



УКРАЇНА

(19) UA (11) 39975 (13) C2
(51) 7 A61K39/155, A61K39/12МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ВАКЦИНА ПРОТИ РЕСПІРАТОРНО-РЕПРОДУКТИВНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ

1

2

(21) 96103815
(22) 22.02.1995
(24) 16.07.2001
(86) РСТ/ЕР95/00642, 22.02.1995
(31) Р 44 07 489.1
(32) 07.03.1994
(33) DE
(46) 16.07.2001, Бюл. № 6, 2001 р.
(72) Хайнен Ернст, DE, Шмеер Норберт, DE,
Хербст Вернер, DE
(73) БАЙЕР АКЦІЄНГЕЗЕЛЬШАФТ, DE

(56) 1. WO 9307898 A1, 29.04.1993
2. EP 0595436 A2, 04.05.1994.
(57) Вакцина против респираторно-репродуктивно-го синдрома свиней, содержащая активное вещество и целевые добавки, отличающаяся тем, что в качестве активного вещества она содержит парариппозные вирусы 2 типа, в частности, штамма SER, в живой, мертвой, ослабленной или полученной путем рекомбинантной технологии форме, целиком или в виде частей или фрагментов, в эффективном количестве.

Настоящее изобретение относится к действующему вирусному фактору, способу культивирования и размножения этого действующего фактора, а также использованию этого действующего фактора, индивидуально или в сочетании с другими бактериальными или вирусными возбудителями в качестве компонента вакцины для защиты свиней от заболеваний респираторного и репродуктивного трактов.

С конца восьмидесятого вплоть до начала девяностого года в Северной Америке, соответственно, в Европе появилось новое, эпидемически распространяющееся и связанное с высокими экономическими потерями заболевание свиней. Между тем оно получило официальное название "свиной репродуктивный и респираторный синдром" (СРРС).

Основными клиническими симптомами этого эпидемического заболевания являются ухудшения плодовитости у свиноматок и заболевания дыхательных путей у поросят и откормочных свиней.

Наряду с нерегулярно появляющимися неспецифическими симптомами, как отсутствие аппетита, апатия и повышенная температура тела, у свиноматок заболевание характеризуется поздними выкидышами, рождением мертвых, мумифицированных и нежизнеспособных поросят. Вследствие эпидемии часто появляются симптомы в виде комплекса мастита, метрита и агалактии (ММА-комплекс) и глухоты.

Если в эндемической области в начале эпидемии заболевание поражает в основном поросят-сосунков и поросят-отъемышей, то при дальнейшем ее распространении в возрастающей ме-

ре заболевают откормочные свиньи. При этом, наряду в основном с имеющими место заболеваниями респираторного тракта, дополнительно могут наблюдаться в качестве сопутствующих также другие классические заболевания свиней. Эпидемия приводит к значительным экономическим потерям, которые наряду с прямыми потерями животных, выражаются в снижении производственных показателей (результаты опороса и отлучения от матки, ход беременности, прирост в живом весе).

В качестве основного действующего инфекционного фактора считают новый, размножающийся в макрофагах легочных альвеол РНК-вирус. С другой стороны, дальнейшие эпидемиологические исследования указывают на то, что респираторные и репродуктивные заболевания вызываются или усиливаются за счет вторичных, соответственно, множественных инфекций с помощью других вирусов, соответственно, вирусов и бактерий. Поэтому желательно защищать свиней не только от основного возбудителя СРРС, но и также от возбудителей, которые совместно с СРРС ответственны за репродуктивные и респираторные заболевания.

Предметом настоящего изобретения являются:

1. Вакцина против заболеваний респираторного и репродуктивного трактов свиней, в особенности в связи с названным СРРС комплексом заболеваний, отличающаяся тем, что в качестве антигенного материала она содержит парариппозные вирусы, а также их варианты и мутанты в живой, ослабленной или полученной путем рекомбинантной технологии форме, целиком или в

(13) C2
(11) 39975
(19) UA

виде частей или фрагментов;

2. Антигенный материал на основе парагриппозных вирусов, вызывающих заболевания респираторного и репродуктивного трактов свиней;

3. Способ получения антигенного материала на основе парагриппозных вирусов, вызывающих заболевания респираторного и репродуктивного трактов свиней, отличающийся тем, что парагриппозные вирусы размножают и антигенный материал обычным образом изолируют из таким образом полученных вирусных суспензий;

4. Применение антигенного материала на основе парагриппозных вирусов, вызывающих заболевания респираторного и репродуктивного трактов свиней, для диагноза и/или предохранения от этих заболеваний;

5. Применение антигенного материала на основе парагриппозных вирусов, вызывающих заболевания респираторного и репродуктивного трактов свиней, для получения диагностических средств с целью установления этих заболеваний и для приготовления вакцин для предохранения от этих заболеваний.

В качестве антигенного материала следует указать:

1. Полные, живые вирусные частицы, получаемые путем размножения вируса в культурах клеток или эмбрионированных куриных яйцах;

2. Полные, живые, ослабленные вирусные частицы, получаемые путем длительных пассажей вируса в первичных культурах клеток, перманентных линиях клеток, эмбрионированных птичьих яйцах или подопытных животных с последующим размножением в культурах клеток или эмбрионированных куриных яйцах;

3. Полные, умерщвленные вирусные частицы, получаемые обычными способами, как химическая или физическая инактивация;

4. Части (субъединицы) вирусных частиц, получаемые из вируса, который размножается в культурах клеток или эмбрионированных куриных яйцах;

5. Части (субъединицы) вирусных частиц, которые экспрессируются на основании рекомбинантных генных технологий систем клеток и которые в случае необходимости можно отделять от них или изолировать из них;

6. Вирусные антигены, которые экспрессируются через векторные системы, причем с помощью рекомбинантных генных технологий геном вируса или его части вводят в геномные векторы, как вирусы вакцин, вирусы герпеса, аденовирусы или другие пригодные векторные системы.

Предпочтительно применяют парагриппозные вирусы типа 2 (ПГВ-2).

Особенно предпочтительны ПГВ-2, которые изолируют из респираторного или репродуктивного тракта свиней, у которых обнаруживают подобную СРРС симптоматику. Особенно пригоден штамм ПГВ-2, называемый SER, который депонирован 12.06.1993 г. в Национальной коллекции культур и микроорганизмов (Институт Пастера, Париж, Франция) под номером 1-1331 согласно Будапештскому Соглашению.

В предлагаемой согласно изобретению вакцине антигенный материал парагриппозных виру-

сов может находиться в смеси с антигенным материалом из других вирусов или бактерий. В качестве таковых следует назвать: хламиды, в особенности *Chlamydia psittaci* и *Chlamydia pecorum* в концентрациях 10^5 - 10^{10} ЕВЕ/доза, *Erysipelothrix rhusiopathiae* в концентрациях 10^7 - 10^{12} КВЕ/доза, СРРС-вирусы в концентрациях 10^4 - 10^9 КИД₅₀/доза, свиной парвовирус в концентрациях 10^4 - 10^9 КИД₅₀/доза.

Особенно предпочтительна смесь из ПГВ-2 и хламид, в особенности *Chlamydia psittaci* или *Chlamydia pecorum*.

В нижеследующем тексте описания используют следующие понятия:

— котрансфекция: одновременный перенос двух различных последовательностей ДНК в клетки, в которых могут размножаться вирусы, с целью индуцировать рекомбинации вируса, которые содержат последовательности чужеродной ДНК. Различными последовательностями ДНК являются (1) чужеродная ДНК, которая может быть вставлена в шаттл-векторы, и (2) очищенный геном векторного вируса;

— геномный вектор: живые возбудители, в особенности вирусы, которые пригодны для вставки чужеродной ДНК и инфицируют клетки или организмы с помощью вставленной в их геном чужеродной ДНК или экспрессируют в них чужеродную ДНК;

— иммуногены: пептиды или протеины, которые в более высшем организме вызывают иммунологическую реакцию и могут экспрессироваться в векторах за счет последовательностей чужеродной ДНК;

— клонирование: введение в векторы последовательностей чужеродной ДНК;

— плаزمид: экстрахромосомальные, кольцеобразные последовательности ДНК, которые реплицируются в клетках низших или более высших организмов;

— шаттл-вектор: бактериофаги или плазмиды, в особенности бактериальные плазмиды, которые содержат вставленную чужеродную ДНК, фланкированную последовательностью ДНК векторного вируса;

— трансфекция: перенос последовательностей ДНК в клетки низших или более высших организмов с целью индуцирования рекомбинации клеточного генома с введенными последовательностями ДНК;

— векторы: плазмиды, бактериофаги или вирусы, которые в своей генетической информации содержат последовательности чужеродной ДНК.

Размножение вирусов для получения полных живых вирусных частиц осуществляют обычным образом, с одной стороны, в культурах тканей клеток животных в качестве первичных клеток или перманентных линий клеток, например, в клетках свиней, обезьян или крупного рогатого скота, предпочтительно в клетках почек свиней, как, например, клонированные, перманентные клетки почек свиней PK15 (ATCC CCL33 или их потомки) или первичные клетки почек свиней ЕРК, или в клетках почек обезьян, как перманентные клетки почек обезьян BGM (Flow 03-240 или их потомки) или Vero (ATCC CCL81 или их потом-

ки), или в клетках почек крупного рогатого скота, как перманентные клетки почек крупного рогатого скота MDBK (ATCC CCL22 или их потомки), и, с другой стороны, в эмбрионированных куриных яйцах (например, Вало-инкубационные яйца, фирма Лохман).

Размножение в культурах клеток осуществляют само по себе известным образом в стационарных роллерных культурах или культурах на носителе в форме сплошных соединений клеток (монослои) или в суспендированных культурах. В качестве сред для размножения клеток используют любые сами по себе известные среды для культур клеток, например, описанные в каталоге продуктов фирмы Гибко БРЛ Гмбх, Диезельштрассе 5, 76344, Эггенштейн, как в особенности минимальная необходимая среда (MEM), которая в качестве основных составных частей содержит аминокислоты, витамины, соли и углеводы, дополняемая буферными веществами, как, например, гидрокарбонат натрия или гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфо кислота (Гепес), и в случае необходимости сыворотками (крови) животных, как, например, сыворотки крупного рогатого скота, лошадей, соответственно, их плодные сыворотки. Особенно предпочтительно используют минимальную необходимую среду Игла с содержанием гидрокарбоната натрия 0,1-5 г/л, предпочтительно 0,5-3 г/л, а также плодной телячьей сыворотки в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн.%.

Служащие для размножения вирусов клетки и расы клеток размножаются обычным образом почти вплоть до слияния или вплоть до оптимальной плотности клеток. Перед их инфицированием с помощью вирусов предпочтительно удаляют среду для размножения клеток и клетки предпочтительно промывают с помощью среды для размножения вируса. В качестве среды для размножения вируса используют любые, сами по себе известные среды для культур клеток, как в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда. Затем проводят инфицирование с помощью вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус разбавлен в среде для его размножения так, что происходит инфицирование с МИ (= множественность инфекции, соответствующая соотношению числа инфекционных вирусных частиц к числу имеющихся клеток), соответствующей 0,01-50, предпочтительно 0,1-10.

Размножение вирусов осуществляют с добавкой или без нее сывороток животных. В том случае, когда используют сыворотку, ее добавляют к среде для размножения в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн.%.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при температурах от комнатной до 40°C, предпочтительно при 32-39°C, особенно предпочтительно при 37°C, в течение нескольких дней, предпочтительно вплоть до полного разрушения инфицированных клеток.

Содержащую вирус среду инфицированных клеток обрабатывают далее, например, путем удаления клеток и остатков клеток посредством фильтрации при использовании фильтров с размерами пор, например, 0,1-0,45 мкм и/или с по-

мощью центрифугирования с ускорением вплоть до 10000 g.

Размножение в эмбрионированных куриных яйцах осуществляют само по себе известным образом в аллантоидной полости инкубационных куриных яиц, которые предварительно инкубируют в течение 9-12 дней, предпочтительно в течение 10 дней, при температуре 37-39°C, предпочтительно 38,5°C, и при относительной влажности воздуха 30-90 %, предпочтительно 50-60 %, в стандартном термостате, предпочтительно в инкубаторе.

Служащие для размножения вирусов инкубационные яйца за 1-3 часа, предпочтительно за 2 часа до инфицирования помещают в термостат в вертикальном положении на острый конец яйца и затем после подготовки места инъекции инфицируют с помощью 10-200 мкл, предпочтительно 75-25 мкл вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус находится в среде для его размножения в концентрации 10^1 - 10^7 КИД₅₀/мл (инфекционная для 50 % культуры доза на мл суспензии = степень разбавления, при которой инфицируются еще 50 % используемых культур клеток), предпочтительно 10^4 - 10^5 КИД₅₀/мл. В качестве среды для размножения вируса используют любые, сами по себе известные среды для культур клеток, как, в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при вышеуказанных условиях инкубации в течение нескольких дней, предпочтительно в течение 2-5 дней, особенно предпочтительно в течение 3 дней.

Содержащую вирус аллантоидную жидкость получают путем отсасывания после вскрытия известковой скорлупы, а также подскорлуповой оболочки и хориоаллантоидной мембраны яйца, и можно проводить ее обработку дальше, например, посредством фильтрации при использовании фильтров с размерами пор, например, 0,1-0,45 мкм и/или с помощью центрифугирования при ускорении вплоть до 10000g.

Ослабленный, живой вирус получают обычным образом путем длительных пассажей и/или переменных пассажей, с одной стороны, в культурах тканей клеток животных в качестве первичных клеток или перманентных линий клеток, например, в клетках свиней, обезьян или крупного рогатого скота, предпочтительно в клетках почек свиней, как, например, клонированные, перманентные клетки почек свиней PK15 (ATCC CCL33 или их потомки) или первичные клетки почек свиней ЕРК, или в клетках почек обезьян, как перманентные клетки почек обезьян BGM (Flow 03-240 или их потомки) или Vero (ATCC CCL81 или их потомки), или в клетках почек крупного рогатого скота, как перманентные клетки почек крупного рогатого скота MDBK (ATCC CCL22 или их потомки), или в клетках почек собак, как перманентные клетки почек собак MDCK (ATCC CCL34 или их потомки), и, с другой стороны, в эмбрионированных яйцах кур, голубей или уток, предпочтительно в эмбрионированных куриных яйцах (например, Вало-инкубационные яйца, фирма Лохман), или в подопытных животных, предпочтительно в

маленьких лабораторных животных, например, как морские свинки, крысы или мыши, в которых вирус размножается, не вызывая серьезных симптомов заболевания.

Пассирование в культурах клеток осуществляют само по себе известным образом в стационарных культурах в форме сплошных соединений клеток (монослои). В качестве сред для размножения клеток используют любые сами по себе известные среды для культур клеток, например, описанные в каталоге продуктов фирмы Гибко БРЛ Гмбх, Дизельштрассе 5, 76344, Эггенштейн, как в особенности минимальная необходимая среда (MEM), которая в качестве основных составных частей содержит аминокислоты, витамины, соли и углеводы, дополняемая буферными веществами, как, например, гидрокарбонат натрия или гидроксипиперазин-N-2--этансульфокислота (Гепес), и в случае необходимости сыворотками (крови) животных, как, например, сыворотки крупного рогатого скота, лошадей, соответственно, их плодные сыворотки. Особенно предпочтительно используют минимальную необходимую среду Игла с содержанием гидрокарбоната натрия 0,1-5 г/л, предпочтительно 0,5-3 г/л, а также плодной телячьей сыворотки в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн.%.

Служащие для пассирования вирусов клетки и расы клеток размножаются обычным образом почти вплоть до слияния или вплоть до оптимальной плотности клеток. Перед их инфицированием с помощью вирусов предпочтительно удаляют среду для размножения клеток и клетки предпочтительно промывают с помощью среды для размножения вируса. В качестве среды для размножения вируса используют любые, сами по себе известные среды для культур клеток, как в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда. Затем проводят инфицирование с помощью вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус разбавлен в среде для его размножения так, что происходит инфицирование с МИ (= множественность инфекции, соответствующая соотношению числа инфекционных вирусных частиц к числу имеющихся клеток), соответствующей 0,01-50, предпочтительно 0,1-10.

Размножение вирусов осуществляют с добавкой или без нее сывороток животных. В том случае, когда используют сыворотку, ее добавляют к среде для размножения в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн.%.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при температурах от комнатной до 40°C, предпочтительно при 32-39°C, особенно предпочтительно при 37°C, в течение нескольких дней, предпочтительно вплоть до полного разрушения инфицированных клеток.

Содержащую вирус среду инфицированных клеток применяют для инфицирования свежей культуры клеток (последующее пассирование).

Пассирование в эмбрионированных куриных яйцах осуществляют само по себе известным образом в аллантоидной полости инкубационных куриных яиц, которые предварительно инкубируют в течение 9-12 дней, предпочтительно в течение

10 дней, при температуре 37-39°C, предпочтительно 38,5°C, и при относительной влажности воздуха 30-90 %, предпочтительно 50-60 %, в стандартном термостате, предпочтительно в инкубаторе.

Служащие для пассирования вирусов инкубационные яйца за 1-3 часа, предпочтительно за 2 часа до инфицирования помещают в термостат в вертикальном положении на острый конец яйца и затем после подготовки места инъекции инфицируют с помощью 10-200 мкл, предпочтительно 75-125 мкл вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус находится в среде для его размножения в концентрации 10^1 - 10^7 КИД₅₀/мл (инфекционная для 50 % культуры доза на мл суспензии = степень разбавления, при которой инфицируются еще 50 % используемых культур клеток), предпочтительно 10^4 - 10^5 КИД₅₀/мл. В качестве среды для размножения вируса используют любые сами по себе известные среды для культур клеток, как, в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при вышеуказанных условиях инкубации в течение нескольких дней, предпочтительно в течение 2-5 дней, особенно предпочтительно в течение 3 дней.

Содержащую вирус аллантоидную жидкость получают путем отсасывания после вскрытия известковой скорлупы, а также подскорлуповой оболочки и хориоаллантоидной мембраны яйца. Ее применяют для инфицирования свежих, предпочтительно инкубированных, эмбрионированных яиц (последующий пассаж).

Пассирование в подопытных животных осуществляют само по себе известным образом путем парентерального введения вирусной суспензии и выделения вируса снова из органов и тканей подопытных животных.

Для пассирования в подопытных животных используют предпочтительно ювенильных, маленьких лабораторных животных, которых специально выращивают в беспатогенных условиях, например, как морские свинки (Hsd/Win: DH, фирма Харлан-Винкельман Гмбх, Борхен), крысы (Hsd/Win: WU, фирма Харлан-Винкельман Гмбх, Борхен) или мыши (Hsd /Win: NMR 1, фирма Харлан-Винкельман Гмбх, Борхен, Бальб/С/ЛСО, Иффа Кредо, Бельгия). Подопытных животных инфицируют с помощью 0,1-2,0 мл вирусной суспензии парентерально, например, путем чрескожного, внутримышечного, внутривенного, интраперитонеального, внутривенного или подкожного введения. В вирусной суспензии вирус в среде для размножения вируса находится в таком количестве, что подопытные животные, смотря по обстоятельствам, получают дозу вируса 10^1 - 10^7 КИД₅₀, предпочтительно 10^2 - 10^5 КИД₅₀ (инфекционная доза для 50 % культур на мл суспензии = степень разбавления, при которой инфицируются еще 50 % используемых культур клеток). В качестве среды для размножения вируса используют любые сами по себе известные среды, как в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда.

Размножение вируса осуществляют в течение

ние нескольких дней, предпочтительно в течение 1-12 дней.

Вирус снова выделяют известным образом из тканей, предпочтительно из внутренних органов подопытных животных. Для этого у подопытных животных извлекают внутренние органы, например, легкие, печень или селезенку. Из органов или частей органов путем механического размельчения, например, с помощью ножниц и ступки, готовят высокодисперсную суспензию в среде для размножения вируса, которую обрабатывают далее, например, путем удаления клеток и остатков клеток посредством фильтрации при использовании фильтров с размерами пор, например, 0,1-0,45 мкм и/или с помощью центрифугирования с ускорением вплоть до 10000 g. В качестве среды для размножения вируса используют любые, сами по себе известные среды для культур клеток, как в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда.

Полученную, содержащую вирус среду применяют для инфицирования новых подопытных животных (последующие пассажи).

Процесс последующего пассажа повторяют многократно, предпочтительно 10-20 раз в одинаковой системе размножения (гомологичные пассажи) или в различных системах размножения (гетерологичные пассажи).

Повторный контроль вируса на ослабление осуществляют путем экспериментального инфицирования полностью восприимчивых подопытных животных, предпочтительно свиней, с помощью вирусной суспензии, которую получают из последнего пассажа ряда последующих пассажей.

Если еще появляются типичные симптомы заболевания, например, выкидыши или рождения мертвых поросят у супоросных свиноматок или респираторные заболевания, то исходя из вирусов последнего последующего пассирования осуществляют дельнейшие гомологичные или гетерологичные длительные пассирования.

Если более не появляются никакие типичные симптомы заболевания, то вирусы последнего последующего пассирования размножают как описано выше и фильтраты или надосадочные жидкости после центрифугирования содержащих вирус надосадочных жидкостей культур или аллантоидных жидкостей применяют для приготовления вакцин.

Размножение вирусов для получения умерщвленных вирусных частиц осуществляют обычным образом, с одной стороны, в культурах тканей или клеток животных в качестве первичных клеток или перманентных линий клеток, например, в клетках свиней, обезьян или крупного рогатого скота, предпочтительно в клетках почек свиней, как, например, клонированные, перманентные клетки почек свиней PK15 (ATCC CCL33 или их потомки) или первичные клетки почек свиней ЕРК, или в клетках почек обезьян BGM (Flow 03-240 или их потомки) или Vero (ATCC CCL81 или их потомки), или в клетках почек крупного рогатого скота, как перманентные клетки почек крупного рогатого скота MDBK (ATCC CCL22 или их потомки), и, с

другой стороны, в эмбрионированных куриных яйцах (например, Вало-инкубационные яйца, фирма Лохман).

Размножение в культурах клеток осуществляют само по себе известным образом в стационарных роллерных культурах или культурах на носителе в форме сплошных соединений клеток (монослои) или в суспендированных культурах. В качестве сред для размножения клеток используют любые сами по себе известные среды для культур клеток, например, описанные в каталоге продуктов фирмы Гибко БРЛ Гмбх, Дизельультрассе 5, 76344, Эггенштейн, как в особенности минимальная необходимая среда (MEM), которая в качестве основных составных частей содержит аминокислоты, витамины, соли и углеводы, дополняемая буферными веществами, как, например, гидрокарбонат натрия или гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфокислота (Гепес), и в случае необходимости сыворотками (крови) животных, как, например, сыворотки крупного рогатого скота, лошадей, соответственно, их плодные сыворотки. Особенно предпочтительно используют минимальную необходимую среду Игла с содержанием гидрокарбоната натрия 0,1-5 г/л, предпочтительно 0,5-3 г/л, а также плодной телячьей сыворотки в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн.%.

Служащие для размножения вирусов клетки и расы клеток размножаются обычным образом почти вплоть до слияния или вплоть до оптимальной плотности клеток. Перед их инфицированием с помощью вирусов предпочтительно удаляют среду для размножения клеток и клетки предпочтительно промывают с помощью среды для размножения вируса. В качестве среды для размножения вируса используют любые, сами по себе известные среды для культур клеток, как в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда. Затем проводят инфицирование с помощью вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус разбавлен в среде для его размножения так, что происходит инфицирование с МИ (= множественность инфекции, соответствующая соотношению числа инфекционных вирусных частиц к числу имеющихся клеток), соответствующей 0,01-50, предпочтительно 0,1-10.

Размножение вирусов осуществляют с добавкой или без нее сывороток животных. В том случае, когда используют сыворотку, ее добавляют к среде для размножения в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн.%.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при температурах от комнатной до 40°C, предпочтительно при 32-39°C, особенно предпочтительно при 37°C, в течение нескольких дней, предпочтительно вплоть до полного разрушения инфицированных клеток.

Содержащую вирус среду инфицированных клеток обрабатывают далее, например, путем удаления клеток и остатков клеток посредством фильтрации при использовании фильтров с размерами пор, например, 0,1-0,45 мкм и/или с помощью центрифугирования с ускорением вплоть до 10000 g.

Размножение в эмбрионированных куриных

яйцах осуществляют само по себе известным образом в аллантаидной полости инкубационных куриных яиц, которые предварительно инкубируют в течение 9-12 дней, предпочтительно в течение 10 дней, при температуре 37-39°C, предпочтительно 38,5°C, и при относительной влажности воздуха 30-90 %, предпочтительно 50-60 %, в стандартном термостате, предпочтительно в инкубаторе.

Служащие для размножения вирусов инкубационные яйца за 1-3 часа, предпочтительно за 2 часа до инфицирования помещают в термостат в вертикальном положении на острый конец яйца и затем после подготовки места инъекции инфицируют с помощью 10-200 мкл, предпочтительно 75-125 мкл вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус находится в среде для его размножения в концентрации 10^1 - 10^7 КИД₅₀/мл (инфекционная доза 50 % культуры доза на мл суспензии = степень разбавления, при которой инфицируются еще 50 % используемых культур клеток), предпочтительно 10^4 - 10^5 КИД₅₀/мл. В качестве среды для размножения вируса используют любые сами по себе известные среды для культур клеток, как, в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при вышеуказанных условиях инкубации в течение нескольких дней, предпочтительно в течение 2-5 дней, особенно предпочтительно в течение 3 дней.

Содержащую вирус аллантаидную жидкость получают путем отсасывания после вскрытия известковой скорлупы, а также подскорлуповой оболочки и хориоаллантаидной мембраны яйца, и можно проводить ее обработку дальше, например, посредством фильтрации при использовании фильтров с размерами пор, например, 0,1-0,45 мкм и/или с помощью центрифугирования при ускорении вплоть до 10000 g.

Инактивацию вируса осуществляют обычным образом с помощью физических способов, например, путем воздействия нагрева, ультрафиолетового или γ -облучения, или предпочтительно с помощью химических способов, например, путем воздействия этанола, формальдегида, β -пропиолактона и предпочтительно с помощью этиленаминов.

Химическую инактивацию осуществляют само по себе известным образом в пригодных реакционных сосудах, которые оснащены устройством для поддержания постоянной реакционной температуры, а также для постоянного движения реакционной смеси (например, ферментер). В качестве инактивирующего средства используют предпочтительно этиленамины, особенно предпочтительно 2-бром-этиламин-гидробромид (2-БЭА) в концентрации 1-10 ммоль/л, предпочтительно 2,5-7,5 ммоль/л.

Перед добавкой раствора 2-бром-этиламин-гидрохлорида в вирусной суспензии с концентрацией $10^{4,0}$ - $10^{9,0}$ КИД₅₀/мл, предпочтительно $10^{5,0}$ - $10^{8,0}$ КИД₅₀/мл, которую получают из одного или нескольких процессов размножения вируса, устанавливают значение pH, равное 8,1-8,7, предпочтительно 8,3-8,5.

Инактивацию осуществляют при 4-40°C, предпочтительно при 23-37°C, особенно предпочтительно при 36-37°C, в течение 6-48 часов, предпочтительно 16-20 часов.

После окончания инактивации избыточный 2-бром-этиламин-гидрохлорид нейтрализуют путем добавки гидролизующих агентов. Для этой цели пригоден в особенности тиосульфат натрия, который добавляют в конечной концентрации 40-80 ммоль/л, предпочтительно 50 ммоль/л. Нейтрализацию проводят при 4-40°C, предпочтительно при 2-8°C, в течение 2-16 часов, предпочтительно 4-8 часов.

Размножение вирусов для получения субъединиц осуществляют обычным образом, с одной стороны, в культурах тканей клеток животных в качестве первичных клеток или перманентных линий клеток, например, в клетках свиней, обезьян или крупного рогатого скота, предпочтительно в клетках почек свиней, как, например, клонированные, перманентные клетки почек свиней PK15 (ATCC CCL33 или их потомки) или первичные клетки почек свиней EPK, или в клетках почек обезьян, как перманентные клетки почек обезьян BGM (Flow 03-240 или их потомки) или Vero (ATCC CCL81 или их потомки), или в клетках почек крупного рогатого скота, как перманентные клетки почек крупного рогатого скота MDBK (ATCC CCL22 или их потомки), и, с другой стороны, в эмбрионированных куриных яйцах (например, Вало-инкубационные яйца, фирма Лохман).

Размножение в культурах клеток осуществляют само по себе известным образом в стационарных роллерных культурах или культурах на носителе в форме сплошных соединений клеток (монослой) или в суспендированных культурах. В качестве сред для размножения клеток используют любые сами по себе известные среды для культур клеток, например, описанные в каталоге продуктов фирмы Гибко БРЛ ГмбХ, Дрездельштрассе 5, 76344, Эггенштейн, как в особенности минимальная необходимая среда (MEM), которая в качестве основных составных частей содержит аминокислоты, витамины, соли и углеводы, дополняемая буферными веществами, как, например, гидрокарбонат натрия или гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфонокислота (Гепес), и в случае необходимости сыворотками (крови) животных, как, например, сыворотки крупного рогатого скота, лошадей, соответственно, их плодные сыворотки. Особенно предпочтительно используют минимальную необходимую среду Игла с содержанием гидрокарбоната натрия 0,1-5 г/л, предпочтительно 0,5-3 г/л, а также плодной телячьей сыворотки в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн. %.

Служащие для размножения вирусов клетки и расы клеток размножаются обычным образом почти вплоть до слияния или вплоть до оптимальной плотности клеток. Перед их инфицированием с помощью вирусов предпочтительно удаляют среду для размножения клеток и клетки предпочтительно промывают с помощью среды для размножения вируса. В качестве среды для размножения вируса используют любые, сами по себе известные среды для культур клеток, как в

особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда. Затем проводят инфицирование с помощью вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус разбавлен в среде для его размножения так, что происходит инфицирование с МИ (= множественность инфекции, соответствующая соотношению числа инфекционных вирусных частиц к числу имеющихся клеток), соответствующей 0,01-50, предпочтительно 0,1-10.

Размножение вирусов осуществляют с добавкой или без нее сывороток животных. В том случае, когда используют сыворотку, ее добавляют к среде для размножения в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн.%.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при температурах от комнатной до 40°C, предпочтительно при 32-39°C, особенно предпочтительно при 37°C, в течение нескольких дней, предпочтительно вплоть до полного разрушения инфицированных клеток.

Содержащую вирус среду инфицированных клеток обрабатывают далее, например, путем удаления клеток и остатков клеток посредством фильтрации при использовании фильтров с размерами пор, например, 0,1-0,45 мкм и/или с помощью центрифугирования с ускорением вплоть до 10000 g.

Размножение в эмбрионированных куриных яйцах осуществляют само по себе известным образом в аллантоидной полости инкубационных куриных яиц, которые предварительно инкубируют в течение 9-12 дней, предпочтительно в течение 10 дней, при температуре 37-39°C, предпочтительно 38,5°C, и при относительной влажности воздуха 30-90 %, предпочтительно 50-60 %, в стандартном термостате, предпочтительно в инкубаторе.

Служащие для размножения вирусов инкубационные яйца за 1-3 часа, предпочтительно за 2 часа до инфицирования помещают в термостат в вертикальном положении на острый конец яйца и затем после подготовки места инъекции инфицируют с помощью 10-200 мкл, предпочтительно 75-125 мкл вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус находится в среде для его размножения в концентрации 10^1 - 10^7 КИД₅₀/мл (инфекционная доза 50 % культуры доза на мл суспензии = степень разбавления, при которой инфицируются еще 50 % используемых культур клеток), предпочтительно 10^4 - 10^5 КИД₅₀/мл. В качестве среды для размножения вируса используют любые сами по себе известные среды для культур клеток, как, в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при вышеуказанных условиях инкубации в течение нескольких дней, предпочтительно в течение 2-5 дней, особенно предпочтительно в течение 3 дней.

Содержащую вирус аллантоидную жидкость получают путем отсасывания после вскрытия известковой скорлупы, а также подскорлуповой оболочки и хориоаллантоидной мембраны яйца, и можно проводить ее обработку дальше, например, посредством фильтрации при использовании фильтров с размерами пор, например, 0,1-

0,45 мкм и/или с помощью центрифугирования при ускорении вплоть до 10000 g.

Вирус выделяют путем изопикнического или зонального центрифугирования, например, с градиентами плотности сахарозы. Для этой цели содержащую вирус среду, соответственно, аллантоидную жидкость после удаления остатков клеток подвергают зональному центрифугированию с ускорением 100000 g вплоть до седиментации вирусных частиц. В более чистом виде вирусные частицы получают путем зонального центрифугирования в водном растворе с более высокой плотностью, чем содержащая вирус среда. В качестве водного раствора может служить, например, 30-60 % масс., предпочтительно 35-50 % масс. буферированный раствор сахарозы. Еще более высокой степени чистоты достигают путем центрифугирования с градиентом плотности. Для этой цели освобожденный от клеток и остатков клеток, сконцентрированный с помощью зонального центрифугирования вирус выделяют путем изопикнического или зонального центрифугирования с градиентом плотности, например, 30-50 % масс. сахарозы в буферированном водном растворе при ускорении центрифугирования, например, 100000-150000 g.

Таким образом, полученные вирусные концентраты обрабатывают детергентами.

Пригодными детергентами являются: анионоактивные поверхностно-активные агенты, как лаурилсульфат натрия, сульфаты простых эфиров спиртов жирного ряда, моноэтаноламинная соль сложного эфира ортофосфорной кислоты и простого моно-/ди-алкилполиглицолевого эфира, алкиларилсульфонат кальция, дезоксихолат натрия; катионоактивные поверхностно-активные агенты, как цетилтриметиламмонийхлорид; амфотерные поверхностно-активные агенты, как ди-натрий-N-лауриламинопиперидинат или лецитин; неионные поверхностно-активные агенты, например, полиоксиэтилированное касторовое масло, полиоксиэтилированный сорбитан-моноолеат, сорбитан-моностеарат, глицеринмоностеарат, полиоксиэтиленстеарат, алкилфенолполиглицоловый простой эфир.

Предпочтительно следует назвать следующие неионные детергенты: водорастворимые эмульгаторы с ГЛБ (значение гидрофильно-липофильного баланса) более 10, например, эмульгатор НП 40 (Байер АГ), алкиларилполиглицоловый простой эфир; Ренекс 678 (Атлас Кемикал Индастри), полиоксиэтиленалкилариловый простой эфир; Твин 20 (Атлас), полиоксиэтиленсорбитанмонопальмитат; Майри 53 (Атлас), полиоксиэтиленстеарат; Атлас Г 3707, полиоксиэтиленлауриловый простой эфир; Атлас Г 3920, полиоксиэтиленолеиловый простой эфир; Атлас Г 9046 Т, полиоксиэтиленманнитанмонолаурат; эмульгатор 1371 Б (Байер АГ), алкилполиглицоловый простой эфир; эмульгатор 1736 (Байер АГ), алкилполиглицоловый простой эфир (олеилполиглицоловый простой эфир); эмульгатор ОКС (Байер АГ), алкилполиглицоловый простой эфир (додecilполиглицоловый простой эфир); Нинокс БМ-2 (Стэпан Кемикал Ко.), этоксиэтилированный нонилфенол; Тритон X-100 (Ром и Хаас Ко.),

изооктилфенолполиэтоксизанол; Кремофор ЕЛ, Нонидет П 40 (Шелл).

Детергенты применяют в виде водных разбавленных растворов. Следует указать растворы с концентрацией 0,1-10 объемн.%, предпочтительно 0,5-5 объемн.%, особенно предпочтительно примерно 1 объемн.% детергента.

Раствор детергента добавляют к вирусному концентрату в объемном соотношении примерно от 1:1 до примерно 10:1. Предпочтительно соотношение раствора детергента к вирусному концентрату составляет примерно 3:1.

Обработку детергентом осуществляют при постоянном перемешивании смеси при температурах от 0°C до примерно 24°C, предпочтительно при 2-8°C. Обработка детергентом продолжается от 15 минут до 2 дней, предпочтительно в течение 6-18 часов. Для улучшения обработки детергентом смесь можно дополнительно подвергать ультразвуковой обработке.

Нерастворившиеся при этой обработке частицы удаляют, предпочтительно путем фильтрации или центрифугирования, например, при 150000 g. Таким образом полученный фильтрат, соответственно, надосадочную жидкость после центрифугирования можно хранить вплоть до ее дальнейшей переработки при низких температурах (от 0°C до -70°C).

Содержащиеся в лизате гликопротеины вирусных частиц выделяют путем обработки с помощью лектинов. Лектины представляют собой протеины или гликопротеины из растений, особенно их семян, микроорганизмов, позвоночных и беспозвоночных, которые специфически связывают сахара и их конъюгаты. Применяют пектины, которые распознают и связывают гликопротеины из парамиксовирусов. Предпочтительно применяют лектины, которые распознают маннозу и/или глюкозу, а также их конъюгаты. В частности, следует назвать лектины из *Canavalia ensiformis*, *Lens culinaris*, *Lathyrus odoratus*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Sambucus nigra*, *Glycine max*, *Ulex europaeus*, *Helix pomatia*, *Phytolacca americana*, *Lycopersicon esculentum*, *Datura stramonium*, *Bandeiraea simplicifolia*.

Лектины используют в водорастворимой и нерастворимой в воде форме. В нерастворимой в воде форме их предпочтительно иммобилизуют за счет связывания с инертной матрицей, как, например, декстраны, агарозы, целлюлозы, используемые в виде суспензий. В частности, следует назвать конканавалин-А-агарозу, конканавалин-А-сефарозу, лентил-лектин-сефарозу, агароза-лектин из пшеничных зерен, *Helix pomatia*-лектин-сефарозу.

Лектины используют в виде содержащего детергент и соль раствора, суспензии или геля. Для этой цели как лизат, так и также используемый лектиновый раствор, лектиновую суспензию или лектиновый гель предварительно смешивают с таким количеством хлорида натрия, а также известных, стабилизирующих лектин солей, чтобы концентрация хлорида натрия составляла 0,5-2, предпочтительно 0,7-1,2 моль/л. Установление концентрации лизатов осуществляют предпочтительно путем диализа. Необходимая концентра-

ция стабилизирующих лектин солей известна из уровня техники и специфична для используемых лектинов. Сверх того, лектиновый раствор, лектиновую суспензию или лектиновый гель смешивают с используемым для обработки лизатов детергентом в такой же концентрации, так что лизат и лектиновый раствор имеют одинаковые концентрации соли и детергента.

Применяют примерно 1-150 мг, предпочтительно 1-50 мг, особенно предпочтительно 5-20 мг, чистого лектина на мл раствора, суспензии или геля. К лизату добавляют столько этого раствора, суспензии или геля лектина, чтобы на мг общего количества протеина приходилось 0,01-50 мг, предпочтительно 0,1-20 мг, особенно предпочтительно 0,5-5 мг лектина. Обработку лектином осуществляют при температуре от 0°C до примерно 24°C, предпочтительно при 2-8°C, в течение времени примерно от 10 минут до 3 дней, предпочтительно в течение времени от 1 часа до 2 дней.

Реакцию лектинов с гликопротеинами также можно проводить с помощью колоночной хроматографии, причем лизат вводят в контакт с лектином, иммобилизованным на гелеобразной матрице в хроматографической колонке.

Комплекс гликопротеина с лектином обычным образом отделяют от общего количества раствора или суспензии. Это можно осуществлять путем центрифугирования, фильтрации или в случае хроматографии — путем промывок.

В полученных по этим способам суспензиях или гелях, которые содержат комплексы лектина с гликопротеином, путем фильтрации, центрифугирования, диализа или других процессов промывки можно изменять концентрацию детергента и/или соли в физиологически приемлемой области или вплоть до удаления.

Таким образом полученные суспензии или гели комплексов лектина с гликопротеином можно применять непосредственно в качестве антигенного материала. В зависимости от содержания связанного с лектином гликопротеина их можно далее концентрировать или разбавлять.

Суспензии или гели комплексов пектина с гликопротеином можно хранить при температурах ниже 8°C. Их также можно подвергать сушке вымораживанием.

Из полученных суспензий или гелей комплексов лектина с гликопротеином можно выделять гликопротеины для получения антигенного материала. Для этой цели суспензии или гели обрабатывают содержащим соль водным раствором сахара.

Род используемого сахара выбирают в зависимости от специфичности применяемых лектинов. Концентрация сахара составляет 0,1-1 моль/л, предпочтительно 0,1-0,5 моль/л, особенно предпочтительно 0,3-0,5 моль/л. Концентрация и состав соли соответствует таковым содержащих гликопротеин-лектин-комплекс суспензий или гелей.

Обработку раствором сахара осуществляют при температуре от 0°C до примерно 24°C, предпочтительно при 2-8°C. Обработка занимает время от примерно 15 минут до 4 дней, предпочтительно

льно от 1 часа до 2 дней, особенно предпочтительно 10-24 часа.

Элюированные при этом гликопротеины отделяют от лектинов путем центрифугирования, фильтрации или других обычных способов разделения (например, хроматографии). В полученных в результате препаратов концентрации детергента, соли и сахара можно изменять описанным уже выше образом.

Таким образом полученные выделенные гликопротеины можно применять в качестве антигенного материала. Содержание гликопротеина можно изменять путем концентрирования или разбавления.

Хранение препаратов осуществляют в виде их растворов при температурах ниже 0°C или в лиофилизированной форме.

Для получения субъединиц вирусных частиц рекомбинантным путем сначала получают вирусный геном.

Для получения вирусного генома сначала осуществляют размножение вирусов обычным образом, с одной стороны, в культурах тканей клеток животных в качестве первичных клеток или перманентных линий клеток, например, в клетках свиней, обезьян или крупного рогатого скота, предпочтительно в клетках почек свиней, как, например, клонированные, перманентные клетки почек свиней PK15 (ATCC CCL33 или их потомки) или первичные клетки почек свиней EPK, или в клетках почек обезьян, как перманентные клетки почек обезьян BGM (Flow 03-240 или их потомки) или Vero (ATCC CCL81 или их потомки), или в клетках почек крупного рогатого скота, как перманентные клетки почек крупного рогатого скота MDBK (ATCC CCL22 или их потомки), и, с другой стороны, в эмбрионированных куриных яйцах (например, Вало-инкубационные яйца, фирма Лохман).

Размножение в культурах клеток осуществляют само по себе известным образом в стационарных роллерных культурах или культурах на носителе в форме сплошных соединений клеток (монослои) или в суспендированных культурах. В качестве сред для размножения клеток используют любые сами по себе известные среды для культур клеток, например, описанные в каталоге продуктов фирмы Гибко БРЛ Гмбх, Диезельштрассе 5, 76344, Эггенштейн, как в особенности минимальная необходимая среда (MEM), которая в качестве основных составных частей содержит аминокислоты, витамины, соли и углеводы, дополняемая буферными веществами, как, например, гидрокарбонат натрия или гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфокислота (Гепес), и в случае необходимости сыворотками (крови) животных, как, например, сыворотки крупного рогатого скота, лошадей, соответственно, их плодные сыворотки. Особенно предпочтительно используют минимальную необходимую среду Игла с содержанием гидрокарбоната натрия 0,1-5 г/л, предпочтительно 0,5-3 г/л, а также плодной телячьей сыворотки в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн.%.

Служащие для размножения вирусов клетки и расы клеток размножаются обычным образом

почти вплоть до слияния или вплоть до оптимальной плотности клеток. Перед их инфицированием с помощью вирусов предпочтительно удаляют среду для размножения клеток и клетки предпочтительно промывают с помощью среды для размножения вируса. В качестве среды для размножения вируса используют любые, сами по себе известные среды для культур клеток, как в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда. Затем проводят инфицирование с помощью вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус разбавлен в среде для его размножения так, что происходит инфицирование с МИ (= множественность инфекции, соответствующая соотношению числа инфекционных вирусных частиц к числу имеющихся клеток), соответствующей 0,01-50, предпочтительно 0,1-10.

Размножение вирусов осуществляют с добавкой или без нее сывороток животных. В том случае, когда используют сыворотку, ее добавляют к среде для размножения в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн.%.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при температурах от комнатной до 40°C, предпочтительно при 32-39°C, особенно предпочтительно при 37°C, в течение нескольких дней, предпочтительно вплоть до полного разрушения инфицированных клеток.

Содержащую вирус среду инфицированных клеток обрабатывают далее, например, путем удаления клеток и остатков клеток посредством фильтрации при использовании фильтров с размерами пор, например, 0,1-0,45 мкм и/или с помощью центрифугирования с ускорением вплоть до 10000 g.

Размножение в эмбрионированных куриных яйцах осуществляют само по себе известным образом в аллантаидной полости инкубационных куриных яиц, которые предварительно инкубируют в течение 9-12 дней, предпочтительно в течение 10 дней, при температуре 37-39°C, предпочтительно 38,5°C, и при относительной влажности воздуха 30-90 %, предпочтительно 50-60 %, в стандартном термостате, предпочтительно в инкубаторе.

Служащие для размножения вирусов инкубационные яйца за 1-3 часа, предпочтительно за 2 часа до инфицирования помещают в термостат в вертикальном положении на острый конец яйца и затем после подготовки места инъекции инфицируют с помощью 10-200 мкл, предпочтительно 75-125 мкл вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус находится в среде для его размножения в концентрации 10^1 - 10^7 КИД₅₀/мл (инфекционная доза 50 % культуры доза на мл суспензии = степень разбавления, при которой инфицируются еще 50 % используемых культур клеток), предпочтительно 10^4 - 10^9 КИД₅₀/мл. В качестве среды для размножения вируса используют любые сами по себе известные среды для культур клеток, как, в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при вышеуказанных условиях инкубации в течение нескольких дней, предпочтительно в течение 2-5 дней, особенно предпочтительно в

течение 3 дней.

Содержащую вирус аллантоидную жидкость получают путем отсасывания после вскрытия известковой скорлупы, а также подскорлуповой оболочки и хориоаллантоидной мембраны яйца, и можно проводить ее обработку дальше, например, посредством фильтрации при использовании фильтров с размерами пор, например, 0,1-0,45 мкм и/или с помощью центрифугирования при ускорении вплоть до 10000 g.

Очистки, соответственно, выделения вируса достигают путем изопикнического или зонального центрифугирования, например, с градиентами плотности сахарозы. Для этой цели содержащую вирус среду, соответственно, аллантоидную жидкость после удаления остатков клеток подвергают зональному центрифугированию с ускорением 100000 g вплоть до седиментации вирусных частиц. В более чистом виде вирусные частицы получают путем зонального центрифугирования в водном растворе с более высокой плотностью, чем содержащая вирус среда. В качестве водного раствора может служить, например, 30-60 % масс., предпочтительно 35-50 % масс. буферированный раствор сахарозы. Еще более высокой степени чистоты достигают путем центрифугирования с градиентом плотности. Для этой цели освобожденный от клеток и остатков клеток, сконцентрированный с помощью зонального центрифугирования вирус выделяют путем изопикнического или зонального центрифугирования с градиентом плотности, например, 30-50 % масс. сахарозы в буферированном водном растворе при ускорении центрифугирования, например, 100000-150000 g.

Для получения пригодных генов, которые кодируют иммуногенные протеины, сначала выделяют вирусный геном из очищенных вирусных частиц. Природную вирусную рибонуклеиновую кислоту (РНК) предпочтительно получают путем обработки очищенных вирусных частиц содержащими детергенты и протеазы водными растворами.

Используют анионные, катионные, амфотерные и неионные детергенты. Предпочтительно применяют ионные детергенты, предпочтительно додецилсульфат натрия, в концентрации 0,1-10 объемн.%, предпочтительно 0,5-3 объемн.%.

В качестве протеаз используют такие, которые эффективны в присутствии детергентов, как, например, проназа, и предпочтительно используют протеиназу К. Протеазы применяют в концентрации 0,01-10 мг/мл, предпочтительно 0,05-0,5 мг/мл.

Предпочтительно применяют водные, буферированные растворы с добавкой рибонуклеазных ингибиторов.

В качестве буферных веществ применяют соли слабых кислот с сильными основаниями, как, например, трис(гидроксиметил)аминометан, соли сильных кислот со слабыми основаниями, как, например, первичные фосфаты или их смеси. Предпочтительно применяют трис(гидроксиметил)аминометан. Буферные вещества используют в концентрациях, обеспечивающих pH-значение, при котором РНК не денатурируется.

Предпочтительны pH-значения 6-8,5, особенно предпочтительны 7-8.

В качестве рибонуклеазных ингибиторов служат, например, рибонуклеозид-ванадилные комплексы, протеиновые ингибиторы (например, РНК guard/Фармация) или предпочтительно диэтилпиروкарбонат (ДЭПК), в концентрациях 0,01-2 объемн.%, предпочтительно 0,1-0,5 объемн.%.

Липофильные вещества вирусных лизатов затем экстрагируют растворителем, как, например, фенол, хлороформ или их смеси. Экстракцию осуществляют в одну или несколько стадий.

В остающейся водной фазе РНК осаждают с помощью водных растворов, которые содержат спирты, как, например, этанол или изопропанол, или хлориды или ацетаты одновалентных металлов, как, например, хлорид натрия, ацетат натрия или ацетат калия.

Концентрация спиртов составляет 40-100 объемн.%, предпочтительно 60-80 объемн.%, а концентрация хлоридов или ацетатов составляет 0,01-1 моль/л, предпочтительно 0,1-0,8 моль/л.

Осадившуюся РНК отделяют от водного раствора, например, путем центрифугирования и снова растворяют в водном растворе, например, в водном растворе диэтилпирокарбоната. Этот водный раствор содержит предпочтительно буферные вещества, как, например, трис(гидроксиметил)аминометан, в концентрациях 1-100 ммоль/л, предпочтительно 10-50 ммоль/л, возможно при добавке этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в концентрациях 0,1-10 ммоль/л, предпочтительно 1-10 ммоль/л, или дитиотреита в концентрациях 0,1-10 ммоль/л, предпочтительно 1-10 ммоль/л.

Выделенную РНК хранят при температурах ниже -65°C.

Другим методом выделения РНК является, например, экстракция РНК с помощью гуанидинтиоцианата и последующее центрифугирование вирусного лизата с градиентом плотности хлорида цезия.

Методы выделения РНК описываются J. Sambrook, E.F. Fritsh и T. Maniatis, Molecular Cloning, Лабораторное руководство, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Идентифицирование пригодных генов осуществляют при применении выделенного вирусного генома, например, следующими путями:

а) гибридизация РНК/ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) генома при применении известных генных зондов. В качестве пригодных генных зондов служат ДНК-зонды с нуклеотидными последовательностями известных генов для иммуногенов родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парариппозный вирус 2;

б) получение комплементарной ДНК (кДНК), клонирование кДНК, например, в бактериальных плаزمиде, как, например, pBR 322, для накопления вирусной ДНК и гибридизация клонированной ДНК с помощью известных генных зондов. В качестве пригодных генных зондов служат ДНК-зонды с нуклеотидными последовательностями известных генов для иммуногенов родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парариппозный вирус 2;

в) получение комплементарной ДНК (кДНК) и клонирование кДНК в плазмидных экспрессирующих векторах, как, например, pUC18/19 или pUC118/119, или в λ -бактериофаговых экспрессирующих векторах, как, например, λ gt11 и его потомки или λ ZAP или λ ORF8. Идентификацию генов осуществляют путем обнаружения их экспрессированных иммуногенов с помощью антител, которые прямо или косвенно обнаруживаются, например, путем иммунофлуоресценции или иммуноосаждения. Пригодными антителами являются такие, которые реагируют с иммуногенами родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парогриппозный вирус 2;

г) получение комплементарной ДНК (кДНК) и клонирование кДНК, например, в бактериальных плаزمидных для накопления вирусной ДНК. Вирусную ДНК клонов секвенируют и исследуют в отношении гомологий последовательностей с известными генами родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парогриппозный вирус 2;

д) секвенирование кДНК при ее получении и исследование в отношении гомологий последовательностей с известными генами родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парогриппозный вирус 2;

е) сочетание методов а) - д).

Методы гибридизации РНК/ДНК и ДНК/ДНК, получение кДНК, клонирование ДНК в плазмидных и бактериофаговых векторах, секвенирование ДНК, а также методы иммунологического обнаружения экспрессированных иммуногенов описываются в:

J. Sambrook, E.F. Fritsch и T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Лабораторное руководство, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989;

F.M. Ausubel, *Current protocols in molecular biology* 1987-1988, изд. John Wiley and Sons, Нью-Йорк, 1987;

A. Mayr, *Virologische Arbeitsmethoden*, том III, изд. Густав Фишер, Штутгарт, 1989.

Выбирают такие гены, в случае которых вышеуказанными методами можно обнаружить нуклеотидную последовательность, которая кодирует один или несколько иммуногенов. В качестве примера в Протоколе последовательностей (ниже) приводятся нуклеотидные последовательности с соответствующими аминокислотными последовательностями гемагглютинин-нейраминидаза-гена и гена слитого белка парогриппозного вируса 2, депонированного в Национальной коллекции культур и микроорганизмов (Институт Пастера, Париж, Франция) под номером 1-1331.

Экспрессию генов для получения иммуногенов осуществляют, например, следующими путями:

а) Стабильная интеграция генов в форме комплементарной ДНК в клеточном наследственном материале клеток более высших организмов. Прежде всего гены клонируют в пригодных шаттл-векторах. Для этой цели пригоден, например, обезьяний вирус 40 (OB40), а также плазмидные экспрессирующие векторы, которые пригодны для селекционирования и размножения в прокариотах (например, *E. Coli*), а также содержат ре-

гуляторные элементы для экспрессии чужеродной ДНК в клетках более высших организмов.

Пригодными плазмидными экспрессирующими векторами являются, например, плазмидные векторы на основе OB40, как pMSG, pSVT7 или pMT2, или плазмидные векторы на основе вируса Эпштейна-Барра, как pHEBo или p205.

Клонированную ДНК выделяют и очищают с помощью вышеописанных методов и вводят в клетки более высших организмов путем трансфекции.

Пригодными клетками являются клетки животных, в особенности перманентные линии клеток, как, например, клетки почек свиней PK15 (ATCC CCL33 и их потомки), клетки почек обезьян BGM (Flow 03-240 или их потомки) или Vero (ATCC CCL81 или их потомки), клетки почек крупного рогатого скота MDBK (ATCC CCL22 или их потомки), клетки почек собак MDCK (ATCC CCL34 или их потомки) или клетки почек кроликов RK-13 (ATCC CCL37).

Трансфекцию осуществляют, например, в форме соосаждения ДНК с фосфатом калия или с помощью диэтиламиноэтилдекстранового метода, липосомного метода или путем электропорации.

Методы клонирования выбранных генов в пригодных векторах, а также трансфекции клонированными генами клеток более высших организмов подробно описываются J. Sambrook, E.F. Fritsch и T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Лабораторное руководство, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, и F.M. Ausubel, *Current protocols in molecular biology* 1987-1988, изд. John Wiley and Sons, Нью-Йорк, 1987.

Надосадочные жидкости культур клеток, соответственно, клеточные лизаты таким образом обработанных клеток испытывают на наличие экспрессированных иммуногенов с помощью антител, которые прямо или косвенно обнаруживаются, например, путем иммунофлуоресценции или иммуноосаждения. Пригодными антителами являются такие, которые реагируют с иммуногенами родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парогриппозный вирус 2.

б) Клонирование генов в форме комплементарной ДНК в пригодных экспрессирующих векторах для клеток низших и более высших организмов.

Пригодны, например, (I) бактериальные плазмидные экспрессирующие векторы, (II) вирусные экспрессирующие векторы для бактерий или (III) вирусные экспрессирующие векторы для клеток более высших организмов, в которых экспрессируется клонированный ген.

К пункту (I):

Пригодными бактериальными плазмидными экспрессирующими векторами являются, например, pUC18/19 или pUC118/119. После клонирования ДНК в плазмиде ее вводят в прокариотные клетки, предпочтительно бактерии, и размножают. Пригодна, например, *Escherichia coli* K 12 и ее потомки.

Для введения плазмиды в прокариотную клетку пригодна, например, соосаждение ДНК с фосфатом кальция или электропорация.

К пункту (II):

Пригодными вирусными экспрессирующими

векторами для бактерий являются λ -бактериофаговые векторы, как, например, λ gt11 и его потомки, λ ZAP или λ ORF8. Размножение λ -бактериофаговых векторов осуществляется в особенности в *Escherichia coli*, например, *Escherichia coli* K 12 и ее потомках.

К пункту (III):

Пригодными вирусными экспрессирующими векторами для клеток более высших организмов являются, например, обезьяний вирус 40, адено-вирусы, вирус простого герпеса или бакуловирусы. Размножение вирусных векторов происходит в соответствующих системах клеток.

Методы клонирования выбранных генов в пригодных экспрессирующих векторах, а также их введение в соответствующие экспрессионные системы подробно описывается J. Sambrook, E.F. Fritsch и T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Лабораторное руководство, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, и F.M. Ausubel, *Current protocols in molecular biology 1987-1988*, изд. John Wiley and Sons, Нью-Йорк, 1987.

Экспрессированные иммуногены применяют в качестве антигенного материала либо непосредственно в виде систем экспрессии (культуральный субстрат и/или клетки), либо после получения и очистки посредством биохимических и/или иммунологических методов и в случае необходимости после концентрирования или разбавления.

Пригодными для очистки являются, например, способы аффинной или гель-хроматографии, при которых иммуногены отделяют или выделяют из системы экспрессии, в случае необходимости после ее перевода в растворимую форму путем обработки детергентом.

Для получения вирусных антигенов, которые экспрессируются векторными системами, прежде всего получают вирусный геном.

Для получения вирусного генома сначала осуществляют размножение вирусов обычным образом, с одной стороны, в культурах тканей клеток животных в качестве первичных клеток или перманентных линий клеток, например, в клетках свиней, обезьян или крупного рогатого скота, предпочтительно в клетках почек свиней, как, например, клонированные, перманентные клетки почек свиней PK15 (ATCC CCL33 или их потомки) или первичные клетки почек свиней EPK, или в клетках почек обезьян, как перманентные клетки почек обезьян BGM (Flow 03-240 или их потомки) или Vero (ATCC CCL81 или их потомки), или в клетках почек крупного рогатого скота, как перманентные клетки почек крупного рогатого скота MDBK (ATCC CCL22 или их потомки), и, с другой стороны, в эмбрионированных куриных яйцах (например, Вало-инкубационные яйца, фирма Лохман).

Размножение в культурах клеток осуществляют само по себе известным образом в стационарных роллерных культурах или культурах на носителе в форме сплошных соединений клеток (монослои) или в суспендированных культурах. В качестве сред для размножения клеток используют любые сами по себе известные среды для культур клеток, например, описанные в каталоге

продуктов фирмы Гибко БРЛ Гмбх, Дизельштрассе 5, 76344, Эггенштейн, как в особенности минимальная необходимая среда (MEM), которая в качестве основных составных частей содержит аминокислоты, витамины, соли и углеводы, дополняемая буферными веществами, как, например, гидрокарбонат натрия или гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфо-кислота (Гепес), и в случае необходимости сыворотками (крови) животных, как, например, сыворотки крупного рогатого скота, лошадей, соответственно, их плодные сыворотки. Особенно предпочтительно используют минимальную необходимую среду Игла с содержанием гидрокарбоната натрия 0,1-5 г/л, предпочтительно 0,5-3 г/л, а также плодной телячьей сыворотки в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн.%.

Служащие для размножения вирусов клетки и расы клеток размножаются обычным образом почти вплоть до слияния или вплоть до оптимальной плотности клеток. Перед их инфицированием с помощью вирусов предпочтительно удаляют среду для размножения клеток и клетки предпочтительно промывают с помощью среды для размножения вируса. В качестве среды для размножения вируса используют любые, сами по себе известные среды для культур клеток, как в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда. Затем проводят инфицирование с помощью вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус разбавлен в среде для его размножения так, что происходит инфицирование с МИ (= множественность инфекции, соответствующая соотношению числа инфекционных вирусных частиц к числу имеющихся клеток), соответствующей 0,01-50, предпочтительно 0,1-10.

Размножение вирусов осуществляют с добавкой или без нее сывороток животных. В том случае, когда используют сыворотку, ее добавляют к среде для размножения в концентрации 1-30 объемн.%, предпочтительно 2-10 объемн.%.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при температурах от комнатной до 40°C, предпочтительно при 32-39°C, особенно предпочтительно при 37°C, в течение нескольких дней, предпочтительно вплоть до полного разрушения инфицированных клеток.

Содержащую вирус среду инфицированных клеток обрабатывают далее, например, путем удаления клеток и остатков клеток посредством фильтрации при использовании фильтров с размерами пор, например, 0,1-0,45 мкм и/или с помощью центрифугирования с ускорением вплоть до 10000 g.

Размножение в эмбрионированных куриных яйцах осуществляют само по себе известным образом в аллантаидной полости инкубационных куриных яиц, которые предварительно инкубируют в течение 9-12 дней, предпочтительно в течение 10 дней, при температуре 37-39°C, предпочтительно 38,5°C, и при относительной влажности воздуха 30-90 %, предпочтительно 50-60 %, в стандартном термостате, предпочтительно в инкубаторе.

Служащие для размножения вирусов инкубационные яйца за 1-3 часа, предпочтительно за 2

часа до инфицирования помещают в термостат в вертикальном положении на острый конец яйца и затем после подготовки места инъекции инфицируют с помощью 10²-200 мкл, предпочтительно 75-125 мкл вирусной суспензии. В вирусной суспензии вирус находится в среде для его размножения в концентрации 10¹-10⁷ КИД₅₀/мл (инфекционная для 50 % культуры доза на мл суспензии = степень разбавления, при которой инфицируются еще 50 % используемых культур клеток), предпочтительно 10⁴-10⁵ КИД₅₀/мл. В качестве среды для размножения вируса используют любые сами по себе известные среды для культур клеток, как, в особенности вышеуказанная минимальная необходимая среда.

Инфицирование и размножение вируса осуществляют при вышеуказанных условиях инкубации в течение нескольких дней, предпочтительно в течение 2-5 дней, особенно предпочтительно в течение 3 дней.

Содержащую вирус аллантоидную жидкость получают путем отсасывания после вскрытия известковой скорлупы, а также подскорлуповой оболочки и хориоаллантоидной мембраны яйца, и можно проводить ее обработку дальше, например, посредством фильтрации при использовании фильтров с размерами пор, например, 0,1-0,45 мкм и/или с помощью центрифугирования при ускорении вплоть до 10000 g.

Очистки, соответственно, выделения вируса достигают путем изопикнического или зонального центрифугирования, например, с градиентами плотности сахарозы. Для этой цели содержащую вирус среду, соответственно, аллантоидную жидкость после удаления остатков клеток подвергают зональному центрифугированию с ускорением 100000 g вплоть до седиментации вирусных частиц. В более чистом виде вирусные частицы получают путем зонального центрифугирования в водном растворе с более высокой плотностью, чем содержащая вирус среда. В качестве водного раствора может служить, например, 30-60 % масс., предпочтительно 35-50 % масс. буферированный раствор сахарозы. Еще более высокой степени чистоты достигают путем центрифугирования с градиентом плотности. Для этой цели освобожденный от клеток и остатков клеток, сконцентрированный с помощью зонального центрифугирования вирус выделяют путем изопикнического или зонального центрифугирования с градиентом плотности, например, 30-50 % масс. сахарозы в буферированном водном растворе при ускорении центрифугирования, например, 100000-150000 g.

Для получения пригодных генов, которые кодируют иммуногенные протеины, сначала выделяют вирусный геном из очищенных вирусных частиц. Природную вирусную рибонуклеиновую кислоту (РНК) предпочтительно получают путем обработки очищенных вирусных частиц содержащими детергенты и протеазы водными растворами.

Используют анионные, катионные, амфотерные и неионные детергенты. Предпочтительно применяют ионные детергенты, предпочтительно додецилсульфат натрия, в концентрации 0,1-10

объемн.%, предпочтительно 0,5-3 объемн. %.

В качестве протеаз используют такие, которые эффективны в присутствии детергентов, как, например, проназа, и предпочтительно используют протеиназу К. Протеазы применяют в концентрации 0,01-10 мг/мл, предпочтительно 0,05-0,5 мг/мл.

Предпочтительно применяют водные, буферированные растворы с добавкой рибонуклеазных ингибиторов.

В качестве буферных веществ применяют соли слабых кислот с сильными основаниями, как, например, трис(гидроксиэтил)аминометан, соли сильных кислот со слабыми основаниями, как, например, первичные фосфаты или их смеси. Предпочтительно применяют трис(гидроксиэтил)аминометан. Буферные вещества используют в концентрациях, обеспечивающих pH-значение, при котором РНК не денатурируется. Предпочтительны pH-значения 6-8,5, особенно предпочтительны 7-8.

В качестве рибонуклеазных ингибиторов служат, например, рибонуклеозид-ванадилные комплексы, протеиновые ингибиторы (например, РНК guard / Фармация) или предпочтительно диэтилпирикарбонат (ДЭПК), в концентрациях 0,01-2 объемн.%, предпочтительно 0,1-0,5 объемн. %.

Липофильные вещества вирусных лизатов затем экстрагируют растворителем, как, например, фенол, хлороформ или их смеси. Экстракцию осуществляют в одну или несколько стадий.

В остающейся водной фазе РНК осаждают с помощью водных растворов, которые содержат спирты, как, например, этанол или изопропанол, или хлориды или ацетаты одновалентных металлов, как, например, хлорид натрия, ацетат натрия или ацетат калия.

Концентрация спиртов составляет 40-100 объемн.%, предпочтительно 60-80 объемн.%, а концентрация хлоридов или ацетатов составляет 0,01-1 моль/л, предпочтительно 0,1-0,8 моль/л.

Осадившуюся РНК отделяют от водного раствора, например, путем центрифугирования и снова растворяют в водном растворе, например, водном растворе диэтилпирикарбоната. Этот водный раствор содержит предпочтительно буферные вещества, как, например, трис(гидроксиэтил)аминометан, в концентрациях 1-100 ммоль/л, предпочтительно 10-50 ммоль/л, возможно при добавке этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в концентрациях 0,1-10 ммоль/л, предпочтительно 1-10 ммоль/л, или дитиотреита в концентрациях 0,1-10 ммоль/л, предпочтительно 1-10 ммоль/л.

Выделенную РНК хранят при температурах ниже -65 °C.

Другим методом выделения РНК является, например, экстракция РНК с помощью гуанидинтиоцианата и последующее центрифугирование вирусного лизата с градиентом плотности хлорида цезия.

Методы выделения РНК описываются J. Sambrook, E.F. Fritsh и T. Maniatis, Molecular Cloning, Лабораторное руководство, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Идентифицирование пригодных генов осуществляют при применении выделенного вирусного

генома, например, следующими путями:

а) гибридизация РНК/ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) генома при применении известных генных зондов. В качестве пригодных генных зондов служат ДНК-зонды с нуклеотидными последовательностями известных генов для иммуногенов родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парагриппозный вирус 2;

б) получение комплементарной ДНК (кДНК), клонирование кДНК, например, в бактериальных плаزمидках, как, например, pBR 322, для накопления вирусной ДНК и гибридизация клонированной ДНК с помощью известных генных зондов. В качестве пригодных генных зондов служат ДНК-зонды с нуклеотидными последовательностями известных генов для иммуногенов родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парагриппозный вирус 2;

в) получение комплементарной ДНК (кДНК) и клонирование кДНК в плазмидных экспрессирующих векторах, как, например, pUC18/19 или pUC118/119, или в λ -бактериофаговых экспрессирующих векторах, как, например, λ gt11 и его потомки или λ ZAP или λ ORF8. Идентификацию генов осуществляют путем обнаружения их экспрессированных иммуногенов с помощью антител, которые прямо или косвенно обнаруживаются, например, путем иммунофлуоресценции или иммуноосаждения. Пригодными антителами являются такие, которые реагируют с иммуногенами родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парагриппозный вирус 2;

г) получение комплементарной ДНК (кДНК) и клонирование кДНК, например, в бактериальных плазмидках для накопления вирусной ДНК. Вирусную ДНК клонов секвенируют и исследуют в отношении гомологий последовательностей с известными генами родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парагриппозный вирус 2;

д) секвенирование кДНК при ее получении и исследование в отношении гомологии последовательностей с известными генами родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парагриппозный вирус 2;

е) сочетание методов а) - д).

Методы гибридизации РНК/ДНК и ДНК/ДНК, получение кДНК, клонирование ДНК в плазмидных и бактериофаговых векторах, секвенирование ДНК, а также методы иммунологического обнаружения экспрессированных иммуногенов описываются в:

J. Sambrook, E.F. Fritsch и T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Лабораторное руководство, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; F.M. Ausubel, *Current protocols in molecular biology 1987-1988*, изд. John Wiley and Sons, Нью-Йорк, 1987;

A. Mayr, *Virologische Arbeitsmethoden*, том III, изд. Густав Фишер, Штутгарт, 1989.

Выбирают такие гены, в случае которых вышеуказанными методами можно обнаружить нуклеотидную последовательность, которая кодирует один или несколько иммуногенов. В качестве примера в Протоколе последовательностей (ни-

же) приводятся нуклеотидные последовательности с соответствующими аминокислотными последовательностями гемагглютинин-нейраминидаза-гена и гена слитого белка парагриппозного вируса 2, депонированного в Национальной коллекции культур и микроорганизмов (Институт Пастера, Париж, Франция) под номером 1-1331.

Эти гены, которые кодируют один или несколько иммуногенов (чужеродная ДНК), вставляют в геномный вектор, который в случае инфекции клетки или организма экспрессирует чужеродный ген. Для этого пригодны векторные вирусы и векторные бактерии. Находят применение, например, апатогенные ДНК-вирусы, которые включают стабильный геном с известными областями вставок для приема 0,1-20 т.н. (1000 пар нуклеотидов) чужеродной ДНК, как, например, вирусы вакцины, вирусы герпеса или аденовирусы.

Для этого необходимо (α) сначала вставить ген или гены в шаттл-вектор, который содержит чужеродную ДНК, фланкированную от ДНК-последовательностей векторного вируса. Затем (β) ген или гены вставляют в геном векторного вируса, например, путем котрансфекции шаттл-вектора и векторного вируса.

Пригодными шаттл-векторами являются плазмидные и бактериофаговые векторы.

Примерами обычных плазмидных векторов являются pBR322, pUC18/19, pAT153, pACYC184 или pSP64/65, и примерами бактериофаговых векторов являются λ gt10/11, λ ZAP или M13mp18/19.

(α) Вставка гена или генов в шаттл-вектор.

Сначала фрагмент ДНК, который содержит область вставки векторного вируса, вставляют в ДНК шаттл-вектора. Для этой цели как ДНК-последовательности известных областей вставок генома векторного вируса, так и также ДНК шаттл-вектора обрабатывают с помощью рестрикционных эндонуклеаз (ферменты рестрикции), чтобы определить пассирующие концы последовательности для вставки. Такого рода подготовленную ДНК шаттл-вектора смешивают с избытком вставляемого фрагмента ДНК, например, примерно в соотношении 1:5. ДНК-смесь обрабатывают ДНК-лигазами, чтобы связать ковалентно фрагмент ДНК в векторе.

При применении шаттл-плазмиды, ее вводят в прокариотные или эукариотные клетки, предпочтительно бактерии, и размножают. Пригодна, например, *Escherichia coli* K 12 и ее потомки.

Отбирают бактерии, которые включают несущую ДНК-фрагмент плазмиду.

Клонирование области вставки в шаттл-плазмидном геноме, его вставка в прокариотные или эукариотные клетки, размножение и селекция трансформированных бактерий подробно описываются J. Sambrook, E.F. Fritsch и T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Лабораторное руководство, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, и F.M. Ausubel, *Current protocols in molecular biology 1987-1988*, изд. John Wiley and Sons, Нью-Йорк, 1987.

Если необходимо, используют так называемый "полилинкер" в областях вставок векторного вируса. Полилинкерами являются ДНК-последовательности по меньшей мере с двумя опреде-

ленными местами расщепления ферментом рестрикции.

Для этого фрагмент ДНК, который содержит область вставки, обрабатывают с помощью такого фермента рестрикции, чтобы фрагмент открывался (расщеплялся) только в одной области. Таким образом подготовленный фрагмент вместе с полилинкером и ДНК-лигазой инкубируют для целевой вставки в определенные места расщепления ферментом рестрикции.

Полилинкер можно вставлять в выделенный или несущий клонированные в шаттл-векторе области вставок фрагмент ДНК.

Если в выделенные фрагменты ДНК вводят полилинкер, то их затем нужно вставлять в шаттл-вектор. При применении шаттл-плазмиды ее вставляют в прокариотные или эукариотные клетки, предпочтительно бактерии, и размножают. Пригодна, например, *Escherichia coli* K 12 и ее потомки. Отбирают бактерии, которые включают содержащую фрагмент ДНК плазмиду.

Если в клонированный в шаттл-векторе фрагмент ДНК вводят полилинкер, то его размножают и селекционируют.

Гены, которые кодируют один или несколько иммуногенов (чужеродная ДНК), вставляют в области вставок.

Если необходимо, прежде всего удаляют частичные последовательности ДНК-фрагмента, который несет область вставки. Для этой цели ДНК-фрагмент обрабатывают с помощью ферментов рестрикции и полученные фрагменты ДНК отделяют.

Для вставки чужеродной ДНК сначала выделенный или клонированный в шаттл-векторе фрагмент ДНК, который несет область вставки, обрабатывают с помощью одного или нескольких ферментов рестрикции и фрагмент раскрывают в области вставки, соответственно, во введенном полилинкере. Чужеродную ДНК вставляют в таким образом подготовленную область вставки, например, с помощью ДНК-лигаз.

Если чужеродную ДНК вставляют в выделенные фрагменты ДНК, то их затем нужно вставлять в шаттл-вектор. При применении шаттл-плазмиды ее вставляют в прокариотные или эукариотные клетки, предпочтительно бактерии, и размножают.

Пригодна, например, *Escherichia coli* K 12 и ее потомки. Отбирают бактерии, которые содержат включающие чужеродную ДНК плазмиды.

Если чужеродную ДНК вставляют в клонированный в шаттл-векторе фрагмент ДНК, то ее размножают и селекционируют.

Методы получения шаттл-векторов подробно описываются J. Sambrook, E.F. Fritsch и T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Лабораторное руководство, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, и F.M. Ausubel, *Current protocols in molecular biology 1987-1988*, изд. John Wiley and Sons, Нью-Йорк, 1987.

(β) Введение чужеродной ДНК в геном векторного вируса:

Для вставки чужеродной ДНК в геном векторного вируса можно применять следующие методы:

(I) котрансфекция пригодных клеток с помощью шаттл-векторной ДНК и выделенной при-

дной векторной вирусной ДНК;

(II) трансфекция пригодных клеток с помощью шаттл-векторной ДНК и инфицирование с помощью векторного вируса;

(III) инфицирование пригодных клеток с помощью векторного вируса и трансфекция с помощью шаттл-вирусной ДНК.

Пригодные для этой цели методы подробно описываются J. Sambrook, E.F. Fritsch и T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Лабораторное руководство, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, и F.M. Ausubel, *Current protocols in molecular biology 1987-1988*, изд. John Wiley and Sons, Нью-Йорк, 1987.

Предпочтительно используют метод (I), который осуществляют по методике осаждений ДНК фосфатом кальция. Для этого необходимы следующие стадии:

(1) Шаттл-вектор размножают, выделяют и далее очищают. Очистку шаттл-векторной ДНК проводят, например, с помощью изопикнического центрифугирования с градиентом плотности, например, с градиентом плотности хлорида цезия.

Векторный вирус размножают и очищают. Вирусный геном выделяют и далее очищают. Очистку векторной вирусной ДНК осуществляют, например, с помощью изопикнического центрифугирования с градиентом плотности, например, градиентом плотности хлорида цезия.

(2) Для котрансфекции применяют кольцевую или предпочтительно линейную шаттл-векторную ДНК.

Линейную шаттл-векторную ДНК получают, например, путем обработки очищенной ДНК с помощью ферментов рестрикции. Предпочтительны ферменты рестрикции, которые не содержат никакого места распознавания (места расщепления) во вставленной чужеродной ДНК, то есть последовательность чужеродной ДНК не расщепляется.

(3) Векторную вирусную ДНК и шаттл-векторную ДНК смешивают, например, в соотношении $0,01-0,1 \times 10^{-12}$ моль/л векторной вирусной ДНК к $1-3 \times 10^{-12}$ моль/л шаттл-векторной ДНК.

(4) Смесь ДНК соосаждают, например, с фосфатом кальция и переносят в пригодные клетки.

Пригодными клетками являются клетки животных, в особенности перманентные линии клеток, как, например, клетки почек свиней PK15 (ATCC CCL33 и их потомки), клетки почек обезьян BGM (Flow 03-240 или их потомки) или Vero (ATCC CCL81 или их потомки), клетки почек крупного рогатого скота MDBK (ATCC CCL22 или их потомки), клетки почек собак MDCK (ATCC CCL34 или их потомки) или клетки почек кроликов RK-13 (ATCC CCL37).

Котрансфекцию можно осуществлять также с помощью других методов. В качестве таковых следует, например, назвать диэтиламиноэтилдекстрановый метод, липосомный метод или электропорацию.

(5) Клетки культивируют, например, согласно подробно описанным выше методам. При появлении цитопатогенетического эффекта клоны векторного вируса выделяют по однозональному методу очистки и размножают далее.

Методы однозональной очистки описываются

A. Mayr, Virologische Arbeitsmethoden, том I, изд. Густав Фишер, Штутгарт, 1974.

(6) Селекцию рекомбинантных векторных вирусов осуществляют (I) путем обнаружения экспрессии чужеродного гена или (II) путем обнаружения вставленной чужеродной ДНК в векторный вирусный геном, например, за счет ДНК/ДНК-гибридизации:

(I) Обнаружение экспрессии чужеродной ДНК осуществляют, например, с помощью антител. Пригодными антителами являются такие, которые реагируют с иммуногенами родственных вирусных штаммов, как, например, обезьяний вирус 5 или собачий парагриппозный вирус 2. Генный продукт чужеродной ДНК можно обнаружить, например, путем иммунофлуоресценции или иммуноосаждения.

(II) Обнаружение вставленной чужеродной ДНК осуществляют путем гибридизации с генными зондами соответствующего чужеродного гена.

Стабильные рекомбинантные векторные вирусы размножают, выделяют и обрабатывают далее по обычным известным способам, как подробно описанные выше, и применяют в качестве антигенного материала.

В предлагаемых согласно изобретению вакцинах антигенный материал находится индивидуально или в смеси с обычными, вспомогательными для формулирования веществами. В качестве таковых следует назвать фармакологически приемлемые растворители или разбавители, добавки, консерванты, суспендирующие агенты или агенты растворения, как эмульгаторы.

Антигенный материал используют в качестве биологически активного вещества при формулировании вакцин.

Для приготовления живой вакцины применяют антигенный материал в форме живых вирусных частиц, к которому для стабилизации добавляют добавки и в случае необходимости также антивспениватели и консерванты. Для лучшей сохраняемости живую вакцину лиофилизируют путем сушки вымораживанием. Перед применением этой вакцины лиофилизированный продукт реконструируют с помощью растворителя, как, например, дистиллированная вода, очищенная вода или 0,9 %-ный раствор хлорида натрия.

Освобожденные от клеточного субстрата вирусные частицы в концентрации по меньшей мере 10^6 КИД₅₀/мл смешивают вместе с защитными коллоидами, соответственно, стабилизаторами, как, например, целлюлозы, декстраны, желатины, коллоиды или стеараты, и в случае необходимости при добавке антивспенивателей, как, например, трибутилфосфат, изопропанол или силиконовое масло, а также консервантов, как, например, мертиолат или тимеросал, в водном, с буферированным pH-значением растворе, вносят в соответствующие емкости и подвергают сушке вымораживанием.

Для приготовления убитых вакцин (инактивированные вакцины) в качестве антигенного материала применяют полные, умерщвленные вирусные частицы в концентрации $10^{4,0}$ - $10^{9,0}$ КИД₅₀/мл, предпочтительно $10^{5,0}$ - $10^{8,0}$ КИД₅₀/мл, перед инаktivацией, или отдельные части (субъединицы)

вирусных частиц в такой концентрации, что на одну дозу для вакцинации содержатся 10-250 мг протеина, предпочтительно 10-100 мг протеина. Антигенный материал в вакцине находится в смеси с обычными вспомогательными для формулирования веществами, как растворители и разбавители, добавки, консерванты, суспендирующие агенты или агенты растворения, регулирующие pH-значение средства и в случае необходимости антивспениватели.

В качестве растворителей и разбавителей следует назвать дистиллированную воду, очищенную воду, физиологически приемлемые солевые растворы, а также среды для культур клеток. В особенности находят применение вышеуказанная минимальная необходимая среда Игла, а также буферированный фосфатом раствор хлорида натрия.

В качестве добавок следует назвать:

1) минеральные соли, как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, фосфат кальция, каолин или кремний. Предпочтительно используют 10-50 объемн.%, предпочтительно 25-35 объемн.% геля гидроксида алюминия с долей гидроксида алюминия 1-5 %масс, предпочтительно 2-3 % масс. на объем;

2) масляные добавки, как нетоксичные минеральные масла (например, Драцеол, парафиновое масло), растительные масла (например, лецитин, арахисовые масла) или животные масла (скалан, сквален), которые используются в концентрации 1-40 объемн.%, предпочтительно 1-15 объемн.%;

3) гидрофильные и гидрофобные полимеры, как полиэтиленоксид и полипропиленоксид. Предпочтительно используют синтетически полученные блоксополимеры (например, Плуороник Л 101, Плуороник Л 121, Плуороник Л 122, Тетроник 1501) в концентрации 1-10 объемн.%;

4) добавки бактериального происхождения, как Pertussis-токсин (*Bordetella pertussis*), митоген *Salmonella-typhimurium*, или бактериальные эндотоксины, как липополисахариды (ЛПС, например, из микобактерий или сальмонелл), а также аналоги или производные липополисахаридов, как, например, липид-А, монофосфорил-липид-А (МФЛ), дифосфорил-липид-А (ДФЛ), трегалозо-димиколат (ТДМ), мурамилдипептид (МДП) или адамантилдипептид (АлДП), а также их производные. Предпочтительно используют производные мурамилдипептида или адамантилдипептид в концентрации 0,0001-10 % масс./объем;

5) органические, диспергируемые в воде добавки, как холестерин, желатина, фосфатидилхолин, полисахариды (например, зимозан, агар), алифатические амины (например, диметилдиоктадециламин /ДДА/, N,N-диоктадецил-N',N'-бис(2-гидроксиэтил)пропандиамин /Авридин/), диэтиламиноэтилдекстраны или сапонин (из коры *Quillaja saponaria* Molina) и производные сапонины (Квил А);

6) монокины и лимфокины, как, например, интерлейкин-1, интерлейкин-2 или γ -интерферон;

7) возможные сочетания из 1) - 6).

В качестве консервантов следует назвать формалин в концентрациях вплоть до 1 %, фенол и бензиловый спирт в концентрациях вплоть

до 0,5 %, сорбиновую кислоту, бензойную кислоту, бензоат натрия, а также их производные, как, например, натриевая соль 2-(этилмеркурио-тио)бензойной кислоты (Мертиолат, Тимеросал, Тиомерсал) или натриевая соль 4-(этилмеркурио-тио)бензойной кислоты (Тиомерфонат). Предпочтительно используют Мертиолат в концентрациях 0,01-0,5 %.

В качестве суспендирующих агентов следует назвать нетоксичные поверхностно-активные вещества, как растительные протеины, альгинаты, целлюлозы, фосфолипиды и в особенности вещества на основе простых гликолевых эфиров, как полиэтиленгликоли и их производные. Предпочтительно используют полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярными массами 200, 300, 400, 600 и 900, а также производные полиэтиленгликоля (Спан, Арлацел, Твин, Майри, Бриж), особенно предпочтительно Твин 80, в концентрации 0,05-5 объемн.%, предпочтительно 0,2-1 объемн.%.

В качестве регулирующих значение pH веществ следует назвать, например, гидроксид натрия и гидроксид калия, карбонат натрия и карбонат калия, уксусную кислоту, винную кислоту и лимонную кислоту или гидроксизтилпиперазин-N-2-этансульфокислоту (ГЕПЕС).

В качестве антивспенивателей следует назвать трибутилфосфат, изопропанол, силиконовое масло, Антифоам или Байсилон, антивспениватель EBZ.

Предлагаемые согласно изобретению парагриппозные вирусы, которые вызывают заболевания респираторного и репродуктивного трактов свиней, можно получать, например, следующим образом:

У свиней, которые больны с подобными СРРС симптомами, извлекают органы и выделяют вирус. Особенно пригодны нежизнеспособные или больные поросята из инфицированного поголовья. У пригодного животного извлекают внутренние органы, в особенности легкие, печень, почки и селезенку. Части этих органов или смесей органов гомогенизируют с физиологически приемлемыми водными растворами до получения суспензий, причем доля частей органов составляет примерно 10 % масс. на объем. В качестве суспендирующего агента особенно пригодна вышеописанная минимальная необходимая среда Игла. Суспензии освобождают от клеток и остатков клеток путем центрифугирования с ускорением примерно 1500 g. Дальнейшую очистку надосадочной жидкости после центрифугирования можно осуществлять путем фильтрации. Для этой цели пригодны фильтры с размерами пор 0,2-5 мкм, предпочтительно 0,2-0,45 мкм.

Из извлеченных органов, предпочтительно из легких, также можно получать первичную культуру клеток, которую исследуют в отношении появления цитопатогенного эффекта (ЦПЭ). Для этой цели грубо размельченную ткань подвергают ферментативному разложению с помощью протеаз. Для этого особенно пригоден трипсин в концентрации 0,1-0,5 % масс./объем, предпочтительно 0,125-0,25 % масс./объем, в физиологическом водном растворе. Гидролиз трипсином осуществляют при 20-37°C, предпочтительно при комнатной

температуре, в течение 2-8 часов. Неподвергшиеся гидролизу составные части ткани отделяют путем фильтрации через крупнопористый фильтр. Подвергнувшиеся гидролизу трипсином клетки выделяют путем центрифугирования при 500-1500 g. Осадок клеток снова суспендируют в пригодной среде для выращивания, как, например, в описанной минимальной необходимой среде Игла, и в концентрации 10^5 - 10^6 клеток на мл среды высевает в емкости для культивирования. В зависимости от скорости роста среду для выращивания меняют каждые 3-7 дней. Рост клеток и появление цитопатогенного эффекта исследуют ежедневно. Дополнительно можно анализировать в отношении гемагглютинирующих свойств надосадочную жидкость культур клеток в постоянные промежутки времени 2-7 дней.

Надосадочные жидкости после центрифугирования, соответственно, фильтраты гомогенатов органов, а также надосадочные жидкости культур клеток из полученных первичных культур органов при разбавлении от 1:1 до 1:1000, предпочтительно от 1:10 до 1:100, наносят на первичные или перманентные культуры клеток молочной железы и инкубируют при 32-39°C, предпочтительно при 37°C, в течение нескольких дней. Для этой цели применяют расы клеток, которые выросли до слияния на 20-100 %, предпочтительно 80-100 %. Культуры клеток ежедневно исследуют в отношении появления цитопатогенного эффекта. Дополнительно можно анализировать в отношении гемагглютинирующих свойств надосадочную жидкость культур клеток в постоянные промежутки времени 2-7 дней. Если не появляются никакие признаки размножения вируса, то надосадочные жидкости культуры клеток пассируют далее в указанных разбавлениях на свежих культурах клеток. Этот процесс можно повторять многократно.

При появлении признаков размножения вируса путем дальнейших пассажей вирус адаптируют к применяемой культуре клеток.

У абортирующей свиноматки, которая происходит из поголовья с подобными СРРС симптомами, путем аутопсии извлекают еще находившегося в матке поросят. Из легких этого поросят путем получения первичной культуры клеток легких и путем пассажей с получающейся из нее культуральной надосадочной жидкостью в линиях клеток животных выделяют цитопатогенный действующий фактор. Он характеризуется как содержащий оболочку, гемагглютинирующий, размером примерно 200 нм, одонитевой РНК-вирус, который согласно анализу на электронном микроскопе имеет морфологию парамиксовируса. Протеины этого вируса распознаются путем Вестерн-блотирования антисыворотки по отношению к парагриппозному вирусу типа 2 (ПГВ-2). В одной и той же тест-системе полученная по отношению к изолированному вирусу антисыворотка распознает штамм парагриппозного вируса типа 2 "ОВ 5", что говорит о серологическом родстве выделенного вируса с парагриппозным вирусом типа 2.

Этот парагриппозный изолят с названием "SER" хранится с 12.06.1993 г. в "Национальной

коллекции культур и микроорганизмов" Института Пастера, Париж, Франция, под номером 1-1331.

Выделенный вирус может размножаться в большом масштабе при применении культур клеток животных. Из таким образом полученных вирусных суспензий с помощью пригодного технического способа (центрифугирование, тангенциальная фильтрация) можно готовить очищенные антигенные препараты. Их можно использовать в качестве исходного материала для диагноза и предохранения свиней от респираторных и репродуктивных заболеваний, в особенности свиного репродуктивного и респираторного синдрома.

Пример 1

Выделение парагриппозного изолята "SER"

Парагриппозный изолят "SER" можно выделить из легких поросенка, извлеченного из матки при аутопсии эвтаназированной, абортирующей свиноматки, которая происходит из поголовья с подобными CPPC симптомами.

РК 15 Клетки (клонированные клетки свинных почек, ATCC № CCL33)

Минимальная необходимая среда Игла с солями Эрле (E-MEM):

E-MEM-порошок с феноловым красным (например. Гибко БРЛ 072-0110) для 100 л

заменимые аминокислоты, готовый раствор, 100-кратное разбавление 1000 мл

неомицинсульфат 3 г

полимиксин-Б-сульфат 3 МЕ

очищенная вода (EP 8) до 100 мл

заменимые аминокислоты, готовый раствор, 100-кратное разбавление:

аланин (EP 752) 8,9 г

моногидрат аспарагина (DAB 10) 15,0 г

L-аспарагиновая кислота 13,2 г

глицин (EP 614) 7,5 г

глутаминовая кислота (EP 750) 14,5 г

пролин (EP 785) 11,5 г

серии (EP 788) 10,5 г

очищенная вода (EP 8) до 10 л

плодная телячья сыворотка (ПТС, например. Гибко БРЛ 012-06290) среда для выращивания: E-MEM с 2,0 г/л гидрокарбоната натрия и 2 % ПТС поддерживающая среда: E-MEM с 0,85 г/л гидрокарбоната натрия и 5 % ПТС 0,25 %-ный раствор трипсина (например. Гибко БРЛ 043-05050) буферированный фосфатом раствор хлорида натрия:

хлорид натрия 8,0 г

хлорид калия 0,2 г

дигидрофосфат калия 0,2 г

динатрийфосфат с 12 молекулами воды 2,9 г

очищенная вода (EP 8) до 1000мл

Поверхность тканевой культуры 80 см², (Раукс - поверхность, например, Грейнер 658170)

Часть извлеченных в стерильных условиях легких поросенка грубо размельчают с помощью ножниц и подвергают ферментативному разложению в 0,25 %-ном растворе трипсина. Гидролиз с помощью трипсина осуществляют при перемешивании при комнатной температуре в течение 4 часов. Крупные куски ткани отделяют в стерильном фильтре из тканого сита. Фильтрат промывают трижды с помощью буферированного фосфатом раствора хлорида натрия при центрифугировании с небольшим числом оборотов (1000 g, 10 минут). Клетки высевают в E-MEM при добавке 5 % плодной телячьей сыворотки в концентрации 10⁵ клеток на мл на поверхность для культивирования 80 см² и инкубируют при 37°C. Среда для выращивания заменяют каждые 4-5 дней. За ростом этой первичной культуры следят ежедневно путем наблюдения в микроскоп. При этом в особенности обращают внимание на появление цитопатогенного эффекта (ЦПЭ). Спустя примерно две недели можно обнаружить цитопатогенный эффект в форме округляющихся, сморщивающихся клеток с медленной тенденцией к распространению. Культуральную надосадочную жидкость первичных клеток разбавляют 1:10 поддерживающей средой и инфицируют слившийся монослой культурами РК-15 клеток на поверхности культуры 80 см² (инкубационный объем: 40 мл). Для контроля от каждой клетки оставляют неинфицированную культуру. После инкубации в течение 7 дней развивается цитопатогенный эффект с начинающимся перфорированием. Культуру подвергают процессу замораживания-оттаивания и инфицируют надосадочную жидкость, разбавленную в соотношении 1:10 свежей культурой, эту надосадочную жидкость спустя 6-7 дней исследуют в тесте на гемагглютинацию при применении куриных эритроцитов. В четвертом пассаже после инкубации в течение 6 дней, обнаруживают культуры примерно со 100 %-ным цитопатогенным эффектом. Положительные в тесте на гемагглютинацию надосадочные культуральные жидкости хранят при -70°C.

Пример 2

Размножение парагриппозного изолята "SER"

Материал: парагриппозный для 100 л

изолят "SER", базисный посевной материал Клетки РК-15 (клонированные клетки почек свиней, ATCC № CCL33) минимальная необходимая среда Игла с солями Эрле (E-MEM) порошок E-MEM с феноловым красным (например. Гибко БРЛ 072-0110)

заменимые аминокислоты, готовый раствор, 100-кратное разбавление 1000 мл

неомицинсульфат 3 г

полимиксин-Б-сульфат 3 МЕ

очищенная вода (EP 8) до 100 л

плодная телячья сыворотка (ПТС, например. Гибко БРЛ 012-06290)

среда для выращивания: Е-МЕМ с 2,0 г/л гидрокарбоната натрия и 2 % ПТС

поддерживающая среда: Е-МЕМ с 0,85 г/л гидрокарбоната натрия и 5 % ПТС

поверхность тканевой культуры 80 см² (Паукс - поверхность, например, Грейнер 658 170)

ванный штабель, 6000 см² (например, Нунк 164 327) Методика:

Среду для выращивания декантируют с поверхности тканевой культуры, обросшей конфлюэнтно клетками РК-15 и поверхность тканевой культуры покрывают 40 мл базисного посевного вирусного материала, разбавленного в среде для получения 1:50. После инкубации в течение 7 дней при 37°C подвергнутое процессу замораживания - оттаивания и суспендированное с помощью ультразвука содержимое поверхности тканевой культуры дополняют поддерживающей средой до объема 3000 мл и инфицируют конфлюэнтно обросший клетками РК-15 ванный штабель. После инкубации в течение 7 дней при 37°C надосадочную культуральную жидкость собирают и хранят при -70°C вплоть до дальнейшей переработки.

Пример 3

Приготовление убитой вакцины (парагриппозный изолят "SER")

Материал:

Парагриппозный изолят "SER", надосадочная жидкость культуры клеток из процесса размножения вируса

0,5 М готовый раствор 2-бромметиламин-гидробромида:

2-бромметиламин-гидробромид (BrCH₂CH₂NH₂HBr, Мерк 820176) 102,5 г

очищенная вода (EP 8) до 1000 мл

2,5 М готовый раствор тиосульфата натрия: пентагидрат тиосульфата натрия (EP 414) 620,5 г

очищенная вода (EP 8) до 1000 мл

3 %-ная суспензия гидроксида алюминия (например, Суперфос)

1 %-ный готовый раствор Квил А:

Квил А (например, Суперфос) 10,0 г

очищенная вода (EP 8) до 1000 мл

2 %-ный готовый раствор тимеросала тимеросал (C₉H₉HgNaO₂S) 50,0 г

очищенная вода (EP 8) до 1000 мл

буферированный фосфатом раствор хлорида натрия:

хлорид натрия 8,0 г

хлорид калия 0,2 г

дигидрофосфат калия 0,2 г

динатрийгидрофосфат с 12 молекулами воды 2,9 г

очищенная вода (EP 8) до 1000 мл

Надосадочную жидкость размноженного на культурах клеток вируса освобождают от клеток и остатков клеток путем центрифугирования при 10000 g. Таким образом очищенную вирусную суспензию с концентрацией вирусных частиц 10^{6,0} КИД₅₀/мл, происходящих из одного или несколь-

ких сборов вирусов, переносят в стерильный сосуд. Устанавливают pH-значение равным 8,4 с помощью 2н раствора гидроксида натрия. При постоянном перемешивании добавляют такое количество 0,5 М раствора 2-бромметиламин-гидробромида, чтобы достичь конечной концентрации 2-бромметиламин-гидробромида, равной 5 ммоль/л. Инактивацию вируса осуществляют в течение 18 часов при 37°C. Затем инактивирующий агент нейтрализуют при 4°C путем добавки 2,5 М раствора тиосульфата натрия вплоть до конечной концентрации 50 ммоль/л.

К 31 мл стерильной суспензии гидроксида алюминия (3 % гидроксида алюминия, pH = 7,3) добавляют 62 мл инактивированной вирусной суспензии и перемешивают в течение 2 часов при 4°C. После добавки 1,25 мл Квила А (2 %-ный раствор) и 0,1 мл Тимеросала (2 %-ный раствор) дополняют до 100 мл с помощью буферированного фосфатом раствора хлорида натрия и перемешивают следующие 20 часов при 4°C. Готовой вакциной заполняют емкости, включающие многократные дозы вакцины, и хранят при 4°C.

Вакцинацию свиней всех возрастов проводят путем подкожного введения 2 мл этой вакцины.

Публикации, относящиеся к нуклеотидным последовательностям, которые кодируют иммуногены обезьяньего вируса 5:

Hiebert, S.W., Paterson, R.G. and Lamb, R.A. (1985). Hemagglutinin-neuraminidase protein of the paramyxovirus simian virus 5: nucleotide sequence of the mRNA predicts a N-terminal membrane anchor. *Journal of Virology*, 54, 1-6.

Hiebert, S.W., Paterson, R.G. and Lamb, R.A. (1985). Identification and predicted sequence of a previously unrecognized small hydrophobic protein, SH, of the paramyxovirus simian virus 5. *Journal of Virology*, 55, 744 - 751.

Paterson, R.G., Harris, T.J.R. and Lamb, R.A. (1984). Analysis and gene assignment of mRNAs of a paramyxovirus, simian virus 5. *Virology*, 138, 310 - 323.

Paterson, R.G., Harris, T.J.R. and Lamb, R.A. (1984). Fusion protein of the paramyxovirus simian virus 5: nucleotide sequence of the mRNA predicts a highly hydrophobic glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6706 - 6710.

Paterson, R.G., Hiebert, S.W. and Lamb, R.A. (1985). Expression at the cell surface of biologically active fusion and hemagglutinin/neuraminidase proteins of the paramyxovirus simian virus 5 from cloned cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7520 - 7524.

Thomas, S., Lamb, R.A. and Paterson, R.G. (1988). Two mRNAs that differ by two nontemplated nucleotides encode the amino coterminal proteins P and V of the the paramyxovirus SV5. *Cell*, 54, 891 - 902.

Протокол последовательностей

(1) Общие сведения:

(I) Заявитель:

(а) фирма: Байер АГ

(б) улица: Байерверк

(в) город: Леверкузен

(г) страна: Германия

(д) почтовый индекс: D-51368

39

(е) телефон: 0214/30 66400
(ж) телефакс: 0214/30 3482
(з) телекс: 85 101-265 by d
(II) Название изобретения: Вакцина для предохранения свиньи от респираторных и репродуктивных заболеваний
(III) Количество последовательностей: 4
(IV) Редактор на компьютере:
(а) носитель данных: дискета
(б) компьютер: персональный компьютер, совместимый с машинами фирмы ИБМ
(в) операционная система: ПК-ДОС/МС-ДОС
(г) программное обеспечение: патентная редакция # 1.0, версия # 1.30 (ЕРА) (2) Сведения о

39975

40

последовательности № 1:
(I) Характеристики последовательности:
(а) длина: 1698 пар оснований
(б) тип: нуклеотид
(в) число нитей: однонитевая
(г) конфигурация: линейная
(II) Тип молекул: геномная ДНК
(III) Гипотетический тип: нет
(IX) Отличительный признак:
(а) название / код: С
(б) положение: 1.... 1695
(XI) Описание последовательности № 1:

41	39975	42
ATG GTT GCA GAA GAT GCC CCT GTT AGG GGC ACT TGC CGA GTA TTA TTT Met Val Ala Glu Asp Ala Pro Val Arg Gly Thr Cys Arg Val Leu Phe 1 5 10 15		48
CGA ACA ACA ACT TTA ATT TTT CTA TGC ACA CTA CTA GCA TTA AGC ATC Arg Thr Thr Thr Leu Ile Phe Leu Cys Thr Leu Leu Ala Leu Ser Ile 20 25 30		96
TCT ATC CTT TAT GAG AGT TTA ATA ACC CAA AAG CAA ATC ATG AGC CAC Ser Ile Leu Tyr Glu Ser Leu Ile Thr Gln Lys Gln Ile Met Ser His 35 40 45		144
GCA GGA TAC ACT CGA TCT AAT TCT AGA TTA GGA AGT ATC ACT GAT CTT Ala Gly Tyr Thr Arg Ser Asn Ser Arg Leu Gly Ser Ile Thr Asp Leu 50 55 60		192
CTT AAT AAT ATT CTC TCT GTC GCA AAT CAG ATT ATA TAT AAC TCT GCA Leu Asn Asn Ile Leu Ser Val Ala Asn Gln Ile Ile Tyr Asn Ser Ala 65 70 75 80		240
GTC.GCT CTA CCT CTA CAA TTG GAC ACT CTT GAA TCA ACA CTC CTT ACA Val Ala Leu Pro Leu Gln Leu Asp Thr Leu Glu Ser Thr Leu Leu Thr 85 90 95		288
GCC ATT AAG TCT CTT CAA ACC AGT GAC AAG CTA GAA CAG AAC TGC TCG Ala Ile Lys Ser Leu Gln Thr Ser Asp Lys Leu Glu Gln Asn Cys Ser 100 105 110		336
TGG GGT GCT GCA CTG ATT AAT AAT AAT AGA TAC ATT AAT GGC ATC AAT Trp Gly Ala Ala Leu Ile Asn Asn Asn Arg Tyr Ile Asn Gly Ile Asn 115 120 125		384
CAG TTC TAT TTT TCA ATT GCT GAG GGT CGC AAT CTG ACA CTT GGC CCA Gln Phe Tyr Phe Ser Ile Ala Glu Gly Arg Asn Leu Thr Leu Gly Pro 130 135 140		432
CTT CTT AAT ATA CCT AGT TTC ATT CCA ACT GCC ACG ACA CCA GAG GGC Leu Leu Asn Ile Pro Ser Phe Ile Pro Thr Ala Thr Thr Pro Glu Gly 145 150 155 160		480
TGC ACC AGG ATC CCA TCA TTC TCG CTC ACC AAG ACA CAC TGG TOT TAT Cys Thr Arg Ile Pro Ser Phe Ser Leu Thr Lys Thr His Trp Cys Tyr 165 170 175		528
ACA CAC AAT GTT ATC CTG AAT GGA TGC CAG GAT CAT GTA TCC TCA AAT Thr His Asn Val Ile Leu Asn Gly Cys Gln Asp His Val Ser Ser Asn 180 185 190		576
CAA TTT GTT TCC ATG GGA ATC ATT GAA CCC ACT TCT GCC GGG TTT CCA Gln Phe Val Ser Met Gly Ile Ile Glu Pro Thr Ser Ala Gly Phe Pro 195 200 205		624
TCC TTT CGA ACC CTA AAG ACT CTA TAT CTC AGC GAT GGG GTC AAT CGT Ser Phe Arg Thr Leu Lys Thr Leu Tyr Leu Ser Asp Gly Val Asn Arg 210 215 220		672
AAG AGC TGC TCT ATC AGT ACA GTT CCG GGG GGT TOT ATG ATG TAC TOT Lys Ser Cys Ser Ile Ser Thr Val Pro Gly Gly Cys Met Met Tyr Cys 225 230 235 240		720

TTT GTC TCT ACT CAA CCA GAG AGG GAT GAC TAC TTT TCT ACC GCT CCT Phe Val Ser Thr Gln Pro Glu Arg Asp Asp Tyr Phe Ser Thr Ala Pro 245 250 255	768
CCA GAA CAA CGA ATT ATT ATA ATG TAC TAT AAT GAT ACA ATC GTG GAG Pro Glu Gln Arg Ile Ile Ile Met Tyr Tyr Asn Asp Thr Ile Val Glu 260 265 270	816
CGC ATA ATT AAT CCA CCC GGG GTA CTA GAT GTA TGG GCA ACA TTG ACC Arg Ile Ile Asn Pro Pro Gly Val Leu Asp Val Trp Ala Thr Leu Thr 275 280 285	864
CCA GGA ACA GGA AGC GGG GTA TAT TAT TTA GGT TGG GTG CTC TTT CCA Pro Gly Thr Gly Ser Gly Val Tyr Tyr Leu Gly Trp Val Leu Phe Pro 290 295 300	912
ATA TAT GGC GGC GTG ATT AAA GAT ACG AGT TTA TGG AAT AAT CAA GCA Ile Tyr Gly Gly Val Ile Lys Asp Thr Ser Leu Trp Asn Asn Gln Ala 305 310 315 320	960
AAT AAA TAC TTT ATC CCC CAG ATG GTT GCT GCT CTC TGC TCA CAA AAC Asn Lys Tyr Phe Ile Pro Gln Met Val Ala Ala Leu Cys Ser Gln Asn 325 330 335	1008
CAG GCA ACT CAA GTC CAA AAT GCT AAG TCA TCA TAC TAT AGC AGC TGG Gln Ala Thr Gln Val Gln Asn Ala Lys Ser Ser Tyr Tyr Ser Ser Trp 340 345 350	1056
TTT GGC AAT CGA ATG ATT CAG TCT GGG ATC CTG GCA TGT CCT CTT CAA Phe Gly Asn Arg Met Ile Gln Ser Gly Ile Leu Ala Cys Pro Leu Gln 355 360 365	1104
CAG GAT CTA ACC AAT GAG TGT TTA GTT CTG CCC TTT TCT AAT GAT CAG Gln Asp Leu Thr Asn Glu Cys Leu Val Leu Pro Phe Ser Asn Asp Gln 370 375 380	1152
GTG CTT ATG GGT GCT GAA GGG AGA TTA TAC ATG TAT GGT GAC TCG GTG Val Leu Met Gly Ala Glu Gly Arg Leu Tyr Met Tyr Gly Asp Ser Val 385 390 395 400	1200
TAT TAC TAC CAA AGA AGC AAT AGT TGG TGG CCT ATG ACC ATG CTG TAT Tyr Tyr Tyr Gln Arg Ser Asn Ser Trp Trp Pro Met Thr Met Leu Tyr 405 410 415	1248
AAG GTA ACC ATA ACA TTC ACT AAT GGT CAG CCA TCT GCT ATA TCA GCT Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Asn Gly Gln Pro Ser Ala Ile Ser Ala 420 425 430	1296
CAG AAT GTG CCC ACA CAG CAG GTC CCT AGA CCT GGG ACA GGA GCC TGC Gln Asn Val Pro Thr Gln Gln Val Pro Arg Pro Gly Thr Gly Ala Cys 435 440 445	1344
TCT GCA ACA AAT AGA TGT CCC GGT TTT TGC TTG AAA GGA GTG TAT GCT Ser Ala Thr Asn Arg Cys Pro Gly Phe Cys Leu Lys Gly Val Tyr Ala 450 455 460	1392
GAT GCC TGG TTA CTG ACC AAC CCT TCG TCT ACC AGT ACA TTT GGA TCA Asp Ala Trp Leu Leu Thr Asn Pro Ser Ser Thr Ser Thr Phe Gly Ser 465 470 475 480	1440
GAA GCA ACC TTC ACT GGT TCT TAT CTC AAC GCA GCA ACT CAG CGT ATC Glu Ala Thr Phe Thr Gly Ser Tyr Leu Asn Ala Ala Thr Gln Arg Ile 485 490 495	1488
AAT CCG ACG ATG TAT ATC GCG AAC AAC ACA CAG ATC ATA AGC TCA CAG Asn Pro Thr Met Tyr Ile Ala Asn Asn Thr Gln Ile Ile Ser Ser Gln 500 505 510	1536
CAA TTT GGA TCA AGC GGT CAA GAA GCA GCA TAT AGC CAC ACA ACT TGT Gln Phe Gly Ser Ser Gly Gln Glu Ala Ala Tyr Ser His Thr Thr Cys 515 520 525	1584
TTT AGG GAC ACA GGC TCT GTT ATG GTA TAC TGT CTC TAT ATT ATT GAA Phe Arg Asp Thr Gly Ser Val Met Val Tyr Cys Leu Tyr Ile Ile Glu 530 535 540	1632
TTG TCC TCA TCT CTC TTA GGA CAA TTT CAG ATT GTC CCA TTT ATC CGT Leu Ser Ser Ser Leu Leu Gly Gln Phe Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg 545 550 555 560	1680
CAG GTG ACA CTA TCC TAA Gln Val Thr Leu Ser 565	1698

(2) Сведения о последовательности № 2:

(I) Характеристики последовательности:

(a) длина: 565 аминокислот

(б) тип: аминокислота

(г) конфигурация: линейная

(II) Тип молекул: протеин

(XI) Описание последовательности № 2:

Met Val Ala Glu Asp Ala Pro Val Arg Gly Thr Cys Arg Val Leu Phe
1 5 10 15

Arg Thr Thr Thr Leu Ile Phe Leu Cys Thr Leu Leu Ala Leu Ser Ile
20 25 30

Ser Ile Leu Tyr Glu Ser Leu Ile Thr Gln Lys Gln Ile Met Ser His
35 40 45

Ala Gly Tyr Thr Arg Ser Asn Ser Arg Leu Gly Ser Ile Thr Asp Leu
50 55 60

Leu Asn Asn Ile Leu Ser Val Ala Asn Gln Ile Ile Tyr Asn Ser Ala
65 70 75 80

Val Ala Leu Pro Leu Gln Leu Asp Thr Leu Glu Ser Thr Leu Leu Thr
85 90 95

Ala Ile Lys Ser Leu Gln Thr Ser Asp Lys Leu Glu Gln Asn Cys Ser
100 105 110

Trp Gly Ala Ala Leu Ile Asn Asn Asn Arg Tyr Ile Asn Gly Ile Asn
115 120 125

Gln Phe Tyr Phe Ser Ile Ala Glu Gly Arg Asn Leu Thr Leu Gly Pro
130 135 140

Leu Leu Asn Ile Pro Ser Phe Ile Pro Thr Ala Thr Thr Pro Glu Gly
145 150 155 160

Cys Thr Arg Ile Pro Ser Phe Ser Leu Thr Lys Thr His Trp Cys Tyr
165 170 175

Thr His Asn Val Ile Leu Asn Gly Cys Gln Asp His Val Ser Ser Asn
180 185 190

Gln Phe Val Ser Met Gly Ile Ile Glu Pro Thr Ser Ala Gly Phe Pro
195 200 205

Ser Phe Arg Thr Leu Lys Thr Leu Tyr Leu Ser Asp Gly Val Asn Arg
210 215 220

Lys Ser Cys Ser Ile Ser Thr Val Pro Gly Gly Cys Met Met Tyr Cys
225 230 235 240

Phe Val Ser Thr Gln Pro Glu Arg Asp Asp Tyr Phe Ser Thr Ala Pro
245 250 255

Pro Glu Gln Arg Ile Ile Ile Met Tyr Tyr Asn Asp Thr Ile Val Glu
260 265 270

47 39975 48

Arg Ile Ile Asn Pro Pro Gly Val Leu Asp Val Trp Ala Thr Leu Thr
275 280 285

Pro Gly Thr Gly Ser Gly Val Tyr Tyr Leu Gly Trp Val Leu Phe Pro
290 295 300

Ile Tyr Gly Gly Val Ile Lys Asp Thr Ser Leu Trp Asn Asn Gln Ala
305 310 315 320

Asn Lys Tyr Phe Ile Pro Gln Met Val Ala Ala Leu Cys Ser Gln Asn
325 330 335

Gln Ala Thr Gln Val Gln Asn Ala Lys Ser Ser Tyr Tyr Ser Ser Trp
340 345 350

Phe Gly Asn Arg Met Ile Gln Ser Gly Ile Leu Ala Cys Pro Leu Gln
355 360 365

Gln Asp Leu Thr Asn Glu Cys Leu Val Leu Pro Phe Ser Asn Asp Gln
370 375 380

Val Leu Met Gly Ala Glu Gly Arg Leu Tyr Met Tyr Gly Asp Ser Val
385 390 395 400

Tyr Tyr Tyr Gln Arg Ser Asn Ser Trp Trp Pro Met Thr Met Leu Tyr
405 410 415

Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Asn Gly Gln Pro Ser Ala Ile Ser Ala
420 425 430

Gln Asn Val Pro Thr Gln Gln Val Pro Arg Pro Gly Thr Gly Ala Cys
435 440 445

Ser Ala Thr Asn Arg Cys Pro Gly Phe Cys Leu Lys Gly Val Tyr Ala
450 455 460

Asp Ala Trp Leu Leu Thr Asn Pro Ser Ser Thr Ser Thr Phe Gly Ser
465 470 475 480

Glu Ala Thr Phe Thr Gly Ser Tyr Leu Asn Ala Ala Thr Gln Arg Ile
485 490 495

Asn Pro Thr Met Tyr Ile Ala Asn Asn Thr Gln Ile Ile Ser Ser Gln
500 505 510

Gln Phe Gly Ser Ser Gly Gln Glu Ala Ala Tyr Ser His Thr Thr Cys
515 520 525

Phe Arg Asp Thr Gly Ser Val Met Val Tyr Cys Leu Tyr Ile Ile Glu
530 535 540

Leu Ser Ser Ser Leu Leu Gly Gln Phe Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
545 550 555 560

Gln Val Thr Leu Ser
565

(2) Сведения о последовательности № 3:

(I) Характеристики последовательности:

(а) длина: 1656 пар оснований

(б) тип: нуклеотид

(в) число нитей: однонитевая

(г) конфигурация: линейная

(II) Тип молекул: геномная ДНК

(III) Гипотетический тип: нет

(IX) Отличительный признак:

(а) название / код: C

(б) положение: 1.... 1653

(XI) Описание последовательности № 3:

ATG GGT ACT ATA ATT CAA TTT CTG GTG GTC TCC TGT CTA TTG GCA GGA Met Gly Thr Ile Ile Gln Phe Leu Val Val Ser Cys Leu Leu Ala Gly 570 575 580	48
GCA GGC AGC CCT GAT CCA GCA GCC CTC ATG CAA ATC GGT GTC ATT CCA Ala Gly Ser Pro Asp Pro Ala Ala Leu Met Gln Ile Gly Val Ile Pro 585 590 595	96
ACA AAT GTC CGG CAA CTT ATG TAT TAT ACT GAG GCC TCA TCA GCA TTC Thr Asn Val Arg Gln Leu Met Tyr Tyr Thr Glu Ala Ser Ser Ala Phe 600 605 610	144
ATT GTT GTG AAG TTA ATG CCT ACA ATT GAC TCG CCG ATT AGT GGA TGT Ile Val Val Lys Leu Met Pro Thr Ile Asp Ser Pro Ile Ser Gly Cys 615 620 625	192
AAT ATA ACA TCA ATT TCA AGC TAT AAT GCA ACA CTG ACA AAA CTC CTA Asn Ile Thr Ser Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Thr Leu Thr Lys Leu Leu 630 635 640 645	240
CAG CCG ATC GGT GAG AAT TTG GAA ACG ATT AGG AAC CAG TTG ATT CCA Gln Pro Ile Gly Glu Asn Leu Glu Thr Ile Arg Asn Gln Leu Ile Pro 650 655 660	288
ACT CGG AGG AGA CGC CGG TTT GCA GGG GTG GTG ATT GGA TTA GCT GCA Thr Arg Arg Arg Arg Phe Ala Gly Val Val Ile Gly Leu Ala Ala 665 670 675	336
TTA GGA GTA GCT ACT GCC GCA CAG GTC ACT GCC GCA GTA GCA CTA GTA Leu Gly Val Ala Thr Ala Ala Gln Val Thr Ala Ala Val Ala Leu Val 680 685 690	384
AAG GCA AAT AAA AAT GCT GCG GCT ATA CTC AAT CTC AAA AAT GCA ATC Lys Ala Asn Lys Asn Ala Ala Ala Ile Leu Asn Leu Lys Asn Ala Ile 695 700 705	432
CAA AAA ACA AAT ACA GCA GTT GCA GAT GTG GTC CAG GCC ACA CAA TCA Gln Lys Thr Asn Thr Ala Val Ala Asp Val Val Gln Ala Thr Gln Ser 710 715 720 725	480
CTA GGA ACG GCA GTT CAA GCA GTT CAA GAT CAC ATA AAC AGT GTG GTA Leu Gly Thr Ala Val Gln Ala Val Gln Asp His Ile Asn Ser Val Val 730 735 740	528
AGT CCA GCA ATT ACA GCA GCC AAT TGT AAG GCC CAA GAT GCT ATC ATT Ser Pro Ala Ile Thr Ala Ala Asn Cys Lys Ala Gln Asp Ala Ile Ile 745 750 755	576
GGC TCA ATC CTC AAT CTC TAT TTG ACC GAG TTG ACA ACT ATC TTC CAC Gly Ser Ile Leu Asn Leu Tyr Leu Thr Glu Leu Thr Thr Ile Phe His 760 765 770	624
AAT CAA ATT ACA AAC CCT GCA TTG AGT CCT ATT ACA ATT CAA GCT TTA Asn Gln Ile Thr Asn Pro Ala Leu Ser Pro Ile Thr Ile Gln Ala Leu 775 780 785	672
AGG ATC CTA CTG GGG AGT ACC TTG CCG ACT GTG GTC GAA AAA TCT TTC Arg Ile Leu Leu Gly Ser Thr Leu Pro Thr Val Val Glu Lys Ser Phe 790 795 800 805	720
AAT ACC CAG ATA AGT GCA GCT GAG CTT CTC TCA TCA GGG TTA TTG ACA Asn Thr Gln Ile Ser Ala Ala Glu Leu Leu Ser Ser Gly Leu Leu Thr 810 815 820	768
GGC CAG ATT GTG GGA TTA GAT TTG ACC TAT ATG CAG ATG GTC ATA AAA Gly Gln Ile Val Gly Leu Asp Leu Thr Tyr Met Gln Met Val Ile Lys 825 830 835	816
ATT GAG CTG CCA ACT TTA ACT GTA CAA CCT GCA ACC CAG ATC ATA GAT Ile Glu Leu Pro Thr Leu Thr Val Gln Pro Ala Thr Gln Ile Ile Asp 840 845 850	864

51	39975	52
CTG GCC ACC ATT TCT GCA TTC ATT AAC AAT CAA GAA GTC ATG GCC CAA Leu Ala Thr Ile Ser Ala Phe Ile Asn Asn Gln Glu Val Met Ala Gln 855 860 865		912
TTA CCA ACA CGT GTT ATG GTG ACT GGC AGC TTG ATC CAA GCC TAT CCC Leu Pro Thr Arg Val Met Val Thr Gly Ser Leu Ile Gln Ala Tyr Pro 870 875 880 885		960
GCA TCG CAA TGC ACT ATT ACA CCC AAC ACT GTG TAC TGT AGG TAT AAT Ala Ser Gln Cys Thr Ile Thr Pro Asn Thr Val Tyr Cys Arg Tyr Asn 890 895 900		1008
GAT GCC CAA GTA CTC TCA GAT GAT ACG ATG GCT TGC CTC CAA GGT AAC Asp Ala Gln Val Leu Ser Asp Asp Thr Met Ala Cys Leu Gln Gly Asn 905 910 915		1056
TTG ACA AGA TGC ACC TTC TCT CCG GTG GTT GGG AGC TTT CTC ACT CGA Leu Thr Arg Cys Thr Phe Ser Pro Val Val Gly Ser Phe Leu Thr Arg 920 925 930		1104
TTC ATG CTG TTC GAT GGA ATA GTT TAT GCA AAT TGC AGG TCG ATG TTA Phe Met Leu Phe Asp Gly Ile Val Tyr Ala Asn Cys Arg Ser Met Leu 935 940 945		1152
TCC AAG TGC ATG CAG CCT GCT GCT GTG ATC CTA CAG CCG AGT TCA TCC Cys Lys Cys Met Gln Pro Ala Ala Val Ile Leu Gln Pro Ser Ser Ser 950 955 960 965		1200
CCT GTA ACT GTC ATT GAC ATG TAC AAA TGT GTG AGT CTG CAG CTT GAC Pro Val Thr Val Ile Asp Met Tyr Lys Cys Val Ser Leu Gln Leu Asp 970 975 980		1248
AAT CTC AGA TTC ACC ATC ACT CAA TTG GCC AAT GTA ACC TAC AAT AGC Asn Leu Arg Phe Thr Ile Thr Gln Leu Ala Asn Val Thr Tyr Asn Ser 985 990 995		1296
ACC ATC AAG CTT GAA ACA TCC CAG ATC TTG CCT ATT GAT CCG TTG GAT Thr Ile Lys Leu Glu Thr Ser Gln Ile Leu Pro Ile Asp Pro Leu Asp 1000 1005 1010		1344
ATA TCC CAG AAT CTA GCT GCG GTG AAT AAG AGT CTA AGT GAT GCA CTA Ile Ser Gln Asn Leu Ala Ala Val Asn Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu 1015 1020 1025		1392
CAA CAC TTA GCA CAA AGT GAC ACA TAC CTT TCT GCA ATC ACA TCA GCT Gln His Leu Ala Gln Ser Asp Thr Tyr Leu Ser Ala Ile Thr Ser Ala 1030 1035 1040 1045		1440
ACG ACT ACA AGT GTA TTA TCC ATA ATG GCA ATC TGT CTT GGA TCG TTA Thr Thr Thr Ser Val Leu Ser Ile Met Ala Ile Cys Leu Gly Ser Leu 1050 1055 1060		1488
GGT TTA ATA TTA ATA ATC TTG CTC AGT GTA GTT GTG TCG AAG TTA TTG Gly Leu Ile Leu Ile Ile Leu Leu Ser Val Val Val Trp Lys Leu Leu 1065 1070 1075		1536
ACC ATT GTC ACT GCT AAT CGA AAT AGA ATG GAG AAT TTT GTT TAT CAT Thr Ile Val Thr Ala Asn Arg Asn Arg Met Glu Asn Phe Val Tyr His 1080 1085 1090		1584
AAT TCA GCA TTC CAC CAC TCA CGA TCT GAT CTC AGT GAG AAA AAT CAA Asn Ser Ala Phe His His Ser Arg Ser Asp Leu Ser Glu Lys Asn Gln 1095 1100 1105		1632
CCT GCA ACT CTT GGA ACA AGA TAA Pro Ala Thr Leu Gly Thr Arg 1110 1115		1656

(2) Сведения о последовательности № 4:

(I) Характеристики последовательности:

(а) длина: 551 аминокислота

(б) тип: аминокислота

(г) конфигурация: линейная

(II) Тип молекул: протеин

(XI) Описание последовательности № 4:

53

39975

54

Met Gly Thr Ile Ile Gln Phe Leu Val Val Ser Cys Leu Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Ala Gly Ser Pro Asp Pro Ala Ala Leu Met Gln Ile Gly Val Ile Pro
 20 25 30
 Thr Asn Val Arg Gln Leu Met Tyr Tyr Thr Glu Ala Ser Ser Ala Phe
 35 40 45
 Ile Val Val Lys Leu Met Pro Thr Ile Asp Ser Pro Ile Ser Gly Cys
 50 55 60
 Asn Ile Thr Ser Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Thr Leu Thr Lys Leu Leu
 65 70 75 80
 Gln Pro Ile Gly Glu Asn Leu Glu Thr Ile Arg Asn Gln Leu Ile Pro
 85 90 95
 Thr Arg Arg Arg Arg Phe Ala Gly Val Val Ile Gly Leu Ala Ala
 100 105 110
 Leu Gly Val Ala Thr Ala Ala Gln Val Thr Ala Ala Val Ala Leu Val
 115 120 125
 Lys Ala Asn Lys Asn Ala Ala Ala Ile Leu Asn Leu Lys Asn Ala Ile
 130 135 140
 Gln Lys Thr Asn Thr Ala Val Ala Asp Val Val Gln Ala Thr Gln Ser
 145 150 155 160
 Leu Gly Thr Ala Val Gln Ala Val Gln Asp His Ile Asn Ser Val Val
 165 170 175
 Ser Pro Ala Ile Thr Ala Ala Asn Cys Lys Ala Gln Asp Ala Ile Ile
 180 185 190
 Gly Ser Ile Leu Asn Leu Tyr Leu Thr Glu Leu Thr Thr Ile Phe His
 195 200 205
 Asn Gln Ile Thr Asn Pro Ala Leu Ser Pro Ile Thr Ile Gln Ala Leu
 210 215 220
 Arg Ile Leu Leu Gly Ser Thr Leu Pro Thr Val Val Glu Lys Ser Phe
 225 230 235 240
 Asn Thr Gln Ile Ser Ala Ala Glu Leu Leu Ser Ser Gly Leu Leu Thr
 245 250 255
 Gly Gln Ile Val Gly Leu Asp Leu Thr Tyr Met Gln Met Val Ile Lys
 260 265 270
 Ile Glu Leu Pro Thr Leu Thr Val Gln Pro Ala Thr Gln Ile Ile Asp
 275 280 285
 Leu Ala Thr Ile Ser Ala Phe Ile Asn Asn Gln Glu Val Met Ala Gln
 290 295 300
 Leu Pro Thr Arg Val Met Val Thr Gly Ser Leu Ile Gln Ala Tyr Pro
 305 310 315 320
 Ala Ser Gln Cys Thr Ile Thr Pro Asn Thr Val Tyr Cys Arg Tyr Asn
 325 330 335

55 39975 56
 Asp Ala Gln Val Leu Ser Asp Asp Thr Met Ala Cys Leu Gln Gly Asn
 340 345 350
 Leu Thr Arg Cys Thr Phe Ser Pro Val Val Gly Ser Phe Leu Thr Arg
 355 360 365
 Phe Met Leu Phe Asp Gly Ile Val Tyr Ala Asn Cys Arg Ser Met Leu
 370 375 380
 Cys Lys Cys Met Gln Pro Ala Ala Val Ile Leu Gln Pro Ser Ser Ser
 385 390 395 400
 Pro Val Thr Val Ile Asp Met Tyr Lys Cys Val Ser Leu Gln Leu Asp
 405 410 415
 Asn Leu Arg Phe Thr Ile Thr Gln Leu Ala Asn Val Thr Tyr Asn Ser
 420 425 430
 Thr Ile Lys Leu Glu Thr Ser Gln Ile Leu Pro Ile Asp Pro Leu Asp
 435 440 445
 Ile Ser Gln Asn Leu Ala Ala Val Asn Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu
 450 455 460
 Gln His Leu Ala Gln Ser Asp Thr Tyr Leu Ser Ala Ile Thr Ser Ala
 465 470 475 480
 Thr Thr Thr Ser Val Leu Ser Ile Met Ala Ile Cys Leu Gly Ser Leu
 485 490 495
 Gly Leu Ile Leu Ile Ile Leu Leu Ser Val Val Val Trp Lys Leu Leu
 500 505 510
 Thr Ile Val Thr Ala Asn Arg Asn Arg Met Glu Asn Phe Val Tyr His
 515 520 525
 Asn Ser Ala Phe His His Ser Arg Ser Asp Leu Ser Glu Lys Asn Gln
 530 535 540
 Pro Ala Thr Leu Gly Thr Arg
 545 550

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
 Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
 (044) 456-20-90

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60x84 1/8.
 Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
 (044) 268-25-22
