDV є маленьким РНК – вірусом родини Flaviviridae. Він є близько спорідненим з іншими пестивірусами, які є збудниками прикордонної хвороби овець та класичної чуми свиней. Нещодавно у якості етіологічного агента внутрішньоутробної інфекції поросят в Австралії був ідентифікований дивергентний пестивірус під назвою пестивірус Бунгована.

Захворювання, що спричиняються BVDV є поширеними, особливо у великої рогатої худоби, та можуть бути економічно руйнівними. Інфекція BVDV у великої рогатої худоби може призвести до проблем у розведенні, та може спричинювати викидень або передчасні пологи. BVDV здатен перетинати плаценту вагітної великої рогатої худоби, та може приводити до народжень перманентно інфікованих (PI) телят, які є імунотолерантні до вірусу та перманентно віремичні під час їх життя. Інфікована велика рогата худоба може також проявляти "мукозальні захворювання", які характеризуються підвищеною температурою, діареєю, кашлем та виразками травної слизової оболонки. Ці перманентно інфіковані тварини створюють джерело розповсюдження вірусу у стаді для подальших спалахів захворювання слизової оболонки та є дуже схильними до інфекції мікроорганізмів, які спричиняють ентеричні захворювання або пневмонію.

BVDV класифікується в одному з двох біотипів. Біотип "ср" індукує цитопатичну дію у культивованих клітинах, тоді як віруси нецитопатичного, або "нср" біотипу такого не роблять. На додаток, розрізняють два головних генотипу (тип 1 та 2) обидва з яких, як було відмічено, спричиняють різні клінічні синдроми.

Віріони BVDV мають розміри 40 - 60 нм у діаметрі. Нуклеокапсид BVDV містить одиничну молекулу РНК та білок оболонки С. Нуклеокапсид оточений ліпідною мембраною з закріпленими у ній двома глікопротеїнами, E1 та E2. Третій глікопротеїн, E^{ms}, є слабо асоційованим з оболонкою. Геном BVDV досягає приблизно 12.5 кб у довжину, та містить одиничну відкриту рамку читування, розміщену між 5' та 3' нетрансльованими ділянками (NTR). З цієї відкритої рамки читування транскрибується поліпротеїн приблизно у 438 кДа, та він піддається дії клітинних та вірусних протеаз у принаймні одинадцяти вірусних структурних та неструктурних (NS) білках (Tautz, et al., J. Virol. 71:5415-5422 (1997); Xu, et al., J. Virol. 71:5312-5322 (1997); Elbers, et al., J. Virol. 70:4131-4135 (1996); та Wiskerchen, et al., Virology 184:341-350 (1991)). Порядок геному BVDV є наступним: p20/N^{pro}, p14/C, gp48/E^{ms}, gp25/E1, gp53/E2, p54/NS2, p80/NS3, p10/NS4A, p32/NS4B, p58/NS5A та p75/NS5B. Три білки оболонки, gp48/E^{ms}, gp25/E1 та gp53/E2, є сильно глікозилованими. E^{ms} (що раніше мав назву E0 або gp48) утворює гомодимери, які ковалентно пов'язані дисульфідами. Відсутність якірного регіону гідрофобної мембрани наводить на думку, що E^{ms} є слабо асоційованим з оболонкою. E^{ms} індукує високі титри антитіл у інфікованій великої рогатої худоби, але сироватка має обмежену вірус-нейтралізуючу активність.

Серед наявних зараз вакцин BVDV є такі, що містять хімічно-інактивовані вірус дикої типу. Ці вакцини звичайно потребують багатодозового введення, та результатом їх дії є швидкотривала імунна відповідь; вони також не захищають проти внутрішньоутробного передавання вірусу. Повідомлялося про створення субодиничної вакцини на основі очищеного E2 білка у овець. Хоча ця вакцина, здається, захищає плід від зараження, захист є обмеженим тільки гомологічним штамом вірусу, та нема кореляції між захистом та титрами антитіл.

Модифікована жива (ML) вакцина BVDV, яку створено з застосуванням вірусу, який був ослаблений шляхом неодноразового пасування культури у клітинах корови або свині, або шляхом хімічно-індукованих мутацій, які надають вірусу температурно-чутливий фенотип. Одиничної дози вакцини MLV BVDV виявилось достатньо для забезпечення захисту від інфекції, та тривалість імунності можна подовжувати роками у вакцинованій великої рогатої худоби. На додаток, було повідомлено про перехресний імунітет з застосуванням MLV вакцин (Martin, et al., у "Proceedings of the Conference of Research Workers in Animal Diseases", 75:183 (1994)). Однак, існуючі MLV вакцини не дозволяють диференціювати вакциновані та природньо-інфіковані тварини.

Отже, ясно, що існує потреба в нових вакцинах для боротьби з поширенням BVDV. Така вакцина(и) повинна бути безцінною у майбутніх національних або регіональних програмах по викоріненню BVDV, та також може бути об'єднана з іншими вакцинами великої рогатої худоби, відображаючи суттєвий прогрес у промисловості. Більш ефективною вакциною для контролювання та моніторингу поширення BVDV може бути "мічена" вакцина. Така вакцина може або містити додатковий антигенний детермінант, який не є присутнім у вірусі дикого типу, або не мати антигенного детермінанта, який є присутнім у вірусі дикого типу. Що стосується першого, вакциновані тварини створюють імунну відповідь до "маркерного" імуногенного детермінанта, в той час як невакциновані тварини такого не роблять. Завдяки застосуванню імунологічного аналізу, спрямованого проти маркерної детермінанти, вакциновані тварини можуть бути відрізані від невакцинованих, природньо-інфікованих тварин по присутності антитіл до маркерного детермінанту. У випадку іншого підходу, тварини, інфіковані вірусом дикого типу, створюють імунну відповідь до маркерного детермінанту, в той час як не інфіковані, вакциновані тварини такого не роблять, у результаті чого детермінант є відсутнім у відміченій вакцині. Завдяки застосуванню імунологічного аналізу, спрямованого проти маркерного детермінанту, інфіковані тварини можуть бути розрізненими від вакцинованих, не інфікованих тварин. У обох сценаріях, завдяки забою інфікованих тварин стадо може, протягом часу, стати вільним від BVDV. На додаток до переваг видалення загрози захворювання на BVDV, сертифікація стада як вільного від BVDV має безпосередні торгівельно-економічні переваги.

У одному втіленні, заявлений винахід стосується химерного пестивірусу, де вказаний химерний пестивірус містить вірус діареї великої рогатої худоби, який не експресує його гомологічний білок E^{ms} , а також, де вказаний химерний пестивірус експресує гетерологічний білок E^{ms} , який походить з іншого пестивірусу, або природний, синтетичний або генетичний варіант вказаного гетерологічного білка E^{ms} .

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується химерного пестивірусу, як описано вище, де гетерологічний білок E^{ms} вказаного химерного пестивірусу, або природний, синтетичний або генетичний варіант вказаного гетерологічного білку E^{ms} , походить від пестивірусу, вибраного з групи, яка охоплює пестивірус північного оленя, пестивірус жирафа, та пестивірус вилорогу.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується химерного пестивірусу, як описано вище, де гетерологічний білок E^{ms} вказаного химерного пестивірусу має принаймні один E^{ms} епітоп, який є відсутнім у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується химерного пестивірусу, як описано вище, де гетерологічний білок E^{ms} вказаного химерного пестивірусу не має принаймні одного E^{ms} епітопу, який є присутнім у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу.

У одному втіленні, заявлений винахід стосується культури химерного пестивірусу, як описано вище.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується клітинної лінії або клітини хазяїна, яка містить химерний пестивірус, як описано вище.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується полінуклеотидної молекули, яка кодується для химерного пестивірусу, як описано вище.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, яка містить химерний пестивірус, як описано вище, та ветеринарно-прийнятний носій.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, як описано вище, де ветеринарно-прийнятний носій є ад'ювантом.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, як описано вище, де вказаний химерний пестивірус є ослабленим живим.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, як описано вище, де вказаний химерний пестивірус є інактивованим.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, як описано вище, яка також містить один або декілька додаткових антигенів, корисних для лікування або попередження поширення одного або декілька додаткових патогенних мікроорганізмів у тварині.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується імуногенної композиції, яка містить полінуклеотидну молекулу, яка кодується для химерного пестивірусу, як описано вище та ветеринарно-прийнятний носій.

У одному втіленні, заявлений винахід стосується вакцини, яка містить химерний пестивірус, як описано вище та ветеринарно-прийнятний носій.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується вакцини, як описано вище, де ветеринарно-прийнятний носій є ад'ювантом.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується вакцини, як описано вище, де вказаний химерний пестивірус є ослабленим живим .

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується вакцини, як описано вище, де вказаний химерний пестивірус є інактивованим.

5 У іншому втіленні, заявлений винахід стосується вакцини, як описано вище, яка також містить один або декілька додаткових антигенів, корисних для лікування або попередження поширення одного або декілька додаткових патогенних мікроорганізмів у тварині.

10 У іншому втіленні, заявлений винахід стосується вакцини, яка містить полінуклеотидну молекулу, яка кодується для химерного пестивіруса, як описано вище та ветеринарно прийнятний носій.

У одному втіленні, заявлений винахід стосується набору, який містить принаймні один контейнер вакцини, який містить химерний пестивірус, як описано вище.

15 У іншому втіленні, заявлений винахід стосується способу лікування або попередження поширення інфекції вірусу діареї великої рогатої худоби, де вакцину, яка містить химерний пестивірус, як описано вище, вводять тварині.

20 У іншому втіленні, заявлений винахід стосується способу вакцинації тварини, де пестивірусну вакцину DIVA вводять вказаній тварині, та де вказана пестивірусна вакцина DIVA містить химерний пестивірус, як описано вище, також, де вказаний химерний пестивірус має принаймні один E^{ns} епітоп, який є відсутнім у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується способу вакцинації тварини, де DIVA пестивірусну вакцину вводять вказаній тварині, та де вказана DIVA вакцина містить химерний пестивірус, як описано вище, також, де вказаний химерний пестивірус є позбавлений принаймні одного E^{ns} епітопа, який є присутнім у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу.

25 У іншому втіленні, заявлений винахід стосується способу пошуку відмінностей між тваринами, вакцинованими вакциною, яка містить химерний пестивірус, як описано вище, та тваринами, інфікованими вірусом вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу, де тварини, вакциновані вказаною вакциною виробляють антитіла до принаймні одного E^{ns} епітопа, який є присутнім у химерному пестивірусі вказаної вакцини, але, який не є присутнім у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу, вказаний спосіб, який містить етапи:

а) отримання проб сироватки від тварин;

б) дослідження вказаних проб на присутність або відсутність антитіл;

30 с) виявлення тварин, які мають вказані антитіла, як ніби вони були вакциновані вказаною вакциною; та

35 д) виявлення тварин, що позбавлені вказаних антитіл, як ніби вони були інфіковані BVDV дикого типу.

40 У іншому втіленні, заявлений винахід стосується способу пошуку відмінностей між тваринами, інфікованими вірусом діареї великої рогатої худоби дикого типу та тваринами, вакцинованими вакциною, яка містить химерний пестивірус, як описано вище, де тварини, інфіковані вірусом діареї великої рогатої худоби дикого типу виробляють антитіла до принаймні одного епітопу E^{ns} , який є присутнім у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу, але який не є присутнім у химерному пестивірусі вказаної вакцини, вказаний спосіб, який містить етапи :

а) отримання проб сироватки з тварин;

45 б) дослідження вказаних проб на присутність або відсутність антитіл;

с) виявлення тварин, що мають вказані антитіла, як ніби вони були інфіковані BVDV дикого типу; та

д) виявлення тварин, що позбавлені вказаних антитіл, як ніби вони були вакциновані вказаною вакциною.

50 У одному втіленні, заявлений винахід стосується діагностичного набору для пошуку відмінностей між тваринами, вакцинованими вакциною, яка містить химерний пестивірус, як описано вище та тваринами, інфікованими вірусом вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу, де вказаний набір, що містить реагенти, здатен визначати антитіла до принаймні одного E^{ns} епітопу, який є присутнім у химерному пестивірусі вакцини, але який є відсутнім у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу.

55 У іншому втіленні, заявлений винахід стосується діагностичного набору для пошуку відмінностей між тваринами, інфікованими вірусом дикого типу діареї великої рогатої худоби та тваринами, вакцинованими вакциною, яка містить химерний пестивірус, як описано вище, де вказаний набір, який містить реагенти здатен визначати антитіла до принаймні одного E^{ns}

епітопу, який є присутнім у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу, але який є відсутнім у химерному пестивірусі вакцини.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується антитіла, яке розпізнає епітоп E^{ms}, який є присутнім у химерному пестивірусі, як описано вище, але який є відсутнім у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу.

У іншому втіленні, заявлений винахід стосується антитіла, яке розпізнає епітоп, присутній у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу, але який є відсутнім у химерному пестивірусі, як описано вище.

У іншому втіленні, химерний пестивірус, як описано вище, застосовують у приготуванні ліків для попередження, або лікування інфекцій, спричинених BVDV.

Наступні визначення можуть бути застосованими до термінів, які застосовують у описі втілень винаходу. Наступні визначення замінюють будь-які суперечливі визначення, що містять будь-які окремі посилання, які включені сюди за посиланням.

Якщо не визначено іншого, то наукові та технічні терміни, які застосовані у зв'язку з заявленим винаходом мають значення, які є загально зрозумілими для фахівців. Більш того, якщо інше не передбачено контекстом, терміни у однині включають множину та навпаки.

Термін "амінокислота," який тут застосовано, стосується природних та синтетичних амінокислот, а також аналогів амінокислот, міметиків амінокислот, які функціонують подібно до природних амінокислот. Природними амінокислотами є ті, які кодуються генетичним кодом, а також модифіковані амінокислоти, наприклад, гідроксипролін, карбоксиглютамат, та О-фосфосерин. Стереоізомери (наприклад, D-амінокислоти) двадцяти традиційних амінокислот, неприродні амінокислоти, як-то α та α -дизаміщені амінокислоти, N-алкіл-амінокислоти, молочна кислота, та інші нетрадиційні амінокислоти також можуть бути відповідними компонентами для поліпептидів заявленого винаходу. Прикладами нетрадиційних амінокислот є: 4-гідроксипролін, γ -карбоксиглютамат, ϵ -N,N,N-триметил-лізин, ϵ -N-ацетил-лізин, О-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формілметіонін, 3-метилгістидин, 5-гідроксилізин, σ -N-метиларгінін, та інші подібні амінокислоти та імінокислоти.

Амінокислотні аналоги відносяться до компонентів, які мають таку ж само базову хімічну структуру, як і природна амінокислота, тобто, карбон є пов'язаним до гідрогену, карбоксильної групи, аміногрупи, та R - групи. Типові амінокислотні аналоги охоплюють, наприклад, гомосерин, норлейцин, сульфоксид метіоніну, та сульфоніл метил метіоніну. Такі аналоги мають модифіковані R - групи (наприклад, норлейцин) або модифіковані макромолекули, але вони зберігають таку ж саме основну хімічну структуру, як і природна амінокислота. Міметики амінокислот відносяться до хімічних компонентів, які мають структуру, яка відрізняється від загальних хімічних структур амінокислот, але мають функції, подібні до природних амінокислот. Амінокислоти можуть бути записаними або у вигляді загальновідомих трьохлітерних символів, або однолітерних символів, як рекомендовано IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

Термін "тварина", який тут застосовано, призначений для включення будь-якої тварини, яка є схильною до BVDV інфекцій, включаючи, але без обмеження, різні види корів, овець, кіз та свиней, як дикі, так і свійські.

Термін "антитіло" або "антитіла", який тут застосовано, стосується імуноглобулінової молекули, що здатна зв'язуватися з антигеном шляхом розпізнання епітопа. Антитіла можуть бути моноклональними або поліклональною сумішшю. Антитіла можуть бути інтактними імуноглобулінами, що мають походження з природних або з рекомбінантних джерел, або можуть бути імунореактивними частинами інтактних імуноглобулінів. Антитіла можуть існувати у різних формах, що охоплюють, наприклад, як-то, Fv, Fab', F(ab')₂, а також однокланцюгові.

Термін "антиген", який тут застосовано, стосується молекули, яка містить один або декілька епітопів (лінійні, конформаційні, або обидві форми), та яка при дії на суб'єкт буде викликати імунну відповідь, яка є специфічною для цього антигену. Термін "антиген" може мати відношення до ослаблених, інактивованих або модифікованих живих бактерій, вірусів, грибів, паразитів або інших мікробів. Термін "антиген", який тут застосовано, може також мати відношення до субодиночного антигену, який є відокремленим та відірваним від організму, з яким цей антиген є асоційованим у природі. Термін "антиген" може також мати відношення до антитіл, як-то анти-ідіотипичні антитіла або їх фрагменти, та до синтетичних пептидних мімотопів, які можуть імітувати антиген або антигенний детермінант (епітоп). Термін "антиген" може також мати відношення до олігонуклеотиду або полінуклеотиду, який експресує антиген або антигенний детермінант *in vivo*, наприклад, додатки ДНК - імунізації.

Терміни "BVDV", "ізоляти BVDV" або "штами BVDV", які тут застосовані, стосуються вірусів діареї великої рогатої худоби, які охоплюють, але без обмеження, тип I та тип II, які

складаються з вірусного геному, асоційованих білків, та інших хімічних компонентів (як-то ліпіди). Число вірусів діареї великої рогатої худоби I та II типу відомо фахівцям та є у наявності у, наприклад, American Type Culture Collection (ATCC®). Вірус діареї великої рогатої худоби має РНК-геном. РНК може бути зворотно транскрибованим у ДНК для застосування у клонуванні.

Отже, посилання, які тут зроблені на нуклеїнову кислоту та послідовності вірусу діареї великої рогатої худоби охоплюють як послідовності вірусної РНК, так і ДНК-послідовності, які походять від вірусних РНК- послідовностей.

Терміни “клітинна лінія” або “клітина хазяя”, які тут застосовано, означають прокаріотичну або еукаріотичну клітину, у який вірус може реплікуватися та/або підтримуватися.

Терміни “химерний” або “химера”, які тут застосовано, означають мікроорганізм, наприклад, вірус, що містить генетичні або фізичні компоненти, які отримані від більш ніж одного попередника.

Термін “культура”, який тут застосовано, означає популяцію клітин або мікроорганізмів, які зростають у відсутності інших видів або типів.

Термін “DIVA”, який тут застосовано, означає вакцину, яка здатна розрізнити інфіковані тварини від вакцинованих.

“Епітоп” - це специфічна ділянка антигену, яка зв'язується з Т-клітинним рецептором або специфічним антитілом, та звичайно охоплює приблизно від 3 до 20 амінокислотних залишків.

Термін “гетерологічний”, який тут застосовано, означає отриманий від різних видів або штамів.

Термін “гомологічний”, який тут застосовано, означає отриманий від того ж самого виду або штаму.

Термін “імуногенна композиція”, який тут застосовано, означає композицію, що виробляє імунну відповідь (тобто, має імуногенну активність) при введенні тварині без додатків, або з фармацевтично прийнятним носієм. Імунна відповідь може бути клітинною імунною відповіддю, опосередкованою в першу чергу цитотоксичними Т - клітинами, або гуморальною імунною відповіддю, опосередкованою в першу чергу хелперними Т-клітинами, які, у свою чергу, активують В-клітини, що веде до продукування антитіл.

Термін “патоген” або “патогенний мікроорганізм”, який тут застосовано, означає мікроорганізм - наприклад вірус, бактерію, гриби, протозоа, або гельмінт, який здатен індукувати або спричинювати захворювання, слабкість, або ненормальний стан його тварини-хазяя.

Термін “пестивірус”, який тут застосовано, означає РНК - вірус роду Пестивірус, родини Flaviviridae. Пестивіруси охоплюють, але без обмежень, BVDV (тип 1 та тип 2), вірус класичної чуми свиней (CSFV), та вірус кордонного захворювання (BDV), а також пестивіруси, які виділені з таких видів тварин, як-то кабан, буфало, антилопа канна, бізон, альпака, пуду, бонго, різних видів оленів, жирафа, північного оленя, сарни та вилорога (Vilcek та Nettleton; Vet Microbiol. 116:1-12 (2006)).

Термін “полінуклеотидна молекула”, який тут застосовано, означає молекулу органічного полімеру, яка складається з нуклеотидних мономерів, ковалентно пов'язаних в ланцюг. ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота) та РНК (рибонуклеїнова кислота) є прикладами полінуклеотидів з різною біологічною функцією.

Терміни “запобігання”, “попередження” або “профілактика”, тощо, які тут застосовано, означають інгібування реплікації мікроорганізму, інгібування передачі мікроорганізму, або інгібування породження мікроорганізму у хазяї. Ці, та подібні терміни, які тут застосовано, можуть також означати інгібування або блокування одного або багатьох ознак або симптомів інфекції.

Термін “терапевтично ефективна кількість”, який тут застосовано, означає кількість мікроорганізму, або субодиниці антигену, або поліпептидів, або полінуклеотидних молекул, та їх комбінацій, достатню для виявлення імунної відповіді у суб'єкта, до якого вона була введена. Імунна відповідь може охоплювати, але без обмежень, індукцію клітинної та/або гуморальні імунності.

Терміни “лікувати” або “лікування”, тощо, які тут застосовано, означають скорочення або усунення інфекції мікроорганізму. Ці, та подібні терміни, які тут застосовано, можуть також означати скорочення реплікації мікроорганізму, скорочення передавання мікроорганізму, або скорочення здатності мікроорганізму вкорінюватися у хазяї. Ці, та подібні терміни, які тут застосовано, можуть також означати пониження, полегшення, або усунення одного або багатьох ознак або симптомів інфекції мікроорганізму, або прискорити відновлення від інфекції мікроорганізму.

Терміни “вакцина” та “вакцинна композиція”, які тут застосовано, означають композиції, які запобігають або скорочують інфекцію, або, які запобігають або скорочують один або декілька

ознак або симптомів інфекції. Захисні прояви вакцинної композиції проти патогену, як правило, досягаються індукуванням у суб'єкті імунної відповіді, або клітинно -опосередкованої або гуморальної імунної відповіддю або комбінацією обох. Загально кажучи, скасування або скорочення випадків інфекції, полегшення ознак або симптомів, або прискорене усунення мікроорганізму з інфікованих суб'єктів свідчать про захисні прояви вакцинної композиції.

Вакцинна композиція заявленого винаходу надає захисні дії проти інфекцій, спричинених BVDV. Термін "варіант," який тут застосовано, стосується походження вибраного білка та/або послідовності гена, де отримана послідовність в цілому така ж саме, як і вибрана послідовність, але з мутаційними відмінностями. Вказані відмінності можуть природно траплятися, або бути синтетично або генетично створеними.

Термін "ветеринарно-прийнятний носій", який тут застосовано, стосується субстанції, які знаходяться в межах медичних суджень та придатні для застосування у контакті з тканинами тварин без невинуваченої токсичності, хворобливої чутливості, алергічної відповіді, тощо, пропорційно з розумним співвідношенням між користю та ризиком, та ефективні для їх призначеного застосування.

Наступний опис надається для допомоги фахівцям у практикуванні заявленого винаходу. Навіть при цих умовах, цей опис не повинен тлумачитися як надмірно обмежуючий заявлений винахід, оскільки модифікації та варіації у втіленнях, що тут обговорюються, можуть бути зроблені фахівцями без відходу від духу або рамок заявленого відкриття.

Заявлений винахід стосується імуногенних композицій та вакцин, які містять один або декілька химерних пестивірусів, де вказані химерні пестивіруси містять вірус діареї великої рогатої худоби, який не може експресувати його гомологічний білок E^{ns}, але де вказаний химерний пестивірус експресує гетерологічний білок E^{ns}, отриманий з іншого пестивірусу, або природний, синтетичний або генетичний варіант вказаного гетерологічного білку E^{ns}. Химерний пестивірус може бути вибраним від, але без обмеження, групи, яка охоплює химери BVDV/пестивірус північного оленя, BVDV/ пестивірус жирафа, та BVDV/ пестивірус вилорога.

У одному втіленні, химерним пестивірусом BVDV/жирфа є штам, що зберігається, як UC 25547 з American Type Culture Collection (ATCC®), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA, та наданий ATCC®, депозит призначення PTA-9938. У одному втіленні, химерним пестивірусом BVDV/вилорога є штам, що зберігається, як UC 25548 з ATCC® та наданий ATCC® депозит призначення PTA-9939. У одному втіленні, химерним пестивірусом BVDV/північного оленя є штам, що зберігається, як UC 25549 з ATCC® та наданий ATCC® депозит призначення PTA-9940.

Химерні пестивіруси заявленого винаходу можуть бути розмноженими у клітинах, клітинних лініях та клітинах-хазяях. Вказані клітини, клітинні лінії або клітини - хазяї можуть бути, наприклад, але без обмеження, клітинами ссавців та не-ссавців, у тому числі клітинами комах та рослин. Клітини, клітинні лінії та клітини хазяї, у яких химерні пестивіруси заявленого винаходу можуть бути поширені, є добре відомими та доступними для фахівців.

Химерні пестивіруси заявленого винаходу можуть бути ослабленими або інактивованими перед застосуванням у імуногенній композиції або вакцині. Способи ослаблення та інактивації є також добре відомими для фахівців у цієї галузі. Способи для ослаблення охоплюють, але без обмежень, серійний пасаж прийнятої клітинної лінії у клітинній культурі, ультрафіолетове опромінення та хімічний мутагенез. Способи для інактивації охоплюють, але без обмежень, обробку формаліном, бетапропіолактоном (BPL) або бінарним етиленіміном (BEI), або інші способи, відомі фахівцям.

Інактивація формаліном може бути проведена шляхом перемішування вірусної суспензії з 37% формальдегідом до кінцевої концентрації формальдегіду 0.05%. Вірус - формальдегідна суміш перемішується шляхом постійного перемішування приблизно 24 години при кімнатній температурі. Далі інактивована вірусна суміш тестується на наявність залишків живого вірусу шляхом аналізу росту у прийнятній клітинній лінії.

Інактивація BEI може бути проведена шляхом перемішування вірусної суспензії заявленого винаходу з 0.1 M BEI (2-бромо-етиламін у 0.175 N NaOH) до кінцевої концентрації BEI у 1 mM. Вірус -BEI суміш перемішується шляхом постійного перемішування приблизно 48 годин при кімнатній температурі, за яким слідує додавання 1.0 M тіосульфата натрію до кінцевої концентрації 0.1 mM. Перемішування ще додатково триває протягом двох годин.

Далі інактивована вірусна суміш тестується на наявність залишків живого вірусу шляхом аналізу росту у прийнятній клітинній лінії.

Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу можуть містити один або декілька ветеринарно-прийнятних носіїв. Як застосовано тут, "ветеринарно-прийнятний носій" охоплює будь-які, та всі розчинники, диспергенти, оболонки, ад'юванти, стабілізатори, розріджувачі,

консерванти, антибактеріальні та антигрибкові агенти, ізотонічні агенти, агенти затримки адсорбції, тощо. Розріджувачі можуть охоплювати воду, фізіологічний розчин, декстрозу, етанол, гліцерин, тощо. Ізотонічні агенти, серед інших, що відомі фахівцям, можуть охоплювати хлорид натрію, декстрозу, манітол, сорбітол та лактозу. Стабілізатори, серед інших, що відомі фахівцям, можуть охоплювати альбумін. Консерванти, серед інших, що відомі фахівцям, охоплюють мертіолат.

Ад'юванти, серед інших, відомі фахівцям, охоплюють, але без обмежень, ад'ювантну систему RIBI (Ribi Inc.), галун, гель гідроксиду алюмінію, емульсії «олія у воді», емульсії «вода у олії», як-то, наприклад, повний та неповний ад'юванти Фрейнда, кополімер Блока (CytRx, Atlanta Ga.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), AMPHIGEN[®] ад'ювант, сапонін, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL) або інші сапонінові фракції, монофосфорил ліпід A, авридин ліпід – амін ад'ювант, термолабільний ентеротоксин з *E. coli* (рекомбінантний або інший), холерний токсин, або мураміловий дипептид. Кількості та концентрації ад'ювантів та добавок, корисних у контексті заявленого винаходу можуть бути легко визначені фахівцями. У одному втіленні, заявлений винахід розглядає імуногенні композиції та вакцини, які містять приблизно від 50 мкг до 2000 мкг ад'юванта. У іншому втіленні, ад'ювант міститься у кількості приблизно від 100 мкг до 1500 мкг, або приблизно від 250 мкг до 1000 мкг, або приблизно від 350 мкг до 750 мкг. У іншому втіленні, ад'ювант міститься у кількості приблизно 500 мкг / 2 мл дозу імуногенної композиції або вакцини.

Імуногенні композиції та вакцини можуть також містити антибіотики. Такі антибіотики охоплюють, але без обмежень, подібні з класів аміноглікозидів, карбапенемів, цефалоспоринов, глікопептидів, макролідів, пеніцилінів, поліпептидів, хинолонів, сульфонамідів та тетрациклінів. У одному втіленні, заявлений винахід розглядає імуногенні композиції та вакцини, які містять приблизно від 1 мкг / мл до 60 мкг / мл антибіотика. У іншому втіленні, імуногенні композиції та вакцини містять приблизно від 5 мкг / мл до 55 мкг / мл антибіотика, або приблизно від 10 мкг / мл до 50 мкг / мл антибіотика, або приблизно від 15 мкг / мл до 45 мкг / мл антибіотика, або приблизно від 20 мкг / мл до 40 мкг / мл антибіотика, або приблизно від 25 мкг / мл до 35 мкг / мл антибіотика. У іншому втіленні, імуногенні композиції та вакцини містять менш ніж приблизно 30 мкг / мл антибіотика.

Імуногенні композиції та вакцини винаходу можуть також містити один або декілька інших імуномодуляторних агентів, як-то, наприклад, інтерлейкіни, інтерферони, або інші цитокіни, прийнятні кількості яких можуть бути визначені фахівцем.

Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу можуть містити одну або декілька полінуклеотидних молекул, які кодують химерний пестивірус. Молекули ДНК або РНК, що кодують весь геном химерного пестивіруса, або одну або декілька відкритих рамок зчитування можуть бути застосованими у імуногенних композиціях, або вакцинах. Молекули ДНК або РНК можуть бути введеними у відсутність інших агентів, або вони можуть бути введеними разом з агентами, що сприяють клітинному поглинанню (наприклад, з ліпосомами або катіонними ліпідами). Взагалі полінуклеотидів у імуногенній композиції або вакцині може бути приблизно від 0.1 мкг / мл до 5.0 мг / мл. У іншому втіленні, взагалі полінуклеотидів у імуногенній композиції або вакцині може бути приблизно від 1 мкг / мл до приблизно 4.0 мг / мл, або приблизно від 10 мкг / мл до приблизно 3.0 мг / мл, або приблизно від 100 мкг / мл до приблизно 2.0 мг / мл. Вакцини та процедури вакцинації, які застосовують нуклеїнові кислоти (ДНК або м РНК) є добре описаними, наприклад, у U. S. Pat. No. 5,703,055, U.S. Pat. No. 5,580,859, U.S. Pat. No. 5,589,466, всі з яких є включеними сюди у якості посилання.

Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу можуть також містити додаткові антигени BVDV, наприклад, ті, що описані у U.S. Pat. No. 6,060,457, U.S. Pat. No. 6,015,795, U.S. Pat. No. 6,001,613, та U.S. Pat. No. 5,593,873, всі з яких є включеними сюди у якості посилання.

На додаток до одного або декількох химерних пестивірусів, імуногенні композиції та вакцини можуть містити інші антигени. Антигени можуть бути у повністю інактивованій формі або частково обробленого мікроорганізму, або у вигляді антигенних молекул, отриманих генетично-інженерними способами або шляхом хімічного синтезу. Інші антигени, прийнятні для застосування у відповідності з заявленим винаходом охоплюють, але без обмежень, ті, що отримані від таких патогенних бактерій, як *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus anthracis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Clostridium* spp., *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Erysipelothrix rhusopathiae*, *Chlamydia* spp., *Brucella* spp., *Vibrio* spp., *Salmonella enterica* serovars та *Leptospira* spp. Антигени можуть також бути отриманими від патогенних грибів, таких як *Candida*, *protozoa*, таких як *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria* spp., *Babesia*

spp., *Giardia* spp., або глистів, таких як *Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, та *Fasciola*. Додаткові антигени охоплюють патогенні віруси, як-то коронавірус корів, герпесвіруси корів-1,3,6, вірус парагрипу корів, респіраторно - синцитіальний вірус корів, вірус лейкозу корів, вірус чуми рогатої худоби, вірус захворювання рота та ніг, вірус сказу та вірус грипу .

5 Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу можуть бути введені тварині для індукування ефективної імунної відповіді проти BVDV. Відповідно, заявлений винахід стосується способу стимулювання ефективної імунної відповіді проти BVDV, шляхом введення тварині терапевтично ефективної кількості описаної тут імуногенної композиції або вакцини заявленого винаходу.

10 Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу можуть бути виготовлені у різних формах, в залежності від шляху введення. Наприклад, імуногенні композиції та вакцини можуть бути виготовлені у вигляді стерильних водних розчинів або дисперсних систем, прийнятних для застосування у вигляді ін'єкцій, або приготовані у ліофілізованих формах з застосуванням сублімаційного сушіння. Ліофілізовані імуногенні композиції та вакцини звичайно зберігаються при приблизно 4°C, та можуть бути відтворені у стабілізуючому розчині, наприклад, у фізіологічному розчині або у HEPES, з ад'ювантом, або без нього. Імуногенні композиції та вакцини також можуть бути отримані у вигляді суспензій або емульсій.

Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу містять терапевтично ефективну кількість одного або декількох описаних вище химерних пестивірусів. Очищені віруси можуть 20 бути безпосередньо застосованими у імуногенній композиції або вакцині, або можуть бути також ослабленими або інактивованими. Звичайно, імуногенні композиції або вакцини містять приблизно від 1×10^2 до 1×10^{12} вірусних частинок, або приблизно від 1×10^3 до 1×10^{11} вірусних частинок, або приблизно від 1×10^4 до 1×10^{10} вірусних частинок, або приблизно від 1×10^5 до 1×10^9 вірусних частинок, або приблизно від 1×10^6 до 1×10^8 вірусних частинок. Точна кількість вірусу у імуногенній композиції або вакцині, яка є ефективною для забезпечення захисної дії 25 може бути визначена фахівцем.

Імуногенні композиції та вакцини звичайно містять ветеринарно-прийнятний носій у обсязі від приблизно 0.5 мл до приблизно 5 мл. У іншому втіленні об'єм носія дорівнює від приблизно 1 мл до приблизно 4 мл, або приблизно від 2 мл до приблизно 3 мл. У іншому втіленні, об'єм 30 носія дорівнює приблизно 1 мл, або приблизно 2 мл, або приблизно 5 мл. Ветеринарно-прийнятні носії, які придатні для застосування у імуногенних композиціях та вакцинах можуть бути будь-якими з вищеописаних.

Фахівці можуть легко визначити, чи потребує вірус бути ослабленим або інактивованим перед введенням. У іншому втіленні заявленого винаходу, химерний пестивірус може бути 35 введений безпосередньо до тварини без додаткового послаблення. Кількість вірусу, яка є терапевтично ефективною може змінюватися у залежності від окремого застосованого вірусу, стану тварини та/або ступню інфекції, та може бути визначена фахівцем.

У відповідності зі способами заявленого винаходу, тварині може бути введена одинична доза, або, альтернативно, може мати місце дві або декілька інокуляцій з інтервалами 40 приблизно від двох до десяти тижнів. Для забезпечення оптимальної імунізації можуть бути застосовані схеми ревакцинації та схема дозування може бути відрегульована. Оптимальний режим введення може бути легко визначений фахівцем.

Імуногенні композиції та вакцини можуть бути введені безпосередньо у кровотік, у м'яз, або у внутрішній орган. Прийнятні засоби для парентерального введення охоплюють 45 внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревне, внутрішньотрахеальне, внутрішньошлуночкове, внутрішньоуретральне, підложечне, внутрішньочерепне, внутрішньом'язове та підшкірне. Прийнятні пристрої для парентерального введення охоплюють голкові (у тому числі мікроголкові) інжектори, безголкові інжектори та способи інфузії.

50 Парентеральні препарати звичайно є водними розчинами, які можуть містити наповнювачі, як-то солі, карбогідрати та буферні агенти (бажано з рН приблизно від 3 до 9, або приблизно від 4 до 8, або приблизно від 5 до 7.5, або приблизно від 6 до 7.5, або приблизно від 7 до 7.5), але, для деяких додатків, вони можуть бути більш відповідно приготовані у вигляді стерильних безводних розчинів або у підсушеному стані для застосування у поєднанні з відповідним переносником, як-то стерильна, апірогенна вода.

Отримання парентеральних препаратів у стерильних умовах, наприклад, шляхом ліофілізації, може бути легко досягнуто з застосуванням добре відомих фахівцям стандартних фармацевтичних способів.

60 Розчинність компонентів, застосованих у приготуванні парентеральних розчинів може бути підвищена застосуванням відомих фахівцям відповідних способів отримання, як-то включенням

агентів, що підвищують розчинність, як-то буферів, солей, поверхнево - активних речовин, ліпосом, циклодекстринів, тощо.

Препарати для парентерального введення можуть бути приготовані для негайного та/або модифікованого вивільнення. Препарати модифікованого вивільнення охоплюють препарати затриманого, тривалого, імпульсного, контрольованого, цільового та програмованого вивільнення. Отже, компоненти винаходу можуть бути приготовані у твердому, напівтвердому, або тиксотропному рідкому вигляді для введення у вигляді імплантованого депо, яке забезпечує модифіковане вивільнення активного компонента. Приклади таких препаратів охоплюють покриті ліками стенти та полі(dl- молочно – ко-гліколеві)кислі (PGLA) мікросфери.

Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу також можуть бути введені місцево на шкіру або слизову оболонку, а саме, дермально або трансдермально. Типові препарати для цього охоплюють гелі, гідрогелі, лосьйони, розчини, креми, мазі, присипки, пов'язки, пінки, плівки, пластирі, пластини, імплантати, губки, джгути, бинти та мікроемульсії. Також можуть бути застосовані ліпосоми. Типові носії охоплюють спирт, воду, мінеральні оливи, рідкий вазелін, білий вазелін, гліцерин, поліетиленгліколь та пропіленгліколь. Також можуть бути включені речовини, що сприяють проникненню. Див, наприклад, Finnin and Morgan, J. Pharm Sci, 88 (10):955-958 (1999).

Інші засоби топікального введення охоплюють доставку електропорацією, іонофорезом, фонофорезом, сонофорезом та мікроголковою або безголковою (наприклад, Powderject™, Bioject™, etc.) ін'єкцією.

Препарати для топікального введення можуть бути приготовані для миттєвого та/або модифікованого вивільнення. Препарати з модифікованим вивільненням охоплюють препарати з затриманим, стійким, імпульсним, керованим, цільовим та запрограмованим вивільненням.

Імуногенні композиції та вакцини можуть також бути введені інтраназально або шляхом інгаляції, звичайно у вигляді сухого порошку (або окремо або як суміш, наприклад, суха суміш з лактозою, або як змішана частина компоненту, наприклад, змішаного з фосфоліпідами, як-то фосфатидилхоліном) з порошковим інгалятором або у вигляді аерозольного спрею з контейнера під тиском, насоса, обприскувача, розпилювача (бажано електродинамічного розпилювача для утворення доброго аерозолу), або небулайзера, з застосуванням або без застосування прийнятного пропеленту, як-то 1,1,1,2-тетрафлуороетан або 1,1,1,2,3,3,3-гептафлуороетан. Для інтраназального застосування, порошок може також містити біоадгезивний агент, наприклад, хітозан або циклодекстрин.

Контейнер під тиском, насос, обприскувач, розпилювач, або небулайзер містить розчин або суспензію компоненту(тів) винаходу, що охоплюють, наприклад, етанол, водний етанол, або прийнятний альтернативний агент для диспергування, солюбілілізування, або подовженого вивільнення активної частини, пропеленту(тів) як розчинника та додаткової поверхнево - активної речовини, як-то сорбітану тріолеат, олеїнової кислоти, або олігомолочної кислоти.

Перед застосуванням препарату у вигляді сухого порошку або суспензії, лікарський препарат звичайно мікронізують до розміру, прийнятного для доставки шляхом інгаляції (звичайно, менш ніж приблизно 5 мікронів). Це може бути досягнуто за допомогою будь-якого прийнятного способу подрібнення, як-то подрібнення на спіральньо-струменевому млині, на струменевому млині з киплячим шаром, надкритичною флюїдною обробкою для утворення наночастинок, гомогенізацією під високим тиском, або розпилювальною сушкою.

Капсули (зроблені, наприклад, з желатину або гідроксипропілметилцелюлози), блістери та картриджі для застосування у інгаляторі або інсуфляторі можуть бути зроблені для того, щоб містити порошкової суміші компоненту винаходу, прийнятної порошкової основи, як-то лактози або крохмалю та модифікатора, як-то l-лейцин, манітол, або стеарат магнію. Лактоза може бути безводною або у вигляді моногідрату. Інші прийнятні наповнювачі охоплюють декстран, глюкозу, мальтозу, сорбіт, ксиліт, фруктозу, сахарозу та трегалозу.

Прийнятний розчин препарату для застосування у електродинамічному розпилювачі для продукування якісного аерозолу може містити приблизно від 1 мкг до 20 мг компонента винаходу на натискання та об'єм натискання може змінюватися приблизно від 1 мкл до 100 мкл. У іншому втіленні, кількість компоненту на натискання може бути у діапазоні приблизно від 100 мкг до 15 мг, або приблизно від 500 мкг до 10 мг, або приблизно від 1 мг до 10 мг, або приблизно від 2.5 мкг до 5 мг. У іншому втіленні, об'єм натискання може бути у діапазоні приблизно від 5 мкл до 75 мкл, або приблизно від 10 мкл до 50 мкл, або приблизно від 15 мкл до 25 мкл. Типові препарати можуть містити компонент винаходу, пропіленгліколь, стерильну воду, етанол та хлорид натрію. Альтернативні розчинники, які можуть бути застосовані замість пропіленгліколю охоплюють гліцерин та поліетиленгліколь.

Препарати для інгаляції/інтраназального введення можуть бути приготовані для негайного та/або модифікованого вивільнення з застосуванням, наприклад, PGLA. Препарати з модифікованим вивільненням охоплюють препарати з затриманим, стійким, імпульсним, керованим, цільовим та запрограмованим вивільненням.

У разі застосування інгаляторів сухого порошку та аерозолів, одинична доза звичайно визначається за допомогою клапана, який забезпечує відміряну кількість. Одиниці у відповідності з винаходом, звичайно налагоджені для введення відміряної дози, або впорскування, що містить приблизно від 10 нг до 100 мкг компоненту винаходу. У іншому втіленні, кількість компоненту, введеного у відміреній дозі дорівнює приблизно від 50 нг до 75 мкг, або приблизно від 100 нг до 50 мкг, або приблизно від 500 нг до 25 мкг, або приблизно від 750 нг до 10 мкг, або приблизно від 1 мкг до 5 мкг. Загальна денна доза звичайно може бути у діапазоні приблизно від 1 мкг до 100 мкг, що може бути введено одиничною дозою, або декількома дозами протягом доби. У іншому втіленні, загальна денна доза може бути у діапазоні приблизно від 50 мкг до 75 мкг, або приблизно від 100 мкг до 50 мкг, або приблизно від 500 мкг до 25 мкг, або приблизно від 750 мкг до 10 мкг, або приблизно від 1 мкг до 5 мкг.

Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу можуть також бути введені орально або перорально, як у тіло суб'єкта, так і через рот, та охоплюють введення ковтанням або перенесення крізь слизову оболонку рота (наприклад, під'язикове або щічне всмоктування) або обидва шляхи. Прийнятні смакові речовини, як-то ментол та левоментол, або підсолоджувачі, як-то сахарин або сахарин натрію, можуть бути доданими до цих препаратів винаходу, призначених для орального або перорального введення.

Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу можуть бути введені ректально або вагінально, наприклад, у вигляді супозиторіїв, песарій, або клізм. Традиційною основою супозиторіїв є какао-масло, але в міру необхідності, можуть бути застосовані різні альтернативи. Препарати для ректального/вагінального введення можуть бути приготовані для негайного та/або модифікованого вивільнення. Препарати з модифікованим вивільненням охоплюють препарати з затриманим, стійким, імпульсним, керованим, цільовим та запрограмованим вивільненням.

Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу можуть також бути введені безпосередньо у око або у вухо, звичайно у вигляді крапель мікронізованої суспензії або розчину у ізотонічному, рН - скоректованому, стерильному фізіологічному розчині. Інші препарати, прийнятні для очного та вушного введення містять мазі, які здатні до біологічної деградації (наприклад, гелеві губки, що абсорбуються, колаген) та які не здатні до неї (наприклад, силікон) імплантати, пластини, лінзи та частинкові або везикулярні системи, як-то ніосоми або ліпосоми. Полімер, як-то з'єднана поперечними зв'язками поліакрилова кислота, полівініловий спирт, гіалуронова кислота, целюлозний полімер, наприклад, гідроксипропілметилцелюлоза, гідроксиетилцелюлоза, або метилцелюлоза, або гетеросахаридний полімер, наприклад, геланова камедь, може бути включений разом з консервантом, як-то хлорид бензалконію. Такі препарати можуть також бути доставлені шляхом іонофорезу.

Препарати для очного/вушного введення можуть бути приготовані для негайного та/або модифікованого вивільнення. Препарати з модифікованим вивільненням охоплюють препарати з затриманим, стійким, імпульсним, керованим, цільовим та запрограмованим вивільненням.

Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу можуть бути застосовані у приготуванні ліків для лікування або попередження поширення інфекції вірусу діареї великої рогатої худоби у тварин.

Імуногенні композиції та вакцини заявленого винаходу можуть бути застосовані у приготуванні ліків для введення тваринам, де ліки є пестивірусною вакциною DIVA, що містить химерний пестивірус, який містить вірус діареї великої рогатої худоби, який не здатен експресувати його гомологічний білок E^{rs} , та де вказаний химерний пестивірус експресує гетерологічний білок E^{rs} , отриманий з іншого пестивірусу, або природний, синтетичний або генетичний варіант вказаного гетерологічного білку E^{rs} . У одному втіленні, химерний пестивірус має принаймні один E^{rs} епітоп, який є відсутнім у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу. У іншому втіленні, химерний пестивірус позбавлений принаймні одного E^{rs} епітопу, який є присутнім у вірусі вірусної діареї великої рогатої худоби дикого типу.

Заявлений винахід стосується способу визначення джерела пестивірусу, присутнього у тваринному суб'єкті.

Вакцинація, яка застосовує вакцини DIVA здатна розрізнити інфіковані тварини від вакцинованих тварин та надає засоби для визначення походження пестивірусу, присутнього у тваринному суб'єкті. Така диференціація може бути досягнута шляхом будь-яких різних

діагностичних способів, що охоплюють, але без обмеження, ІФА, Вестерн-блоттинг та ПЛР. Ці, та інші способи є добре визнаними та відомими фахівцям.

Химерні пестивіруси заявленого винаходу можуть бути відокремлені від BVDV штамів дикого типу по їх геномному складу та по білкам, що вони експресують. Таке розрізнення дозволяє відрізнити вакциновані та інфіковані тварини. Наприклад, визначення може бути проведено при позитивному тестуванні тварин на BVDV у деяких лабораторних тестах, які містять штам BVDV дикого типу, або химерний пестивірус заявленого винаходу, який є попередньо отриманим завдяки вакцинації.

Для створення визначення можуть бути застосовані різні аналізи. Наприклад, вірус може бути виділений з позитивно тестованих на BVDV тварин, та індикативно перед вакцинацією для визначення присутності геному химерного пестивірусу можуть бути застосовані аналізи на основі дослідження ДНК. Аналізи на основі дослідження ДНК охоплюють Саузерн та Нозерн-блоттинг, ПЛР та сиквенсинг. Альтернативно, можуть бути проведені аналізи на основі дослідження білків. У аналізах на основі дослідження білків, клітини або тканини, запідозрені у наявності інфекції можуть бути виділені з тварин, позитивно тестованих на BVDV. З таких клітин або тканин можуть бути зроблені клітинні екстракти та піддані, наприклад, Вестерн-блоттингу, з застосуванням прийнятних антитіл проти вірусних білків, що може чітко визначити наявність або попередньо введеного химерного пестивірусу, або BVDV дикого типу.

Ступень та природа імунних відповідей, індукованих у тварині може бути оцінена шляхом застосування різних способів. Наприклад, з щеплених тварин може бути зібрана сироватка та перевірена на присутність або відсутність антитіл, специфічних для химерного вірусу, наприклад, у звичайному дослідженні вірусної нейтралізації. Виявлення відповідних цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL) у лімфатичній тканині може бути досягнуто шляхом аналізів, як-то проліферації Т клітин, як показника індукції клітинної імунної відповіді. Суттєві способи є добре описані, наприклад, у Coligan et al. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons Inc. (1994).

Оскільки це може бути бажано для введення імуногенної композиції або вакцини у комбінації з додатковими компонентами, наприклад, з метою лікування окремого захворювання або стану, у межах заявленого винаходу ці імуногенні композиції або вакцини можуть бути зручно включені, або об'єднані у вигляді набору, прийнятного для введення або співведення композиції.

Таким чином, набір заявленого винаходу може містити одну або декілька окремих фармацевтичних композицій, принаймні одна з яких є імуногенною композицією або вакциною у відповідності з заявленим винаходом, та засоби для окремого зберігання зазначених композицій, як-то контейнер, розділена пляшка, або розділений фолієвий пакет. Прикладом таких наборів є шприц та голка, тощо. Набір заявленого винаходу є особливо прийнятним для введення різних видів дозування, наприклад, орального або парентерального, для введення окремої композиції у різні інтервали дозування, або для титрування окремих композицій між собою. Для допомоги введення композиції заявленого винаходу, набір звичайно містить інструкції по введенню.

Інший набір заявленого винаходу може містити один або декілька реагентів, корисних для виявлення та диференціації між BVDV-інфікованими тваринами та тваринами, вакцинованими химерним пестивірусом. Набір також може включати реагенти для аналізу проб на присутність цілого BVDV, або поліпептидів BVDV, епітопів або полінуклеотидних послідовностей, які не є присутніми у химерному пестивірусі імуногенної композиції або вакцини. Альтернативно, набір заявленого винаходу може містити реагенти для аналізу проб на присутність химерного пестивірусу, або поліпептидів, епітопів або полінуклеотидних послідовностей, які не є присутніми у BVDV дикого типу. Присутність вірусу, поліпептидів, або полінуклеотидних послідовностей може бути визначена з застосуванням антитіл, ПЛР, гібридизації, та інших способів виявлення, відомих фахівцям.

Інший набір заявленого винаходу може надати реагенти для виявлення антитіл проти окремих епітопів. Епітопи є або присутніми у химерному пестивірусі заявленого винаходу та не присутні у BVDV дикого типу, або, альтернативно, є присутніми у BVDV дикого типу та не присутні у химерному пестивірусі заявленого винаходу. Такі реагенти є корисними для аналізу проб на присутність антитіл, та є добре знаними та доступними для фахівців у цієї галузі. Присутність антитіл може бути визначена з застосуванням стандартних способів, відомих фахівцям.

У деяких втіленнях, набір може містити комплект надрукованих інструкцій або бирок з зазначенням, що цей набір є корисним для виявлення та диференціації BVDV-інфікованих тварин від тварин, вакцинованих химерним пестивірусом.

Антитіла можуть бути або моноклональними, поліклональними, або рекомбінантними. Зручно те, що вони можуть бути приготовані проти імуногену або його частини. Наприклад, синтетичний пептид на основі амінокислотної послідовності імуногену або готується рекомбінантно з застосуванням способів клонування, або природний продукт гену та/або його частини може бути виділений та застосований у якості імуногену. Імуногени можуть бути застосованими для продукування антитіл способом стандартного продукування антитіл, добре відомого фахівцям, наприклад, що описаний у Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988) and Borrebaeck, "Antibody Engineering - A Practical Guide", W.H. Freeman and Co. (1992). Фрагменти антитіл також можуть бути приготовані з антитіл способами, відомими фахівцям, та охоплюють Fab, F(ab')₂, та Fv.

У продукуванні антитіл, скрінінг на бажане антитіло може бути здійснений стандартними імунологічними способами, відомими у цій галузі. Способи, що не є детально описаними, звичайно проходять як вказано у Stites, et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton and Lange, Norwalk, CT (1994) and Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York (1980). Взагалі, бажаними типами імуноаналізу є ІФА та Вестерн-блотинг, обидва які є добре відомими фахівцям. У аналізах можуть бути застосовані як поліклональні, так і моноклональні антитіла. Антитіло може бути зв'язано з твердим підтримуючим субстратом або сполучено з групами, які можна виявити, або є разом зв'язано та сполучено, як це відомо фахівцям. (Стосовно загального обговорення сполучення флуоресцентних або ензимних груп, див. Johnstone and Thorpe, "Immunochemistry in Practice", Blackwell Scientific Publications, Oxford (1982).) Зв'язування антитіл до твердого підтримуючого субстрату є також добре відомо фахівцям. (Стосовно загального обговорення, див. Harlow and Lane (1988) and Borrebaeck (1992).) Групи, які можна виявити, та які передбачено для застосування у заявленому винаході можуть охоплювати, але без обмежень, флуоресцентні, металічні, ензиматичні та радіоактивні маркери, як-то біотин, золото, феритин, алкалін фосфатазу, b-галактозидазу, пероксидазу, уреазу, люоресцеїн, родамін, тритій, ¹⁴C та йодування.

Заявлений винахід також ілюструється, але без обмежень, наступними прикладами.

Приклад 1. Конструкція та серологічна характеристика химерних пестивірусів.

E. coli K12 GM2163 [F- ara-14, leuB6, thi-1, fhuA31, lacY1, tsx-78, galK2, galT22, supE44, hisG4, rpsL136, (Str^r), xyl-5, mtl-1, dam13::Tn9(Cam^r), dcm-6, mcrB1, hsdR2(rk^rmk^r), mcrA] містила плазмиду з повною геномною кДНК вірусу діареї великої рогатої худоби штаму NADL (BVDV-NADL), який був отриманий від Dr. R. Donis, University of Nebraska.

Клітини RD (тестикулярні клітини великої рогатої худоби, трансформовані з SV40; які були отримані від Dr. R. Donis) підрощували у OptiMEM, доповненим 3% кінською сироваткою, 1% неосновними амінокислотами (NEAA) у модифікованій середі Ігла (MEM), 2 mM GlutaMax та 10 мкг/мл гентаміцину. Клітини BK-6 були отримані від Pfizer Global Manufacturing (PGM). Клітини зростали у середі DMEM, що була доповнена 5% кінською сироваткою або сироваткою донорних телят (PGM), 2 mM Glutamax, та 1% антибіотиком та антимікотиком. Всі компоненти середи, якщо не вказано інше, були придбані у Invitrogen (Carlsbad, CA). Всі клітини підрощували при 37°C у 5% CO₂ середовищі.

Моноклональні антитіла (MAb) 15C5, специфічні до BVDV E^{ms} були придбані у IDEXX (Westbrook, ME). MAb 20.10.6 проти BVDV NS3 було запропоновано Dr. E. Dubovi (Cornell University). MAbs WS 363, WS 373 та WS 371, що мали специфічність до E^{ms} білку вірусу прикордонної хвороби (BDV), були отримані від Veterinary Laboratories Agency (Surrey, UK). Проби сироватки великої рогатої хвороби #77, #816, #1281, та #1434 були отримані від Pfizer.

Химерні пестивіруси були отримані заміною гену E^{ms} BVDV-NADL штаму на пестивірусний E^{ms} ген жирафа (G-E^{ms}), північного оленя (R-E^{ms}), або вилорога (P-E^{ms}) з застосуванням способу OE- ПЦР. Були застосовані PfuUltra™ II fusion HS ДНК - полімераза (Stratagene; La Jolla, CA) або Platinum® Taq ДНК - полімераза High Fidelity (Invitrogen). Олігонуклеотидні праймери (з супровідними ідентифікаційними номерами послідовностей (SEQ ID NO)) для OE- ПЦР та для створення повнорозмірної вірусної ДНК є перелічені у Таблиці 1.

Таблиця 1

Олігонуклеотидні праймери, застосовані для ПЛР – ампліфікації

Ідентифікацій- ний номер послідовності	Назва	Походження	Послідовності (5'-3')	Сайт зв'язування праймера (підкреслено)
1	Оліго- B5	T7 + NADL	GTGTTAATACGACTCACTATAG TATACGAGAATTAGAAAAGGC	Промотор T7
2	Оліго- 84	NADL	GGGGGCTGTTAGAGGTCTTCC	
3	Оліго- 127	G-E ^{rns} + NADL	AATTCCACTGGGTGATGTTCTCTC CCATTGTAACCTGAAACAAAAC	G-E ^{rns} N- термінус
4	Оліго- 128	G-E ^{rns}	GAGAACATCACCCAGTGGAA	G-E ^{rns} N- термінус
5	Оліго- 129	G-E ^{rns}	TGCGTGGGCTCCAAACCATGT	
6	Оліго- 130	G-E ^{rns} + NADL	AACATGGTTTGGAGCCCACGCA GCTTCCCCTTACTGTGATGTCG	G-E ^{rns} C- термінус
7	Оліго- 131	R-E ^{rns} + NADL	GGTCCACTGTGTTATATTCTCTC CCATTGTAACCTGAAACAAAAC	R-E ^{rns} N- термінус
8	Оліго- 132	R-E ^{rns}	GAGAATATAACACAGTGGAAAC	
9	Оліго- 133	R-E ^{rns}	TGCATTAGCTCCGAACACGTT	
10	Оліго- 134	R-E ^{rns} + NADL	AACGTGGTTTCGGAGCTAATGCA GCTTCCCCTTACTGTGATGTCG	R-E ^{rns} C- термінус
11	Оліго- 135	R-E ^{rns} + NADL	GGTCCACTGAGTTATATTAC TCCATTGTAACCTGAAACA	P-E ^{rns} N- термінус
12	Оліго- 136	P-E ^{rns}	GTGAATATAACTCAGTGGAAAC	
13	Оліго- 137	P-E ^{rns}	TGCCTGTGCCCCAAACCATGT	
14	Оліго- 138	P-E ^{rns} + NADL	AACATGGTTTGGGGCACAGGCA GCTTCCCCTTACTGTGATGTCG	P-E ^{rns} C- термінус
15	Оліго- 175	NADL	GTTATCAATAGTAGCCACAGAAT	
16	Оліго- 177	NADL	TCCACCCTCAATCGACGCTAAA	
17	Оліго- 237	CM5960	CCCTGAGGCCTTCTGTTCTGAT	
18	Оліго- P7	CM5960	CACTTGTCGGAGGTACTACTACT	
19	Оліго- P8	CM5960	CTTGTCTATCTTATCTCTATTGC	
20	Оліго- P3	CM5960	ACTATCTGAACAGTTGGACAGG	
21	Оліго- 296-1	T7 + CM53637	GTGTTAATACGACTCACTATA GTATACGAGATTAGCTAAAG	Промотор T7
22	Оліго- 297	P- E ^{rns} +CM53637	CCAGGTTCCACTGAGTTATATTAC TCCTGTTACCAGCTGAAGCAGAA	P-E ^{rns} N- термінус
23	Оліго- 298	P- E ^{rns} +CM53637	AACATGGTTTGGGGCACAGGCA GCAAGTCCATACTGTAAAGTG	P-E ^{rns} C- термінус
24	Оліго- 299	CM53637	TTAATGCCCTCCCTGTCTCTACACCT	
25	Оліго- 300	CM53637	AGGATGAGGATCTAGCAGTGGATCT	

26	Оліго-303	CM53637	CCATAGCCATCTGCTCAGACAGTA	
27	Оліго-92-1	CM53637	GGGGCTGTCAGAGGCATCCTCTAGTC	
28	Оліго-321	CM53637	AGCCACTACACCTGTCACGAGAAG	
29	Оліго-250	NADL	CACCATGAAAATAGTGCCCAAAGAATC	NADL-C термінус
30	Оліго-252	NADL	TTAAGCGTATGCTCCAAACCACGTC	NADL-E ^{rns} термінус

Плазміда, що містить повнорозмірну кДНК BVDV-NADL була виділена з dam- E. coli K12 GM2163. Плазміда була метильована *in vitro* з dam метилтрансферазою та S-аденозилметіоніном (New England Biolabs; Ipswich, MA). G-E^{rns}, R-E^{rns}, та P-E^{rns} гени (реєстраційні номери GenBank NC_003678, NC_003677, та AY781152, відповідно) синтезували та клонували у вектор клонування.

Для створення химерної ДНК BVDV-NADL/G-E^{rns}, фрагмент кодування BVDV-NADL для 5'UTR до 3' кінця С – гена ампліфікували за допомогою ПЛР з метильованою плазмідною з праймерами Оліго B-5 та Оліго 127. G-E^{rns} ген ампліфікували за допомогою ПЛР з плазмідною ДНК, що містить G-E^{rns} ген з Оліго 128 та Оліго 129. BVDV фрагмент кодування для E1 до 3'UTR ампліфікували за допомогою ПЛР з метильованою плазмідною з Оліго 130 та Оліго 84. Продукти ПЛР очистили від гелю за допомогою QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen; Valencia, CA). Очищені продукти ПЛР обробили Dpn I та екзонуклеазою 1 (New England Biolabs). Оброблені продукти ПЛР зібрали для створення повнорозмірного химерного геному BVDV-NADL/G-E^{rns} за допомогою ПЛР з застосуванням Оліго B-5 та Оліго 84.

Для створення химерної ДНК BVDV-NADL/R-E^{rns}, фрагмент кодування BVDV-NADL для 5'UTR до 3' - кінця С - гена ампліфікували за допомогою ПЛР з метильованою плазмідною з праймерами Оліго B-5 та Оліго 131. R-E^{rns} ген ампліфікували за допомогою ПЛР з плазмідною, що містила R-E^{rns} ген з Оліго 132 та Оліго 133. BVDV фрагмент кодування для E1 до 3'UTR ампліфікували за допомогою ПЛР з метильованою плазмідною з Оліго 134 та Оліго 84. Продукти ПЛР очистили від гелю за допомогою QIAquick Gel Extraction Kit. Очищені продукти ПЛР обробили з Dpn I та екзонуклеазою 1. Оброблені продукти ПЛР зібрали для створення повнорозмірного химерного геному BVDV-NADL/R-E^{rns} за допомогою ПЛР з Оліго B-5 та Оліго 84.

Для створення химерної ДНК BVDV-NADL/P-E^{rns}, фрагмент кодування BVDV-NADL для 5'UTR до 3' - кінця С - гена ампліфікували за допомогою ПЛР з метильованою плазмідною з праймерами Оліго B-5 та Оліго 135. P-E^{rns} ген ампліфікували за допомогою ПЛР з плазмідною ДНК, що містить P-E^{rns} ген з Оліго 136 та Оліго 137. Фрагмент кодування BVDV для E1 до 3'UTR ампліфікували за допомогою ПЛР з метильованою плазмідною з Оліго 138 та Оліго 84. Продукти ПЛР очистили від гелю за допомогою QIAquick Gel Extraction Kit. Очищені продукти ПЛР обробили з Dpn I та екзонуклеазою 1. Оброблені продукти ПЛР зібрали для створення повнорозмірного химерного геному BVDV-NADL/P-E^{rns} за допомогою ПЛР з Оліго B-5 та Оліго 84.

Для послідовного підтвердження химерних E^{rns} ділянок, фрагмент, відповідний 5' UTR до ділянки E1 кожного зібраного повнорозмірного химерного геному ампліфікували за допомогою ПЛР з застосуванням Оліго B-5 та Оліго 175, та продукти ПЛР секвенували та були піддані аналізу. Повнорозмірні вірусні геномні РНК - транскрипти були генеровані з плазмід, що містила повнорозмірну кДНК BVDV-NADL або химерні ДНК BVDV-NADL/E^{rns} за допомогою mMessage mMachine T7 Ultra kit (Ambion; Austin, TX). Якість та кількість кожного РНК – транскрипту визначали на РНК - гелі та спектрофотометрі Nanodrop (Nanodrop; Wilmington, DE). Протягом ночі культури RD клітин у лунках 6-лункових планшетів трансфікували з вірусною РНК з застосуванням реагенту Ліпофектин (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника. Після трансфекції клітини інкубували при 37°C протягом 3 діб. Супернатанти, що були зібрані, зберігалися при -80°C.

Вірусні РНК з зібраних супернатантів отримали з застосуванням MagMax™ AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Ambion) відповідно до інструкцій виробника. РНК зворотно транскрибували та ділянку кожної химери, що кодує N^{pro} до E1 ампліфікували з застосуванням праймерів Оліго 177 та Оліго 175 (Таблиця 1), та системи ThermoScript™ RT-ПЛР System (Invitrogen), відповідно до інструкцій виробника. Потім RT-продукти ПЛР секвенували.

Клітинні моношари з або трансфекцією вірусною РНК або вірусною інфекцією зафіксували у 80% ацетоні. Були застосовані BVDV- або BDV-специфічні моноклональні антитіла (Mabs) у поєднанні з анти-мишачою IgG пероксидазою ABC Elite kit (Vector Laboratories; Burlingame, CA). Забарвлення створено з застосуванням субстрату VIP пероксидази (Vector Laboratories).

5 Титри химерного вірусу визначені за допомогою способу граничного розведення. Вірусні проби серійно 10-разово розведені та переміщені до 96-лункових планшетів (100 мкл на лунку), з 4 - 6 повторами на розведення. Далі у кожну лунку додали 100 мкл суспензії ВК-6 клітин, та планшети інкубували при 37°C протягом 4 - 5 діб. Вірусну інфекцію визначали шляхом цитопатичної дії (CPE) та фарбуванням MAb. Вірусні титри обчислені з застосуванням способу

10 Spearman-Kärber.

Для отримання біологічних клонів кожної химери, вірусні проби були спочатку 100-разово розведені, а потім піддані ще 10-разовим серіям розведень. 100 мкл розведеного вірусу перенесено до кожної лунки 96- лункового планшета, 4 повторення на розведення. Далі у кожну лунку додано 100 мкл ВК-6 клітин, та планшети інкубували при 37°C протягом 4 діб.

15 Супернатанти, що збирали та перенесли до нових планшетів зберігалися при -80°C. Клітини зафіксували та забарвили. Супернатанти з лунок, що містили одиничні осередки вірусу збирали та поширили у якості вірусних запасів.

Дослідження кинетики росту проводилися з колбами Т-25, що містили клітини ВК-6 . Коли клітини досягали приблизно 90% конфлюентності, їх інфікували кожною химерою з MOI 0.02.

20 Після адсорбції протягом 1 год., інокулят видалили. Клітини тричі промили PBS, та далі додали 3 мл свіжої середи зростання. Далі проби збирали у різні проміжки часу від 0 до 144 годин для визначень титру.

Для тесту вірусної нейтралізації, заморожені запаси трьох BVDV-NADL/E^{ms} химер, батьківський BVDV-NADL, та BVDV-CM5960 (BVDV тип I) розводили у DMEM до 4,000 TCID₅₀/мл. Сироватку з великої рогатої худоби, імунізовану з Bovi-Shield Gold (Pfizer; New York, NY), із заздалегідь визначеними титрами проти BVDV обох типів I та II, дворазово серійно розводили з DMEM. 50 мкл вірусу (200 TCID₅₀) перемішали з рівним об'ємом розведеної сироватки великої рогатої худоби у 96-лункові планшети для культури тканини (4 повтору/розведення), інкубували при 37°C протягом 60 хв. Далі 100 мкл ВК-6 клітин додали у

30 кожну лунку, та планшети інкубували при 37°C протягом 3-6 діб. Також, у якості контролю, до кожного планшета була включена сироватка, негативна до антитіл BVDV. Кінцеву точку титрів нейтралізації сироватки визначали за допомогою CPE та імуногістохімії (IHC) на 3 та 6 добу.

В результаті були створені химерні ДНК BVDV-NADL/E^{ms}, у яких ген/білок NADL E^{ms} був замінений на E^{ms} пестивірусу жирафа (G-E^{ms}), північного оленя (R-E^{ms}) або вилорога (P-E^{ms}). Плазмідну ДНК, що містить кожну з химерних E^{ms} ділянок секвенували для підтвердження автентичності послідовності. Наступні химерні пестивіруси були депоновані з American Type Culture Collection (ATCC®), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110, USA, у квітні 2, 2009, та їх життєздатність підтверджено ATCC® у квітні 23, 2009: BVDV-NADL/G-E^{ms} (PTA-9938), BVDV-NADL/P-E^{ms} (PTA-9939), та BVDV-NADL/R-E^{ms} (PTA-9940).

40 Химерні віруси BVDV-NADL/E^{ms} були отримані з RD клітин після трансфекції з in vitro-транскрибованою вірусною РНК. Екстенсивна цитопатична дія (CPE) у RD клітинах спостерігалася через 48 - 72 годин після трансфекції з BVDV-NADL/G-E^{ms} або BVDV-NADL/R-E^{ms} РНК - транскриптами. Проте, з BVDV-NADL/P-E^{ms} вірусом явної цитопатичної дії не спостерігалася. Супернатанти культури збирали з кожної лунки, та клітини, що залишилися,

45 зафіксували та забарвили з BVDV NS3-специфічні MAb антитілом 20.10.6. Клітини, інфіковані одним з трьох химерних пестивірусів інкубували з MAb. Вірусні РНК отримали з зібраних супернатантів, та секвенували для підтвердження E^{ms} генів всіх трьох химер.

Три BVDV-NADL/E^{ms} химери перевірили на їх реакційну здатність до кожного з декількох E^{ms} Mabs, специфічних для BVDV або BDV. Результати наведені у Таблиці 2. Химера BVDV-NADL/R-E^{ms} реагувала з усіма трьома BDV E^{ms} MAb, в той час як BVDV-NADL/G-E^{ms}, BVDV-NADL/P-E^{ms} та батьківський вірус BVDV-NADL не розпізнавалися BDV E^{ms} MAb. BVDV-NADL/G-E^{ms}, BVDV-NADL/R-E^{ms}, та батьківський вірус NADL реагували з pan-BVDV E^{ms} MAb 15C5. MAb, специфічні до E^{ms} BDV або BVDV не реагували з химерою BVDV-NADL/P-E^{ms}.

Таблиця 2

Реактивність химер BVDV-NADL/E^{rns} до МАb

МАb специфічність	Реактивність химери			
	BVDV-NADL/G-E ^{rns}	BVDV-NADL/R-E ^{rns}	BVDV-NADL/P-E ^{rns}	BVDV-NADL
WS 371 BDV E ^{rns}	-	+++	-	-
WS 373 BDV E ^{rns}	-	+++	-	-
WS363 BDV E ^{rns}	-	+++	-	-
15C5 BVDV E ^{rns}	+++	+++	-	+++
20.10.6 пестивірус NS3	+++	+++	++	+++

Для того, щоб визначити, чи мають химерні E^{rns} білки у вірусах будь-який вплив на розпізнавання вірус-нейтралізуючих епітопів антитілами з BVDV-вакцинованої великої рогатої худоби, з трьома химерами BVDV-NADL/E^{rns}, BVDV-NADL, та BVDV-CM5960 (BVDV типу I провели дослідження нейтралізації вірусу. Була використана сироватка з 4 корів з титрами нейтралізуючих антитіл, починаючи від 0 до більш ніж 40,000 (попередньо визначеними проти BVDV-CM5960). Результати (Таблиця 3) показують, що титри проти всіх трьох химер були звичайно порівнянними з подібними для батьківського BVDV-NADL та BVDV-CM5960. Титри нейтралізації проти BVDV-NADL/P-E^{rns} були злегка нижчими, ніж ті, що були проти інших двох химер, BVDV-NADL та BVDV-CM5960.

Таблиця 3

Титри нейтралізації антисироватки корів проти химер BVDV-NADL/E^{rns}

Корова Сироватка #	Титри нейтралізації				
	BVDV-NADL/G-E ^{rns}	BVDV-NADL/R-E ^{rns}	BVDV-NADL/P-E ^{rns}	BVDV-NADL	CM5960
816	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
77	320	320	320	160	320
1281	6400	12800	3200	3200	25600
1434	51200	25600	6400	25600	51200

Три химери BVDV-NADL/E^{rns} дворазово біологічно клонували шляхом граничного розведення. У результаті отримали три клони BVDV-NADL/G-E^{rns}, чотири BVDV-NADL/R-E^{rns}, та три BVDV-NADL/P-E^{rns}. Кожен з цих клонів збільшили у обсязі у 1-3 рази. Результати титрування показали, що збільшений клон 1 BVDV-NADL/G-E^{rns}, клони 3 та 5 BVDV-NADL/R-E^{rns}, та клон 2 BVDV-NADL/P-E^{rns} дали найвищі титри. Дослідження кінетики росту проводили з клоном 1 BVDV-NADL/G-E^{rns}, клоном 3 BVDV-NADL/R-E^{rns}, клоном 2 BVDV-NADL/P-E^{rns}, та неклонованим BVDV-NADL/P-E^{rns}. Криві росту, генеровані з цих клонів були порівняні з батьківським BVDV-NADL. Химери BVDV-NADL/G-E^{rns} та BVDV-NADL/R-E^{rns} мали ростові кінетики, подібні до батьківського BVDV-NADL, в той час, як BVDV-NADL/P-E^{rns} зростав повільніше та мав менші титри у кожен проміжок часу, ніж батьківський вірус та інші дві химери.

Було створено три химерні віруси BVDV-NADL/E^{rns} у яких ген/білок NADL E^{rns} замінили на E^{rns} пестивіруса жирафа, північного оленя або вилорога. Всі три химери були життєздатні та інфекційні як у RD, так і у ВК-6 клітинах. Результати In vitro демонструють, що химерні E^{rns} білки не впливають на нейтралізацію химер антисироваткою з BVDV-вакцинованої великої рогатої худоби. Це говорить про те, що нейтралізуючі епітопи у химерних вірусах, незалежно від того, де вони знаходяться, не були порушені при замінах E^{rns}.

Химерні віруси мали різні кінетики росту та по-різному реагували до BVDV або моноклональних антитіл BDV E^{rns}. BVDV-NADL/G-E^{rns} та BVDV-NADL/R-E^{rns} мали кінетики росту, подібні до батьківського вірусу, в той час як BVDV-NADL/P-E^{rns} зростав повільніше та мав менший титр, ніж батьківський вірус. Обидва BVDV-NADL/G-E^{rns} та BVDV-NADL/R-E^{rns} реагували на моноклональне антитіло BVDV E^{rns} 15C5, в той час як BVDV-NADL/P-E^{rns} не реагував. Результати порівняння послідовності показали, що G-E^{rns} та R-E^{rns} мали більшу тотожність послідовності до BVDV NADL (75.8% та 76.2%, відповідно) ніж P-E^{rns} (59%). Ці дані,

разом з результатами реактивності MAb, свідчать, що G-E^{ns} та R-E^{ns} можуть бути антигенне більш подібними до батьківського E^{ns}, ніж P-E^{ns}.

Приклад 2. Конструкція, серологічна характеристика та перевірка ефективності химерних пестивірусних вакцин-кандидатів.

Штам CM5960 BVDV типу 1 та штам CM53637 BVDV типу 2 були отримані від Pfizer Global Manufacturing. Вірусні РНК отримали з застосуванням MagMaxTM AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Ambion) відповідно до інструкцій виробника. РНК зворотно транскрибували для генерування кДНК з застосуванням ThermoScriptTM RT-ПЛР System (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника. Химерні пестивіруси були створені заміщенням E^{ns} гена CM5960 та CM53637 геном E^{ns} ген пестивірусу вилорогу (P-E^{ns}) з застосуванням способу перекриваючого сплайсинг-розширення ПЛР. Олігонуклеотидні праймери, застосовані для ПЛР, перелічені у Таблиці 1.

Для створення химерної CM5960/P-E^{ns} ДНК, фрагмент CM5960 кДНК між 5'UTR та 3' - кінцем С - гена ампліфікували за допомогою ПЛР з кДНК CM5960 з праймерами Оліго В-5 та Оліго 135. P-E^{ns} ген ампліфікували за допомогою ПЛР з плазмідною ДНК, що містить P-E^{ns} ген з Оліго 136 та Оліго 137. Третій фрагмент між початком Е1 та 3' - кінцем Е2 ампліфікували за допомогою ПЛР з кДНК CM5960 з праймерами Оліго 138 та Оліго 237.

Вищенаведені фрагменти очистили від гелю з застосуванням QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), та зібрали за допомогою ПЛР для створення одного фрагмента з Оліго В-5 та Оліго 237. Фрагмент між ділянкою Е1 та ділянкою NS5В ампліфікували за допомогою ПЛР з кДНК CM5960 з праймерами Оліго Р7 та Оліго Р8. Інший фрагмент між ділянкою NS5А та кінцем 3'UTR ампліфікували за допомогою ПЛР з кДНК CM5960 з праймерами Оліго Р3 та Оліго 84. Далі ці три фрагменти очистили від гелю та зібрали за допомогою ПЛР з Оліго В-5 та Оліго 84 для створення повнорозмірного химерного геному CM5960L/P-E^{ns}.

Для створення химерної CM53637/P-E^{ns} ДНК, фрагмент кДНК CM53637 між 5'UTR та 3' - кінцем С - гена ампліфікували за допомогою ПЛР з кДНК CM53637 з праймерами Оліго 296-1 та Оліго 297. Другий фрагмент між початком Е1 та 3' - кінцем Е2 ампліфікували за допомогою ПЛР з кДНК CM53637 з праймерами Оліго 298 та Оліго 303. Ці два фрагменти очистили від гелю, та разом з фрагментом кодування для Р-E^{ns} гена (див.вище), зібрали за допомогою ПЛР для створення одного фрагмента з застосуванням Оліго 296-1 та Оліго 303.

Далі фрагмент між ділянками Е1 та NS3 ампліфікували за допомогою ПЛР з кДНК CM53637 з праймерами Оліго 298 та Оліго 299. Інший фрагмент між ділянкою NS3 та кінцем 3'UTR також ампліфікували за допомогою ПЛР з кДНК CM53637 з праймерами Оліго 300 та Оліго 92-1. Ці два фрагменти та один вище очистили від гелю та зібрали за допомогою ПЛР з Оліго 296-1 та Оліго 92-1 для створення повнорозмірного химерного геному CM53637/P-E^{ns}.

Повнорозмірні вірусні геномні РНК - транскрипти генерували з химерної CM5960/P-E^{ns} та химерної CM53637/P-E^{ns} ДНК з застосуванням mMessage mMachine T7 Ultra kit (Ambion). Якість та кількість кожного РНК- транскрипту визначали у РНК гелі. Культури RD клітин у лункках 6- лунккових планшетів трансфікували з вірусною РНК з застосуванням реагенту Ліпофектин (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника протягом ночі. Після трансфекції, клітини інкубували 3 доби при 37°C. Клітини з супернатантами пасивували від одного до декілька разів у клітинах RD та/або ВК-6. Далі супернатанти серійно пасивували у клітинах ВК-6. Супернатанти зібрали та зберігали при -80°C.

Для підтвердження ідентичності вилученого рекомбінантного вірусу, вірусну РНК зібраних супернатантів отримали з застосуванням MagMaxTM AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Ambion) відповідно до інструкцій виробника. РНК зворотно транскрибували з застосуванням ThermoScriptTM RT- PCR System (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника та ділянку кожної химери між 5' UTR та Е2 або р7 ампліфікували за допомогою ПЛР з застосуванням праймерів Оліго В-5 та Оліго 237 (для CM5960/P-E^{ns} химери) або Оліго 296-1 та Оліго 321 (для CM53637/P-E^{ns} химери) (Таблиця 1), RT-продукти ПЛР далі були секвеновані.

Клітинні моношари після трансфекції вірусної РНК, або після вірусної інфекції зафіксували у 80% ацетоні. Для імуногістохімії були застосовані BVDV- специфічні MAb у поєднанні з анті-мишачою IgG пероксидазою ABC Elite Kit (Vector Laboratories). Забарвлення створили з застосуванням субстрату VIP пероксидази (Vector Laboratories).

В результаті були створені та отримані химерні CM5960/P-E^{ns} та CM53637/P-E^{ns} віруси. Присутність ділянок 5'UTR - Е2, у тому числі химерні ділянки E^{ns} вилорогу, була підтверджена секвенсом. Обидві химери були життєздатними та інфекційними як у RD, так і у ВК-6 клітинах. Обидві химери не були реакційними до BVDV E^{ns} специфічного MAb 15C5, були реакційними до BVDV NS3 специфічного MAb 20.10.6 (імунохімічне фарбування).

Послідовність для химерного пестивірусу (BVDV-CM5960 (BVDV тип I)/P-E^{rns}) є присутньою у послідовності SEQ ID NO: 31. Послідовність для химерного пестивірусу (BVDV-CM53637 (BVDV тип II)/P-E^{rns}) є присутньою у послідовності SEQ ID NO: 32.

Химеру CM5960/P-E^{rns} біологічно клонували шляхом граничного розведення (див. для методології Приклад 1 вище).

Приклад 3. Перевірка ефективності кандидатів вакцини химерного пестивірусу на моделі респіраторного захворювання телят.

BVDV – негативні здорові телята випадково розподілили по групам дослідження та утримували під наглядом ветеринара. Тестову вакцину об'єднали зі стерильним ад'ювантом, та вводили або внутрішньом'язовою (IM) або підшкірною (SC) ін'єкцією, або інтраназальною (IN) інюкуляцією. Вакцину надавали у вигляді однієї або двох доз. Було введено дві дози вакцини, від 21 до 28 діб по окремоті. Потім, на 21-28 добу після останньої вакцинації тварин інфікували штамом BVDV типу 1 або 2. Інокулят для інфікування додавали інтраназально розділеною дозою у 4 мл, по 2 мл у кожную ніздрю. Контрольні групи містили невакциновані, неінфіковані тварини та/або невакциновані, інфіковані тварини, які також утримувалися протягом дослідження.

Клінічні параметри щоденно контролювали, у тому числі ректальну температуру, рівень депресії, анорексії, та діареї. Титри нейтралізації сироватки визначали постійним вірусним аналізом зі зниженням сироватки у культурі клітин корів, з застосуванням серійних розведень сироватки в поєднанні зі штамом BVDV типу 1 або 2. Була зроблена спроба виділення BVDV у культурі клітин корів з периферичної крові після інфікування. BVDV-позитивну клітинну культуру визначали непрямою імуофлуоресценцією. Для виявлення захисту після інфікування, зниження ступню інфекції демонстрували на вакцинованих групах порівняно з контрольними групами.

Приклад 4. Перевірка ефективності вакцини химерного пестивірусу на моделі вагітної корови з телям.

Отримані BVDV-негативні корови та телиці племінного віку випадково розподілили до тестових груп вакцинації або плацебо (контрольних) груп. Корови були щеплені двічі внутрішньом'язовою (IM) або підшкірною (SC) ін'єкцією, або вакциною, або плацебо, від 21 до 28 діб по окремоті. Впродовж наступної другої вакцинації, всі корови отримали ін'єкції IM простогландину для синхронізації еструсу. Корів, де спостерігався еструс, запліднили шляхом штучного запліднення сертифікованою BVDV-негативною спермою. Приблизно на 60 день вагітності, статус вагітності корів визначали шляхом ректальної пальпації.

Приблизно через 6 тижнів, корів з підтвердженою вагітністю випадково відібрали з кожної тестової групи. Кожну з цих корів інфікували інтраназальною інюкуляцією BVDV типу 1 або 2. Проби крові для виділення BVDV збирали у день інфікування та на різних інтервалах після інфікування. На 28 добу після інфікування, були проведені лівосторонні лапаротомії та з кожної корови виділена амніотична рідина. Безпосередньо перед операцією, з кожної корови відібрали зразки крові для досліджень нейтралізації сироватки. Після кесарева печіння, з кожного плоду також збирали зразки крові. Далі плоди було піддано евтаназії, та тканини асептично зібрані для отримання BVDV. У випадках мимовільних викидней, проби крові брали з матки при виявленні викидня, та через два тижні. Парні проби крові та абортіваних плодів піддавали серологічній перевірці та отриманню вірусу.. Ефективність вакцини продемонстрована шляхом втрати або зниження внутрішньоутробної інфекції та пізніх викидней.

Приклад 5. Діагностичні тести для диференціації між вакцинованою та природно зараженою великою рогатою худобою.

Велика рогата худоба, вакцинована вакциною заявленого винаходу може бути порівняна з великою рогатою худобою, природно інфікованою BVDV дикого типу. Велику рогату худобу різного віку вакцинували вакциною з або живим або інактивованим химерним пестивірусом відповідно до наданих інструкцій. Проби сироватки відбирали у строк 2-3 тижня або після наступної вакцинації. Для розрізнення великої рогатої худоби, яка отримала вакцину химерного пестивірусу від подібної, інфікованої штамом BVDV дикого типу, проби сироватки були перевірені за допомогою диференціального діагностичного тесту. Химерний пестивірус викликає продукування специфічних антитіл, які зв'язуються з білком E^{rns} химерного пестивірусу, але не з білком E^{rns}, якій присутній у BVDV дикого типу, та, у контексті з BVDV дикого типу, навпаки. Генеруються специфічні антитіла, які розпізнає білок E^{rns}, присутній у BVDV дикого типу, але не білок E^{rns}, присутній у химерному пестивірусі. Способи дослідження специфічності зв'язування антитіл та афінності є добре відомі фахівцям, та охоплюють способи імуноаналізу, як-то конкурентний ІФА, прямий пептидний ІФА, Вестерн блотинг, непрямі імуофлуоресцентні аналізи, тощо.

Для конкурентного ІФА, у якості джерела антигенів застосовують цілі або часткові вірусні антигени дикого типу або химерного пестивірусу, в тому числі білок E^{ns} (отриманий природним, синтетичним або рекомбінантним шляхом). Після покриття ІФА планшету антигеном в лужному середовищі, додали проби сироватки великої рогатої худоби та розведення додають разом з оптимізованим розведенням МАb, специфічного для або білка E^{ns} BVDV дикого типу або білка E^{ns} химерного пестивірусу, та інкубують 30 -90 хв. Або пероксидаза хрину або лужна фосфатаза зв'язується з МАb для забезпечення колориметричних виявлень зв'язування. Після промивання планшетів додають ензим-специфічний хроматографічний субстрат, та після етапу кінцевої інкубації, вимірюється оптична щільність кожної лунки з довжиною хвилі, прийнятною для застосованого субстрату. Рівень інгібування зв'язування міченого mAb залежить від рівню антитіл сироватки великої рогатої худоби, що специфічно розпізнають білок, який нанесено на планшет.

У випадку химерного білку E^{ns} (наприклад, E^{ns} вилорогу), присутнього у химерному пестивірусі у якості тестового антигену, втрата зв'язування специфічних до E^{ns} химерного пестивірусу mAb, яка вказує на присутність антитіл у сироватці великої рогатої худоби, що розпізнають специфічний до химерного пестивірусу епітоп, свідчить про вакцинацію. На відміну, сироватка з великої рогатої худоби, яка не імунізована, але природно інфікована, не буде містити антитіла, які можуть зв'язуватися з білком E^{ns} химерного пестивірусу, який нанесено на планшет. Отже, специфічний до E^{ns} химерного пестивірусу mAb буде зв'язуватися з білком зв'язування, що приводить до подальшого проявлення забарвлення.

У випадку білку E^{ns}, який присутній у BVDV дикого типу у якості тестового антигену, втрата зв'язування mAb, специфічного до E^{ns} BVDV дикого типу свідчить про присутність антитіл у сироватці великої рогатої худоби, які розпізнають специфічний до BVDV дикого типу епітоп, що свідчить про природну (дикого типу) інфекцію. На відміну, сироватка з великої рогатої худоби, що імунізована вакциною химерного пестивірусу не буде містити антитіла, які будуть зв'язуватися з білком E^{ns} BVDV дикого типу, який нанесено на планшет. Отже, mAb, специфічний до E^{ns} BVDV дикого типу буде зв'язуватися з білком зв'язування, що приводить до подальшого проявлення забарвлення.

Для проведення такого аналізу застосовували наступні способи.

По-перше, був створений рекомбінантний бакуловірус, який експресує E^{ns} BVDV-NADL. Частина С - білку BVDV, разом з повнорозмірним геном E^{ns}, ампліфікували за допомогою ПЛР з плазмиди, що містила повнорозмірну кДНК BVDV-NADL з праймерами Оліго 250 (SEQ ID NO: 29; 5'-CACCATGAAAATAGTGCCCCAAAGAATC-3') та Оліго 252 (SEQ ID NO: 30; 5'-TTAAGCGTATGCTCCAAACCACGTC-3'). Продукт ПЛР клонували у pENTRTM /D-TOPO (Invitrogen) та трансформували у One Shot[®] Competent E. coli (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника. Рекомбінантна плазміда була виділена та вставка підтверджена шляхом секвенування. Ця плазміда позначена як pENTR-E^{ns}. Для створення рекомбінантного бакуловірусу, що експресує BVDV-NADL E^{ns} застосували pENTR-E^{ns} та BaculoDirectTM Baculovirus Expression System (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника. Створений рекомбінантний бакуловірус, що експресує BVDV-NADL E^{ns}, бляшки були очищені, збільшені, та зберігалися при 4° C та -80° C.

Експресія E^{ns} BVDV-NADL у рекомбінантному бакуловірусі була підтверджена шляхом імунофлуоресцентного забарвлення та Вестерн-блотингу проти BVDV E^{ns} специфічного МАb 15C5 наступними традиційними способами Вестерн-блотингу.

Для виробництва ІФА антигену, клітини SF21 у 100 мл суспензійній культурі були інфіковані 0.5 мл з запасів рекомбінантного бакуловірусу. Клітини зібрали після 4-добової інкубації при 27° C. Далі вони були центрифуговані на малій швидкості (приблизно 800g) протягом 10 хв. для збору клітин та одноразово промиті PBS. Клітини лізували з 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8.0, та 1% IGEPAL CA-630. Перший раз суміш інкубували на льоду протягом 10 хв. та далі 1 годину при -80° C. Після відтаювання, суміш освітлили центрифугуванням при 1000g протягом 15 хв. Супернатант також освітлили центрифугуванням при 8000g протягом 20 хв. при 4° C. Кінцевий супернатант, позначений, як Baculo-E^{ns} лізат, розділили на аліквоти та зберігали при -80° C.

При проведенні аналізу, на ІФА планшети нанесли 100 мкл /лунку МАb WB210 (Veterinary Laboratory Agency; E^{ns} BVDV Тип 1 специфічний), протягом ночі при 4° C з, розведення 1:1000 у карбонат / бікарбонатному буфері (pH 9.0). Наступного дня, планшети тричі промили та блокували блокуючим буфером (PBS, що містить 1% натрієвої солі казеїну та 0.05% Tween 20) впродовж 1 год. при 37° C. Потім планшети тричі промили блокуючим буфером, у кожен лунку додали 100 мкл Baculo-E^{ns} лізату (розведеного 1:3200 у PBS), та планшети інкубували 1 год. при 37° C.

- Після трьох промивань блокуючим буфером, у кожен лунку додали 100 мкл нерозведеної сироватки великої рогатої худоби, за винятком однієї колонки лунок (що була застосована у якості не конкуруючих 15C5-HRP контролів), та планшети інкубували 1 год. при 37° С. Після наступних трьох промивань з блокуючим буфером, у кожен лунку додали 100 мкл МАb 15C5-HRP кон'югату (BVDV E^{ms} специфічний, 1:20,000 розведений у блокуючому буфері), та планшети інкубували 1 год. при 37° С. Після наступних трьох промивань з блокуючим буфером, у кожен лунку додали 100 мкл субстрату ABTS (розчини субстрату пероксидази А + В; KPL, USA), та планшети інкубували 20 - 60 хв. при кімнатній температурі для проявлення барвника. Оптичну щільність (OD) вимірювали при довжині хвилі 405 нм. Відсоток зниження OD для кожної проби сироватки обчислювали з застосуванням наступної формули:

[1 - (OD проби ÷ середня OD 15C5-HRP контролів)] x 100%.

Результати:

- Всі зразки сироватки, які дали позитивний результат на нейтралізацію вірусу (VN) показали більш ніж 82% скорочення оптичної щільності, за виключенням проби ID# 13851 (Таблиця 4). Всі зразки сироватки, які дали негативний результат на нейтралізацію вірусу мали менш ніж 17% скорочення оптичної щільності, за виключенням проби ID# 5150 (Таблиця 4). Неприйнятність можна пояснити відмінностями у проведенні аналізів, у тому, як вони вимірюють різні антитіли, та від частки специфічних антитіл, що варіюється в залежності від тварини.

Таблиця 4

BVDV позитивні та негативні проби сироватки у конкурентному ІФА МАb15C5

Рядок #	ID проби	O.D. проби	Середня O.D. № стопчика сироватки	% скорочення
1	40021	0.0615	0.907013	93.21950182
2	40014	0.0965	0.907013	89.36068171
3	40422	0.0639	0.907013	92.95489701
4	40372	0.0754	0.907013	91.68699897
5	40222	0.0634	0.907013	93.01002301
6	40152	0.0894	0.907013	90.14347093
7	13461	0.0663	0.907013	92.6902922
8	13851	0.641	0.907013	29.32846607
9	13801	0.1599	0.907013	82.37070472
10	13904	0.073	0.907013	91.95160378
11	40504	0.0625	0.907013	93.10924981
12	40471	0.0914	0.907013	89.92296693
13	35037	0.0639	0.907013	92.95489701
14	13690	0.159	0.907013	82.46993152
15	13797	0.0859	0.907013	90.52935294
16	6127	0.0886	0.907013	90.23167253
17	5138	0.7434	0.907013	18.03866097
18	5139	0.8423	0.907013	7.13473787
19	5141	0.7732	0.907013	14.75315128
20	5142	0.7475	0.907013	17.58662776
21	5144	0.8293	0.907013	8.568013909
22	5145	0.9488	0.907013	-4.607100449
23	5146	0.9451	0.907013	-4.199168038
24	5147	1.0138	0.907013	-11.77348064
25	5148	0.9322	0.907013	-2.7769172
26	5149	0.9794	0.907013	-7.980811741
27	5150	0.1157	0.907013	87.24384325
Рядки 1-16: Позитивні проби сироватки великої рогатої худоби				
Рядки 17-27: Негативні проби сироватки великої рогатої худоби				
- Всі проби сироватки, застосовані у ІФА, були нерозведеними.				

20 O.D. – оптична щільність.

Хоча заявлений винахід було описано досить докладно з посиланням на його деякі версії, можливі варіанти. Таким чином, об'єм доданої формули винаходу не повинен бути обмеженим описом версій, що містяться в цьому документі.

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Химерний вірус діареї великої рогатої худоби (BVDV), який здатний забезпечити можливість диференціації між великою рогатою худобою, що є вакцинованою вказаним химерним вірусом, та великою рогатою худобою, що інфікована вірусом діареї великої рогатої худоби дикого типу, який не експресує свій гомологічний E^{ns} білок, де також вказаний химерний вірус експресує гетерологічний E^{ns} білок, який походить від пестивірусу вилорогу (P- E^{ns}).
2. Штам химерного вірусу діареї великої рогатої худоби CM5960/P- E^{ns} для застосування у диференціації між великою рогатою худобою, що є вакцинованою вказаним химерним вірусом, та великою рогатою худобою, що інфікована вірусом діареї великої рогатої худоби дикого типу.
3. Штам химерного вірусу діареї великої рогатої худоби CM53637/P- E^{ns} для застосування у диференціації між великою рогатою худобою, що є вакцинованою вказаним химерним вірусом, та великою рогатою худобою, що інфікована вірусом діареї великої рогатої худоби дикого типу.
4. Штам химерного вірусу діареї великої рогатої худоби BVDV-NADL/P- E^{ns} для застосування у диференціації між великою рогатою худобою, що є вакцинованою вказаним химерним вірусом, та великою рогатою худобою, що інфікована вірусом діареї великої рогатої худоби дикого типу.
5. Клітина-хазяїн, що містить химерний вірус за п. 1, для реплікації та/або зберігання вказаного вірусу.
6. Полінуклеотидна молекула, що кодує химерний вірус за п. 1.
7. Імуногенна композиція, що містить химерний вірус за п. 1 та ветеринарно прийнятний носій.
8. Імуногенна композиція, що містить полінуклеотидну молекулу за п. 6 та ветеринарно прийнятний носій.
9. Вакцина, що містить химерний вірус за п. 1 та ветеринарно прийнятний носій, для диференціації між великою рогатою худобою, що є вакцинованою вказаним химерним вірусом, та великою рогатою худобою, що інфікована вірусом діареї великої рогатої худоби дикого типу.
10. Набір, що містить вакцину за п. 9 принаймні в одному контейнері та комплект роздрукованих інструкцій, для диференціації між великою рогатою худобою, що є вакцинованою вказаним химерним вірусом, та великою рогатою худобою, що інфікована вірусом діареї великої рогатої худоби дикого типу.
11. Вакцина за п. 9 для застосування у лікуванні або запобіганні поширення інфекції, викликаной вірусом діареї великої рогатої худоби.
12. Химерний вірус за п. 1, де додатково
 - (a) вказаний химерний вірус має принаймні один епітоп E^{ns} , який є відсутнім у вірусі діареї великої рогатої худоби дикого типу, або
 - (b) у вказаному химерному вірусі є відсутнім принаймні один епітоп E^{ns} , що є присутнім у вірусі діареї великої рогатої худоби дикого типу.
13. Пестивірусна DIVA-вакцина для диференціації інфікованих тварин від вакцинованих, яка містить химерний вірус за п. 12.
14. Химерний вірус за п. 12 або пестивірусна DIVA-вакцина за п. 13 для застосування у вакцинації тварини.
15. Спосіб диференціації між твариною, вакцинованою вакциною за п. 9, та твариною, інфікованою вірусом діареї великої рогатої худоби дикого типу, де тварина, вакцинована вказаною вакциною, виробляє антитіла до принаймні одного епітопу гетерологічного E^{ns} білка, що походить від пестивірусу вилорога, який включає етапи:
 - a) отримання зразків сироватки від тварин;
 - b) проведення аналізу вказаних зразків на присутність або відсутність антитіл;
 - c) ідентифікації тварини, що має вказані антитіла, як вакцинованої вказаною вакциною; та
 - d) ідентифікації тварини, що не має вказаних антитіл, як інфікованої BVDV (вірусом діареї великої рогатої худоби) дикого типу.
16. Спосіб диференціації між твариною, інфікованою вірусом діареї великої рогатої худоби дикого типу, та твариною, вакцинованою вакциною за п. 9, де тварина, інфікована вірусом діареї великої рогатої худоби дикого типу, виробляє антитіла до принаймні одного епітопу E^{ns} , який є присутнім у вірусі діареї великої рогатої худоби дикого типу, але який є відсутнім у химерному пестивірусі вказаної вакцини, який включає етапи:
 - a) отримання зразків сироватки від тварин;
 - b) проведення аналізу вказаних зразків на присутність або відсутність антитіл;

- c) ідентифікації тварини, що має вказані антитіла, як інфікованої BVDV дикого типу; та
- d) ідентифікації тварини, що не має вказаних антитіл, як вакцинованої вказаною вакциною.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601