



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110195** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2011 14035	(72) Винахідник(и):	Шон Пітер Йозеф (NL/BE), Керстен Александер Жерон (NL), Медема Жерон Крістіаан (NL/US), Тус Йоханнес Ламбертус Герардус (NL)
(22) Дата подання заявки:	26.05.2010	(73) Власник(и):	ЕББОТТ БІОЛОДЖІКАЛС Б.В., С.І. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp, The Netherlands (NL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.12.2015	(74) Представник:	Шевеля Людмила Михайлівна, реєстр. №90
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	09161368.7, 61/181,835	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	EP 0236145 A, 09.09.1987 WO 03/072811 A, 04.09.2003 US 2004/053388 A1, 18.03.2004
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	28.05.2009, 28.05.2009		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.01.2012, Бюл.№ 2		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.12.2015, Бюл.№ 23		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2010/057221, 26.05.2010		

(54) ВИПРОБУВАННЯ НА СТОРОННІ АГЕНТИ

(57) Реферат:

Цей винахід стосується способу випробування на сторонні агенти композиції, яка містить принаймні одну діючу речовину, згідно з яким:

а) здійснюють контакт між антитілом, виробленим проти продукту експресії полінуклеотидного конструкту, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, з композицією, яка містить принаймні одну діючу речовину, причому антитіло прив'язується до діючої речовини,

б) визначають наявність або відсутність сторонніх агентів у композиції після стадії а) на тваринних моделях, причому в стадії а) на:

а-1) утворюють антитіло, вироблене проти продукту експресії полінуклеотидного конструкту, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, у якому зазначене антитіло утворюють імунізацією суб'єкта полінуклеотидним конструктом, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, та

а-2) здійснюють контакт між зазначеним антитілом та композицією, яка містить принаймні одну діючу речовину.

UA 110195 C2

Галузь техніки

Цей винахід стосується фармацевтичної промисловості, а саме способу випробування на сторонні агенти у композиції, яка містить принаймні одну діючу речовину, та способу одержання фармацевтичної композиції з застосуванням такого способу. Більш того, цей винахід також стосується застосування полінуклеотидного утворення для виявлення наявності або відсутності діючої речовини або будь-якого стороннього або інфікуючого агента у композиції, що піддається випробуванню. Далі, він стосується полінуклеотидів, полінуклеотидних утворень, які містять певні полінуклеотиди та клітини-хазяї з вмістом цих полінуклеотидів або полінуклеотидних утворень, придатних для приготування препаратів антигенів вірусів, зокрема, вірусу грипу. Також представлені нелюдські організми, трансгенні тварини або мікроорганізми, що містять такі полінуклеотиди та/або полінуклеотидні утворення. Також винахід стосується антитіла, специфічного до поліпептиду, закодованого таким полінуклеотидом, і способу вироблення такого антитіла, рівно як застосування такого антитіла, створеного проти продукту експресії полінуклеотидного утворення, для очищення діючої речовини. Нарешті, цей винахід охоплює набір компонентів.

Попередній рівень техніки

У фармацевтичній промисловості існує потреба вироблення композицій, які не містять забруднень, як от сторонні або занесені агенти, здатних спричинювати небажані бічні ефекти. Ця потреба особливо відчувається при виробленні вакцин. Відсутність сторонніх або занесених агентів може також бути умовою дозволу на застосування ліків.

Щоб гарантувати відсутність забруднень у композиціях, вони можуть проходити випробування на вміст таких забруднень.

Як правило, такі випробування можуть, наприклад, полягати у виявленні можливого стороннього забруднювача у складі композиції, причому за бажанням сторонній агент можна попередньо підсилювати.

Так, у WO 0172964 A2 описується кількісний ПЛР-метод одночасного виявлення та кількісного визначення життєздатного занесеного агента у пробі одержаних біологічним шляхом матеріалів. Згідно з цим способом вимірюють кількість полінуклеотиду в пробі із застосуванням полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР), інкубують пробу за умов, що дозволяють реплікацію цієї речовини, вимірюють кількість полінуклеотиду в пробі після періоду інкубації з застосуванням кількісної ПЛР та порівнюють кількість полінуклеотиду в пробі до та після інкубації. Збільшення кількості полінуклеотиду свідчить про присутність життєздатного агента у пробі.

За WO 20071100397 A2 розпізнають або визначають наявність або відсутність занесеного вірусного забруднювача у пробі шляхом контакту нуклеїнових кислот з проби з принаймні однією парою праймерів та визначають мас-спектрометрією молекулярну масу продукту ампліфікації.

Інша можливість полягає у нейтралізації діючої речовини, наявної у композиції, що випробується, до виявлення занесеного агента. Після нейтралізації діючої речовини нейтралізовану композицію додають до специфічної лінії клітин або випробовують на тваринних моделях. Так, у US 200410005546 A1 пропонується спосіб виявлення занесених агентів у композиції через реовірус, із застосуванням рибозиму, який специфічно розщеплює геном реовірусу, таким чином інактивуючи його. Плазмід, що кодує рибозим, вносять до клітин, вразливих на інфекцію реовірусу. Трансфектовані клітини завдяки експресії рибозому здатні інактивувати реовірус, а відтак, не будуть інфіковані ним. Далі на клітини з експресією рибозому діють композицією, яка містить реовірус, і будь-які патогенні явища, спричинені реовірусом, свідчитимуть про наявність занесеного агента. На по суті тому самому принципі будується винахід за WO 0307281 1 A2.

Також можна нейтралізувати діючу речовину в композиції за допомогою антитіла, специфічного для діючої речовини, як описується, наприклад, у Європейській Фармакопеї, розділ 2.6.16. Наприклад, якщо діючою речовиною є антиген вірусу вакцини, його можна нейтралізувати антисироваткою, яка містить антитіла, що специфічно прив'язуються до антигену. Для приготування антисироватки застосовується імунізуючий антиген, утворений у культурі клітин або іншій системі (наприклад, курячих яйцях з ембріонами) з виду, який відрізняється від того, що застосовується для вироблення вакцини, причому антиген є вільний від сторонніх речовин.

Однак, незважаючи на наведені способи проведення виявлення сторонніх речовин, й досі існує потреба у вдосконаленому способі випробувань, зокрема, у неспецифічній методиці випробувань з можливістю виявлення не вказаних заздалегідь інфекційних забруднень, а також у засобах проведення таких випробувань, а відтак у вдосконаленій системі вироблення фармацевтичних композицій, зокрема, вакцин.

Сутність винаходу

Цей винахід включає наступні об'єкти, які нарізно та разом сприяють досягненню мети винаходу:

5 (1) Спосіб випробування на сторонні агенти композиції, яка мстить принаймні одну діючу речовину, згідно з яким:

а) здійснюють контакт між антитілом, виробленим проти продукту експресії полінуклеотидного утворення, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, з композицією, яка містить принаймні одну діючу речовину, причому антитіло прив'язується до діючої речовини,

10 б) визначають наявність або відсутність сторонніх агентів у композиції після стадії а).

Переважно антитіло прив'язується специфічно до діючої речовини.

(2) Спосіб випробування на сторонні агенти композиції, яка містить принаймні одну діючу речовину, згідно з яким:

15 а) утворюють антитіло, вироблене проти продукту експресії полінуклеотидного утворення, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини,

б) здійснюють контакт між зазначеним антитілом та композицією, яка містить принаймні одну діючу речовину,

с) визначають наявність або відсутність сторонніх агентів у композиції після стадії б).

20 (3) Спосіб випробування на сторонні агенти композиції, яка містить принаймні одну діючу речовину, згідно з яким:

а) утворюють антитіло, вироблене шляхом імунізації суб'єкта полінуклеотидним утворенням,

б) здійснюють контакт між зазначеним антитілом та композицією, яка містить принаймні одну діючу речовину, причому антитіло прив'язується до діючої речовини,

с) визначають наявність або відсутність сторонніх агентів у композиції після стадії б).

25 (4) Спосіб за пп.(1) – (3), у якому діючу речовину нейтралізують або ін активують прив'язуванням, переважно специфічним прив'язуванням, антитіла до стадії

б) п. (1) або до стадії с) пп. (2) та (3).

Інакше кажучи, діючу речовину нейтралізують або інактивують прив'язуванням антитіла до стадії визначення наявності або відсутності сторонніх агентів у композиції.

30 (5) Спосіб за пп.(1) – (3), у якому на стадії визначення наявності або відсутності сторонніх агентів у композиції:

а) використовують тварину нелюдського виду, яка була інокульована, переважно імунізована, полінуклеотидним утворенням, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, та інокують цю тварину композицією, що випробується,

35 б) визначають частку тварин, які вижили після певного періоду часу, причому в разі, коли принаймні 80 % інокульованих тварин вижили й не показують ознак інфікування протягом зазначеного періоду часу, композицію вважають такою, що не містить сторонніх агентів, а коли виживають менше 80 % інокульованих тварин та/або принаймні одна тварина показала ознаки зараження за цей період, композицію вважають такою, що містить сторонні агенти.

40 (6) Спосіб за пп.(1) – (4), у якому на стадії визначення наявності або відсутності сторонніх агентів у композиції:

а) інокують тварину нелюдського виду композицією, яка підлягає випробуванню й містить нейтралізовану або інактивовану діючу речовину,

45 б) визначають частку тварин, які вижили після певного періоду часу, причому в разі, коли принаймні 80 % інокульованих тварин вижили й не показують ознак інфікування протягом зазначеного періоду часу, композицію вважають такою, що не містить сторонніх агентів, а коли виживають менше 80 % інокульованих тварин та/або принаймні одна тварина показала ознаки зараження за цей період, композицію вважають такою, що містить сторонні агенти.

50 Стадія визначення наявності або відсутності сторонніх агентів у композиції, що підлягає випробуванню, може займати, наприклад, дві доби. Одна можливість полягає в тому, щоб нейтралізувати діючу речовину, наявну в композиції, що підлягає випробуванню, до інокулювання композицією дослідного організму, тобто тварини нелюдського виду (див., наприклад, п. (6)). Цю нейтралізацію здійснюють *in vitro*, тобто поза дослідним організмом. Дослідний організм інокують композицією, яка підлягає випробуванню, після того, як вона була нейтралізована. Існує інша можливість (див., наприклад, п. (5)), коли стадію нейтралізації здійснюють *in situ*, тобто у самому дослідному організмі. При цьому дослідний організм активно імунізують полінуклеотидним утворенням, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини. Таким чином організм виробляє антитіла, спрямовані проти принаймні частини діючої речовини. Тільки-но дослідний організм інокують композицією, яка підлягає

60 випробуванню (й містить ще не нейтралізовану діючу речовину), ці антитіла, у свою чергу,

здатні нейтралізувати діючу речовину. Отже, визначення наявності або відсутності сторонніх агентів у композиції, яка підлягає випробуванню, можна здійснювати у самому дослідному організмі, й стадія нейтралізації діючої речовини *in vitro* стає непотрібною. Це суттєво скорочує час, потрібний для проведення випробувань, кількість дослідних організмів і підвищує надійність та безпечність випробувань

(7) Спосіб за пп. (5) Або (6), у якому тварин нелюдського виду обирають з-поміж дорослих мишей,

сисунців мишей та морських свинок, а частку тварин, що вижили, та наявність ознак інфекції визначають після періоду принаймні 7-10 днів, краще 21 дня після інокуляції композицією, яка підлягає випробуванню, якщо інокульованими тваринами були дорослі миші, після періоду 14 днів після інокуляції композицією, яка підлягає випробуванню, якщо інокульованими тваринами були сисунці мишей, і після періоду принаймні 42 днів після інокуляції композицією, яка підлягає випробуванню, якщо інокульованими тваринами були морські свинки.

(8) Спосіб за пп. (5) - (7), у якому інокуляцію композицією, яка підлягає випробуванню, проводять внутрішньочеребрально та/або внутрішньочеревно.

(9) Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому стадію визначення наявності або відсутності сторонніх агентів у композиції здійснюють у відповідності до нормативних документів, переважно у відповідності до Європейської Фармакопеї, 2005, розділ 2.6.16.

(10) Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому композицією, яка підлягає випробуванню, є проба клітинної культури, з якої виробляють діючу речовину, або продукт, одержаний із зазначеної клітинної культури.

Більш того, композицією, яка підлягає випробуванню, цілком може бути вірус-затравка або композиція, що його містить. Під вірусом-затравкою у цьому винаході розуміють вірус, призначений для вироблення антигену або вакцини. Наприклад, вірус-затравка може бути генетично змінений, щоб зробити його безпечним і щоб його можна було вирощувати у клітинній культурі або у яйцях.

(11) Спосіб за будь-яким з пп. (1) - (10), у якому композиція являє собою фармацевтичну композицію, переважно препарат вакцини або його проміжний продукт.

(12) Спосіб за будь-яким з пп. (1) - (11), у якому діючою речовиною є антиген, переважно інактивованій або ослаблений вірус, краще вірусний антиген, наприклад, розщеплений вірусний антиген, субодиничний вірусний антиген або вірусом, або ж діючою речовиною є принаймні один компонент вірусу чи частинка вірусу, найкраще діючою речовиною є частка вірусу грипу.

(13) Спосіб за будь-яким з пп. (1) - (12), у якому діючою речовиною є антиген, закодований полінуклеотидною послідовністю.

(14) Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому антитіло одержують імунізацією суб'єкта полінуклеотидним утворенням.

(15) Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому антитіло та діючу речовину одержують з різних полінуклеотидних утворень.

(16) Спосіб за п. (15), у якому полінуклеотидні утворення розрізняються принаймні одним структурним та/або функціональним елементом.

(17) Спосіб за пп. (15) або (16), у якому полінуклеотидні утворення відрізняються від поліпептидів, які вони кодуєть.

(18) Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому антитіло використовують для виявлення вірусів як сторонніх речовин, наприклад, вірусів, обраних з-поміж *Pneumovirinae*, як от рід *Pneumovirus*, у тому числі респіраторний синцитіальний вірус (RSV); *Morbilliviruses* сімейства *Paramyxoviridae*, як от вірус кору; *Enteroviruses* сімейства *Picornaviridae*, серед них віруси *Coxsackie*, наприклад, Коксекі В5, еховіруси, група ентеровірусів А-Д та ріновіруси; *Reoviridae* ссавців, зокрема, орторевіруси (такі реовіруси ссавців, як реовірус 1, 2 та 3) і ротавіруси; члени сімейства *Retroviridae*, наприклад, *Orthoretrovirinae*, як от ретровіруси, *Mefarnevoviruses* сімейства *Paramyxoviridae*, як людський метаневмовірус (HMPV), або віруси пара грипу типів 1, 2, 3 та 4; *Rubulaviruses* сімейства *Paramyxoviridae*, як вірус свинки; *Togaviridae*, як от *Rubellavirus*; *Coronaviridae*, як коронавірус атипової пневмонії та інші людські коронавіруси, у тому числі коронавірус OC43, 229E, NL63 та HKU1; *Rhinoviruses* сімейства *Picornaviridae*, як М-штами ріновірусу; вірус *Varicella Zoster* (VZV), відомий також як вірус людського герпесу 2 (HHV3); *Polyomaviridae*, як от поліомавірус SV-40, поліомавірус BK та поліомавірус JC; свинячі цирковіруси; свинячі цикорнавіруси, як от вірус везикулярної хвороби свиней та вірус Тешена-Тайфана; члени сімейства *Parvoviridae*, як собачий парвовірус (CPV), бокавіруси або свинячі парвовіруси; віруси *Parainfluenza* (PIV); члени сімейства *Orthomyxoviridae*, серед них віруси грипу типів А і В; члени сімейства *Paramyxoviridae*

paramyxovirinae, включаючи PIV-1, PIV-2 та PIV-3; Herpesviridae, як от віруси простого герпесу 1 та 2, віруси простого людського герпесу типів 6, 7 або 8, цитомегаловірус та вірус Епштейна-Барра; Adenoviridae, як от аденовіруси, у тому числі людські, мавпячі та пташині аденовіруси, включаючи пташиний аденовірус 1; пташині цирковіруси; пташині Reoviridae, зокрема, орторевіруси, як пташині реовіруси; члени сімейства Papillomaviridae, включаючи вірус людської папіломи; члени сімейства Flaviviridae, включаючи вірус Західного Нілу, та Birnaviridae, у тому числі вірус інфекційної бурсальної хвороби (також відомий як вірус гумборо), та/або у якому антитіло використовують для виявлення бактерій як сторонніх речовин, зокрема, бактерій Chlamydia, включаючи *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* та *C. psittaci*; а також Mycoplasma.

(19) Спосіб будь-яким з попередніх пунктів, у якому полінуклеотидне утворення містить послідовності кодування HA (гемоглітинін) та/або NA (нейрамінідазу).

У переважному варіанті здійснення винаходу полінуклеотидне утворення містить будь-яку з цих кодувальних послідовностей HA та/або NA нарізно або у комбінації між ними. Можливо також, що полінуклеотидне утворення містить лише частини цих послідовностей. Переважно полінуклеотидне утворення містить повну послідовність або частину послідовності, що кодує H1, H2, H3, H5, H6, H7, N1, N2, N3 або, нарізно чи у комбінації, переважно лише для H5. В іншому переважному варіанті здійснення винаходу утворення містить послідовності або частини послідовностей, що кодують H1N1, H2N2, H3N2, H6N1, H7N3 або H7N7, причому переважно послідовності або частини послідовностей кодують для H5N1.

(20) Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, зокрема, за п. (14), у якому полінуклеотидне утворення, яке містить послідовність, що кодує принаймні частину діючої речовини, є оптимізоване за кодонами, зокрема, для суб'єктів, що використовуються для імунізації полінуклеотидним утворенням.

(21) Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому діюча речовина являє собою антиген грипу, а полінуклеотидне утворення містить послідовність, яка принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 98 % збігається з нуклеїновою кислотою, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2.

(22) Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому діюча речовина являє собою антиген грипу, а полінуклеотидне утворення містить послідовність, наведену в описах послідовностей № 1 або 2.

(23) Застосування полінуклеотидного утворення, яке містить послідовність, що кодує принаймні частину діючої речовини, для вироблення антитіла, специфічного щодо зазначеної діючої речовини, з метою виявлення будь-якого з наступних станів:

i) наявності або відсутності сторонніх агентів у композиції, що випробується,
ii) наявності або відсутності будь-яких сторонніх або заразливих агентів у композиції, де антитіло одержують шляхом імунізації суб'єкта полінуклеотидним утворенням і де діючу речовину нейтралізують або інактивують зазначеним антитілом.

(24) Застосування за п. (23), у якому діюча речовина являє заразливую дію, а відсутність інфекційної дії композиції свідчить про те, що антитіло нейтралізувало або інактивувало діючу речовину і що будь-які інші заразливі агенти відсутні.

(25) Застосування за пп. (23) або (24), де діюча речовина являє собою антиген, переважно вірусну частку, або діюча речовина містить принаймні один компонент вірусної частки, зокрема, зазначена вірусна частка є часткою вірусу грипу.

(26) Застосування за пп. (23) - (25), де випробування композиції являє собою позитивний або негативний контрольний тест.

(27) Застосування за пп. (23) - (26), де випробування композиції являє собою тест на сторонні агенти.

(28) Спосіб одержання фармацевтичної композиції, зокрема, вакцини, у якому принаймні на одній стадії виробничого процесу:

a1) здійснюють спосіб за будь-яким з пп. (1) - (22), або
a2) здійснюють застосування за будь-яким з пп. (23) - (27), а за бажанням також
b) обробляють фармацевтичну композицію, зокрема, вакцину, або її проміжний продукт, та/або обробляють клітинну культуру, з якої походить фармацевтична композиція або вакцина, з метою видалення та/або інактивації стороннього агента.

(29) Спосіб за п. (28), у якому у разі виявлення патогенного агента обробку за пп. b) здійснюють таким чином, щоб видалити або інактивувати зазначений патогенний сторонній агент.

(30) Застосування антитіла, виробленого проти продукту експресії полінуклеотидного утворення, яке містить послідовність, що кодує принаймні частину діючої речовини, де антитіло

специфічно прив'язується до діючої речовини, з метою очищення від зазначеної діючої речовини, причому антитіло та діюча речовина походять з різних полінуклеотидних утворень.

(31) Застосування за п. (30), де використовується антитіло за пп. (14)-(22).

5 (32) Застосування за п. (30) або (31), антитіло слугує міткою спорідненості для зв'язування з твердою фазою.

(33) Полінуклеотид, який містить послідовність, що принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 98 % збігається з нуклеїновою кислотою, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2.

10 (34) Полінуклеотид за п. (33), який має послідовність, наведену в описах послідовностей № 1 або 2.

(35) Полінуклеотидне утворення, яке містить полінуклеотид за п. (33) або (34).

(36) Клітина-хазяїн, яка містить полінуклеотид за п. (33) або (34) або полінуклеотидне утворення за п. (35).

15 (37) Клітина-хазяїн за п. (36), яка являє собою бактеріальну клітину, дріжджову клітину, клітину гриба, клітину рослини, клітину водорості або клітину комах, переважно бактеріальну або дріжджову клітину, а найкраще бактеріальну клітину.

(38) Клітина-хазяїн за п. (36) або (37), яка являє собою клітину *Escherichia coli*, клітину *Streptomyces*, клітину *Pichia pastoris* або клітину *Schizosaccharomyces*, переважно клітину *Escherichia coli*.

20 (39) Нелюдський організм, трансгенна тварина або мікроорганізм, який містить полінуклеотид за п. (33) або (34) або полінуклеотидне утворення за п. (35).

(40) Антитіло, специфічне до поліпептиду, закодованого полінуклеотидом за п. (33) або (34).

(41) Спосіб вироблення антитіла за п. (40), згідно з яким:

25 а) виробляють полінуклеотидне утворення за п. (35) та
б) імунізують придатний суб'єкт, переважно придатну тварину, наприклад, мишу, щура або кроля, а найкраще кроля, зазначеним полінуклеотидним утворенням.

(42) Застосування для випробування на сторонні агенти композиції набору елементів, який містить

30 а) полінуклеотидне утворення, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини та

с) клітину-хазяїн.

(43) Набір елементів, який містить

35 а) полінуклеотидне утворення, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, яка принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 98 % збігається з нуклеїновою кислотою, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2, або полінуклеотидне утворення містить послідовність, наведену в описах послідовностей № 1 або 2, та

б) клітину-хазяїн.

Докладний опис винаходу

40 Далі цей винахід описується докладніше на варіантах здійснення та прикладах, які, втім, носять суто ілюстративний характер і ніяким чином не обмежують обсяг винаходу.

Винахід пропонує ефективний, швидкий та надійний спосіб виявлення забруднень у композиціях шляхом застосування антитіл, які специфічно прив'язуються до наявних у композиції діючих речовин за умови, що зазначене антитіло створено проти продукту експресії полінуклеотидного утворення, яке містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини. Встановлено, що антитіла, утворені з використанням рекомбінантних полінуклеотидних утворень для імунізації, є особливо придатні та корисні для нейтралізації або інактивації діючих речовин при випробуванні на сторонні або занесені агенти. Такі антитіла є найбільш придатні для випробування на сторонні агенти композиціях, які містять білкові агенти у якості діючих речовин. Оскільки полінуклеотидні утворення, призначені для створення антитіл, одержані синтетичним шляхом і містять полінуклеотид, який кодує принаймні частину послідовності амінокислот, наявних у даній діючій речовині, полінуклеотидні утворення кодують гомологічні послідовності в цілі, яка підлягає нейтралізації або інактивації, але при цьому вони не забруднені сторонніми або занесеними агентами при введенні антитіл до композиції під час випробувань. Навпроти, випробування на інші імунологічні сторонні агенти з використанням антитіл, які виробляються шляхом імунізації тварин даною діючою речовиною, само може призвести до утворення антитіл, специфічних до наявних у композиції сторонніх агентів, що збільшує ризик хибних негативних результатів. Це небажане вироблення таких антитіл в організмі тварин може бути спричинено, наприклад, забрудненням з клітинної культури, у якій вироблялася діюча речовина. Однак внаслідок того, на відміну від застосування імунізації

полінуклеотидними утвореннями для вироблення антитіл згідно з цим винаходом, антитіла, що стають специфічними до сторонніх агентів, нейтралізували б сторонні агенти під час випробувань, що призвело б до хибного аналізу. Спосіб за цим винаходом дозволяє уникнути або принаймні зменшити ризик утворення антитіл, специфічних до забруднювачів. Отже, можна уникнути так званих хибно негативних результатів випробування на сторонні агенти. Більш того, зменшується ризик перехресної реактивності. Далі, полінуклеотидні утворення можна випробувати безпосередньо у відповідних випробувальних системах, щоб довести відсутність сторонніх забруднювачів, наприклад, ці утворення можна піддавати прямому ПЛР випробуванню на широку гаму потенційних забруднювачів або випробувати їх за методикою, наведеною в Європейській Фармакопеї, розділ 2.6.16.

Зокрема, встановлено, що шляхом прямої імунізації суб'єкта полінуклеотидним утворенням, що кодує, наприклад, вірусний антиген, як от антиген вірусу грипу, можна швидко одержувати антитіла, які специфічно прив'язуються до цього антигену вірусу грипу, маючи на увазі, що наступний тест не реагує на сам вірус грипу. Отже, при застосуванні способу згідно з винаходом немає потреби виробляти специфічні антитіла, наприклад, шляхом імунізації тварини диким вірусом або часткою вірусу, одержаного у ході приготування вакцини, що суттєво скорочує час на вироблення антитіла, яке буде застосовуватися при подальшому випробуванні. Крім того, більше не обов'язково покладатися на ідентифікацію та культивування штаму, одержаного перехресною реакцією, оскільки полінуклеотидне утворення можна приготувати, тільки-но буде ідентифіковано штам потенційно пандемічного або сезонного вірусу грипу. Це особливо корисне у випадках пандемічних або сезонних спалахів грипу, коли постає потреба негайно поставити пандемічну або сезонну вакцину на ринок. При застосуванні способу згідно з винаходом можна швидко виробити специфічні антитіла, спрямовані проти антигенів цих різновидів грипу, й використовувати їх для випробувань і протягом подальших операцій вироблення протигрипозної вакцини. Отже, цей винахід дозволяє скоротити час створення вакцини до її масового застосування. Оскільки утворені антитіла можуть використовуватися для випробувань якості вакцин або їх проміжних продуктів, наприклад, випробувань на сторонні агенти, цей винахід також призводить до поліпшення якості вакцин. Крім того, при застосуванні цього винаходу з'являється можливість після виявлення сторонніх агентів піддавати партію вакцини, яка дорого коштує, спеціальній обробці для інактивації або видалення виявленого занесеного агента.

У цілому застосування способу за винаходом створює умови для підвищення якості та безпечності випробуваних композицій та зменшення собівартості випробувань на занесені агенти. Внаслідок того скорочується шлях випробування вакцин до масового застосування.

Один з аспектів цього винаходу стосується способу виявлення на сторонні агенти композицій, які містять принаймні одну діючу речовину, згідно з яким:

a) здійснюють контакт між антитілом, виробленим проти продукту експресії полінуклеотидного утворення, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, з композицією, яка містить принаймні одну діючу речовину, причому антитіло прив'язується до діючої речовини,

b) визначають наявність або відсутність сторонніх агентів у композиції після стадії a).

У цьому винаході термін "сторонній агент" або "занесений агент" означає забруднення, яке може бути присутнім у випробуваній композиції. Занесеним або стороннім є такий агент, присутність якого у композиції не передбачається і може негативно впливати на властивості продукту, до складу якого входить композиція. Наприклад, якщо композиція являє собою фармацевтичний препарат і має використовуватися відповідним чином, занесений агент може бути, наприклад, заразливим агентом (патогеном), тобто здатним заразити людину чи тварину. Такий заразний агент може бути мікроорганізмом (бактерії, грибки, водорості), вірусом або його частиною. Віруси також часто бувають здатні рости у таких системах, як клітинні культури, що використовуються для вироблення біопрепаратів. Більш того, композиція може бути заражена ДНК клітини-хазяїна.

Типовими клітинними лініями, що використовуються для вироблення біопрепаратів, зокрема, для одержання вірусних часток, є такі лінії клітин ссавців, як MDCK, CHO, BHK, Vero, MRC-5, PER.C6, WI-38 та подібні. Прикладами заразливих вірусів та бактерій, які ненавмисне інфікують такі клітини, а відтак стають потенційними сторонніми або занесеними агентами, що підлягають випробуванню згідно з цим винаходом, можуть бути віруси, обрані з-поміж Pneumovirinae, як от рід Pneumovirus, у тому числі респіраторний синцитіальний вірус (RSV); Morbilliviruses сімейства Paramyxoviridae, як от вірус кору; Enteroviruses сімейства Picornaviridae, серед них віруси Coxsackie, наприклад, Коксекі В5, еховіруси, група ентеровірусів А-D та ріновіруси; Reoviridae ссавців, зокрема, ортореовіруси (такі реовіруси ссавців, як реовірус 1, 2 та

3) і ротавіруси; члени сімейства *Retroviridae*, наприклад, *Orthoretrovirinae*, як от ретровіруси, *Mefarneumoviruses* сімейства *Paramyxoviridae*, як людський метапневмовірус (HMPV), або віруси парагрипу типів 1, 2, 3 та 4; *Rubulaviruses* сімейства *Paramyxoviridae*, як вірус свинки; *Togaviridae*, як от *Rubellavirus*; *Coronaviridae*, як коронавірус атипової пневмонії та інші людські коронавіруси, у тому числі коронавірус OC43, 229E, NL63 та HKU1; *Rhinoviruses* сімейства *Picornaviridae*, як М-штами ріновірусу; вірус *Varicella Zoster (VZV)*, відомий також як вірус людського герпесу 2 (HHV3); *Polyomaviridae*, як от поліомавірус SV-40, поліомавірус BK та поліомавірус JC; свинячі цирковіруси; свинячі цирковіруси, як от вірус везикулярної хвороби свиней та вірус Тешена-Тайфана; члени сімейства *Parvoviridae*, як собачий парвовірус (CPV), бокавіруси або свинячі парвовіруси; віруси *Parainfluenza (PIV)*; члени сімейства *Orthomyxoviridae*, серед них віруси грипу типів А і В; члени сімейства *Paramyxoviridae* *paramyxovirinae*, включаючи PIV-1, PIV-2 та PIV-3; *Herpesviridae*, як от віруси простого герпесу 1 та 2, віруси простого людського герпесу типів 6, 7 або 8, цитомегаловірус та вірус Епштейна-Барра; *Adenoviridae*, як от аденовіруси, у тому числі людські, мавпячі та пташині аденовіруси, включаючи пташиний аденовірус 1; пташині цирковіруси; пташині *Reoviridae*, зокрема, орторевіруси, як пташині реовіруси; члени сімейства *Papillomaviridae*, включаючи вірус людської папіломи; члени сімейства *Flaviviridae*, включаючи вірус Західного Нілу, та *Birnaviridae*, у тому числі вірус інфекційної бурсальної хвороби (також відомий як вірус гумборо), та/або в якому антитіло використовують для виявлення бактерій як сторонніх речовин, зокрема, бактерій *Chlamydia*, включаючи *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* та *C. psittaci*; а також *Mycoplasma*.

Застосування способу згідно з винаходом дозволяє ефективно, швидко та надійно виявляти наявність сторонніх або занесених агентів у композиції. Така композиція, що випробується, часто має відповідати вимогам до якості проб, взятих на будь-якій стадії одержання. Подібні композиції можуть використовуватися у тестових наборах, наприклад, для виявлення хвороб або заразлих агентів у будь-яких тілесних рідинах або пробах з організму людини чи тварини. Спосіб за винаходом може також використовуватися при випробуванні композицій, призначених для лабораторних робіт, наприклад, аналітичних або препаративних.

Композиції, які випробуються згідно з винаходом, можуть бути, наприклад, пробами клітинної культури, з якої виробляється діюча речовина, або продуктами ізоляції чи очистки будь-яких проміжних продуктів. Проби можна відбирати на будь-якій стадії процесу. Також композиція може бути продуктом, виділеним з цієї клітинної культури на будь-якій стадії, тобто це може бути прекурсор кінцевого продукту, або сам кінцевий продукт, або будь-який проміжний продукт. Більш того, композиція, що випробується, може являти собою вірус-затравку або містити вірус-затравку. Вірус-затравка у цьому винаході означає вірус, призначений для вироблення антигену або вакцини.

Також до композицій згідно з винаходом належать фармацевтичні композиції. Переважно композиції є фармацевтичними. Фармацевтична композиція використовується усередині або ззовні людського чи тваринного організму з метою профілактики, діагностики, полегшення або лікування хвороби. Переважно така фармацевтична композиція являє собою препарат вакцини або її проміжний продукт. Якщо фармацевтичною композицією є препарат вакцини, можливо також випробувати певні проби партій вакцини. Випробуванням можна також піддавати, наприклад, будь-які проби із стадій виготовлення фармацевтичного продукту або вакцини, наприклад, проби клітинних культур, з яких одержують діючу речовину, або будь-яких проміжних продуктів.

Оскільки забруднення занесеним агентом може статися й може бути перевірено у будь-який час у процесі виробництва, спосіб згідно з винаходом може застосовуватися на будь-якому етапі виробничого процесу зазначеної композиції.

Композиція, що підлягає випробуванню, містить щонайменше одну діючу речовину. Під діючою речовиною у цьому винаході розуміється будь-який біологічний або хімічний матеріал або сполука, яка становить діючу основу композиції. У разі фармацевтичної композиції діючою речовиною може бути лікарська сполука, наприклад, біофармацевтична сполука, зокрема, поліпептид, що має експресію. Переважно діючою речовиною є антиген, краще такий, що являє собою інактивованний або ослаблений вірус сполука, а дуже бажано, щоб це був вірусний антиген. Прикладами цих вірусних антигенів можуть бути вірусні частки, скажімо, частково розірвані вірусні частки, як от розщеплені вірусні антигени, очищені оболонкові антигени, наприклад, субдинічні вірусні антигени або віросоми. Віросома – це одноламелярна фосфоліпідна двошарова везикула з середнім діаметром у межах від 70 до 150 нм. По суті, віросоми являють собою перебудовані порожні вірусні оболонки, позбавлені нуклеокапсиду, що включає генетичний матеріал первинного вірусу. Віросоми нездатні до реплікації, а являють собою фузійно активні везикули, що містять функціональні глікопротеїни оболонки вірусу, у

тому числі гемаглютинін вірусу грипу (HA) та нейрамінідазу (NA), вбудовані до фосфоліпідної двошарової мембрани. Також є бажано, щоб діюча речовина містила принаймні один компонент вірусу або вірусної частки, а найкраще діюча речовина являла собою частку вірусу грипу.

Оскільки спосіб згідно з цим винаходом є особливо придатним при виробленні пандемічних вакцин, згідно з їх переважним варіантом здійснення діючою речовиною є антиген або компонент вакцини, одержаний з частки вірусу грипу, який може бути присутнім у протигрипозних вакцинах. Ці протигрипозні вакцини можуть базуватися на будь-якому придатному штамі (штамах) грипу. Протигрипозні вакцини зазвичай містять антигени від принаймні одного штаму вірусів грипу А, В та С, переважно від принаймні одного штаму грипу А або В. Рекомендовані для вакцин штами можуть змінюватися кожного сезону. Також вакцина може базуватися на кількох придатних штаммах грипу. Наприклад, протигрипозна вакцина може містити два штами грипу А та один штам грипу В. Далі, вакцина може бути не лише одновалентною, а й двох-, трьох- і більше валентною; найчастіше зустрічаються трьохвалентні вакцини. Протигрипозні вакцини, що містять діючу речовину, переважно антиген або компонент вакцини, одержаний з частки вірусу грипу, можна виробляти будь-яким відомим фахівцям шляхом. Наприклад, можна одержувати вакцини із застосуванням полінуклеотидних утворень, що кодують діючу речовину або частку діючої речовини, або інфікуванням яєць чи клітин препаратами живого вірусу. Переважний шлях одержання вакцин – це інфікування яєць чи клітин препаратами живого вірусу. Якщо вакцини виробляються на базі клітин, застосовують такі клітини, що здатні слугувати хазяями для зростаючих вірусів, наприклад, MDCK (клітини собачих нирок Мадіна-Дарбі), CHO (клітини яєчників китайського хом'яка), BHK (клітини нирок дитини хом'яка), Vero (клітини, одержані з клітин епітелію нирок африканської зеленої мавпи), MRC-5 (вторинні фібробласти людських легенів), PER.CG (клітини, одержані з клітин сітківки людських ембріонів), WI-38 (клітини, одержані з тканин легенів людського плода) та подібні. Як правило, вірус або препарат живого вірусу впорскують до клітин, де він розмножується. Після того зовнішні стінки клітин видаляють, збирають, очищують та інактивують. Якщо вакцину виробляють на яйцях, то вірус або препарат живого вірусу впорскують до яйця, де він накопичується у рідині, що оточує ембріон. Ембріон стає інфікованим, отже, вірус може розмножуватися. Після спливу певного часу вірус збирають, очищують та піддають хімічній інактивації. З цього вірусу або його частин виробляють вакцину.

Термін "полінуклеотид" тут означає двоспіральну або односпіральну молекулу нуклеїнової кислоти, наприклад, адНК, сдНК, геномну ДНК, РНК та/або мРНК тощо. Молекула нуклеїнової кислоти може знаходитися або у кодувальній, або у додатковій спіралі. Полінуклеотид може походити з природного джерела або бути одержаним у генно-інженерному чи хімічному процесі, або бути похідним від такого синтезу. Переважно полінуклеотидна послідовність кодує антиген як діючу речовину.

Згідно із способом за винаходом на стадії а) виробляють антитіло проти продукту експресії полінуклеотидного утворення, яке містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, і вводять його у контакт з принаймні однією діючою речовиною, причому антитіло специфічно прив'язується до діючої речовини, наприклад, утворюючи комплекс антиген-антитіло.

Далі докладно описані антитіла, що застосовуються у цьому винаході. Вони походять з полінуклеотидного утворення або вектора. Терміни "полінуклеотидне утворення" та "вектор" відповідно означають молекулу, яку використовують для введення екзогенних полінуклеотидів (або вставок відповідно) до клітин або організмів-хазяїв. Полінуклеотидне утворення містить полінуклеотид, як описано вище, причому переважно полінуклеотидне утворення або вектор являє собою послідовність ДНК або РНК, найкраще послідовність ДНК. Полінуклеотидне утворення містить послідовність полінуклеотидів, або відповідно вставку, яка кодує один або кілька (полі)пептидів або протеїнів. Цей полінуклеотид, або відповідно вставка, може бути двоспіральною або односпіральною молекулою нуклеїнової кислоти, наприклад, адНК, сдНК, геномною ДНК, РНК та/або мРНК тощо. Молекула нуклеїнової кислоти може знаходитися або у кодувальній, або у додатковій спіралі. Полінуклеотид може походити з природного джерела або бути одержаним у генно-інженерному чи хімічному процесі, або бути похідним від такого синтезу. Переважно полінуклеотидна послідовність кодує антиген як діючу речовину.

У цьому винаході вираз "антитіло, вироблене проти продукту експресії полінуклеотидного утворення" означає, що антитіло було одержано імунізацією придатних організмів полінуклеотидним утворенням або антитіло було вироблене у клітинах чи клітинних системах. Антитіла, одержані від такої специфічної імунізації, за бажанням ізолювані, прив'язуються (за бажанням специфічно) до (полі)пептидів, кодованих послідовністю, утвореною

полінуклеотидним утворенням, причому (полі)пептиди становлять принаймні частину діючих речовин.

Переважно полінуклеотидне утворення або вектор згідно з цим винаходом містять а) область промотора, b) полінуклеотид або вставку, як описано вище, оперативно пов'язаний з областю промотора, c) за бажанням також регуляторні послідовності, оперативно пов'язані з ними, які можуть діяти як сигнали транскрипції, термінації та/або поліаденілювання, енхансерні послідовності та/або послідовності кодування головних сигналів та/або послідовності, що забезпечують ефективне зв'язування рибосоми, наприклад, консенсусна послідовність Козака. Придатні промотори та/або регуляторні послідовності добре відомі фахівцям з молекулярної біології. В усякому разі, досвідчена особа може знайти придатні промотори та/або регуляторні послідовності у літературі, наприклад, у відповідних журналах та генних базах даних, або можуть виділити їх з будь-якого потрібного організму стандартними прийомами, як описано у книзі Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, (2000).

Полінуклеотидні послідовності або вставки, придатні для полінуклеотидних утворень, що застосовуються згідно з винаходом, фахівець легко визначить на підставі кодування послідовності поліпептиду, що утворює принаймні частину діючої речовини. У разі, коли діючими речовинами є вірусні антигени, послідовності нуклеотидів, що кодують ці вірусні антигени, є здебільшого відомі, наприклад, у разі вірусів або вакцин, які готують методами "зворотної генетики" (див., наприклад, Neumann et al., "Reverse Genetics of Influenza Virus", Minireview, *Virology* 287, 243-250, 2001, посилання також на пізніші публікації про методи зворотної генетики). Фахівець легко вибере всю послідовність полінуклеотидів або їх частин, що кодують придатний поліпептид, і введе її до полінуклеотидного утворення. Придатним є поліпептид, здатний викликати ефективну реакцію у відповідь на антитіло в організмі імунізованого суб'єкта. Придатні поліпептиди, звичайно, можна знайти у базах даних, відомих фахівцям, наприклад

PubMed database (е.9 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>,
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/45284465?ordinalpos=1 &itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/45284465?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum) та
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>). Переважно поліпептид містить одну або більше антигенних детермінант (епітопів). Також полінуклеотидне утворення може містити поліпептид, який кодує не лише одну діючу речовину або частину діючої речовини, а й ще одну або кілька інших діючих речовин або їх частин. Також можна застосовувати інші полінуклеотидні утворення з вмістом інших полінуклеотидів або вставок. Однак це може залежати від наявності та кількості різних діючих речовин у композиції. Отже, якщо мають місце різні види діючих речовин, застосовують різні види полінуклеотидних утворень, кожне з яких містить послідовність кодування полі пептиду, який являє собою принаймні частину діючої речовини.

Переважно полінуклеотидне утворення або вектор, що застосовується у цьому винаході, являє собою вектор експресії. Вектор експресії здатен контролювати експресію (тобто транскрипцію та трансляцію) генів, які він містить. Більш того, переважно вектор являє собою вектор експресії плазмідів ссавців. Прикладом такого вектора є плазмід (р) rCMV. Переважно вектор, що застосовується у цьому винаході, посідає такі властивості: а) промотор цитомегаловірусу (CMV), b) консенсусну послідовність Козака, яка розміщена перед стартовим кодоном ATG, щоб забезпечити ефективне зв'язування рибосом, а відтак максимальний рівень трансляції білку, c) сигнал термінації транскрипції – полі(А)сигнал, який знаходиться наприкінці послідовності кодування (полі)пептиду або протеїну, який являє собою принаймні частину діючої речовини, забезпечуючи припинення транскрипції у належному місці. Послідовність кодування (тобто полінуклеотид) можна субклонувати до вектора на придатних сайтах рестрикції. Одержаний плазмід (поліпептидне утворення або вектор, переважно ДНК утворення або вектор) можна потім застосовувати для трансформації придатних клітин-хазяїв, як от бактеріальні клітини, клітини дріжджів, клітини водоростей, клітини рослин, клітини комах, переважно бактеріальних клітин типу *E.coli*. Трансформовані клітини-хазяї культивують у придатному середовищі, а потім збирають та лізують, а плазми виділяють. Протоколи для подібних процедур описані, наприклад, у Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, (2000), Davis, et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier (1986), та Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience (1988).

Одержаний плазмідний полінуклеотид можна в цілому характеризувати такими аналітичними методами, як рестрикційний аналіз, гель-електрофорез та ніші методи біохімії та

молекулярної біології. Ці методи, як і ті, що описані вище при одержанні полінуклеотидного утворення, є добре відомі, а з методик одержання рекомбінантних полінуклеотидів опубліковано чимало праць, у тому числі Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Press, (2000), Davis, et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier (1986), and Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience (1988).

Трансформацію клітин-хазяїв можна використовувати для підсилення вектора експресії. Цей підсилений вектор експресії може далі, у свою чергу, використовуватися, наприклад, для імунізації суб'єкта, як описано далі.

З метою вироблення антитіл або антисироваток, які специфічно прив'язуються до діючої речовини, наявної у композиції, згідно з переважним варіантом здійснення винаходу суб'єкта імунізують полінуклеотидним утворенням, яке містить полінуклеотид або вставку, що кодуєть принаймні частину діючої речовини. Завдяки цій прямій імунізації придатного суб'єкта полінуклеотидним утворенням прискорюється вироблення антитіл проти продукту експресії, наприклад, можна уникнути кількох операцій, які були б необхідні, якщо імунізацію здійснювали б самою діючою речовиною, наприклад, (полі)пептидом. До таких потрібних в протилежному випадку операцій належить, наприклад, лабораторна очистка (полі)пептиду. Спосіб за винаходом, якийощаджує час, має особливі переваги у випадку, коли діючою речовиною є вірусний антиген, частка вірусу, віросома або якісь їх частини, бо можна швидше провести випробування безпечної, високоякісної вакцини. Це має особливе значення під час пандемічних або сезонних спалахів грипу, коли треба якнайшвидше здійснити масовий випуск вакцини. При застосуванні способу за винаходом специфічні антитіла, спрямовані проти й гомологічні до поточних пандемічних або сезонних штамів грипу можна швидко генерувати й застосовувати у виробництві протигрипозних вакцин. Більш того, оскільки імунізацію можна проводити синтетичним полінуклеотидним утворенням, суттєво зменшується ризик імунізації відповідної тварини забрудненнями. Таким чином можна уникнути або принаймні скоротити ризик вироблення антитіл, спрямованих проти цих забруднень, що могли б призвести до появи хибно негативних результатів випробування. Через те суттєво підвищується безпечність та якість випробуваних композицій.

Суб'єкта також можна імунізувати двома або більше різними полінуклеотидними утвореннями, кожне з яких несе інший полінуклеотид. Імунізованим суб'єктом є нелюдська тварина, а саме, наприклад, вівця, коза, кріль, щур, миша, собака, морська свинка, переважно кріль, миша, морська свинка або щур, а найкраще кріль. Імунізувати придатну тварину можна відомими стандартними способами. Як правило, полінуклеотидне утворення, за бажанням очищене, вводять до тканин тварини одним з відомих прийомів, наприклад, ін'єкцією полінуклеотидного утворення у фізрозчині за допомогою стандартного шприца, генної гармати або пневматичною ін'єкцією. Крім того, препарат можна вводити топікально або за посередництвом цитофектину. Імунізована таким чином тварина далі виробляє антитіла, специфічні до частин або до цілих (полі)пептидів або протеїнів, що мають експресію. Термін "моноклональне антитіло" у цьому винаході означає антитіла, які мають однакову антигенну специфічність, тобто є специфічні до одного епітопа (антигенної детермінанти). Це означає, що якщо (полі)пептид, що має експресію, відповідає одному епітопу, то антитіла до нього є "моноклональними" у сенсі цього винаходу. Якщо (полі)пептид або протеїн, що має експресію, містить кілька епітопів, то специфічні антитіла, вироблені в організмі імунізованої тварини, є "поліклональними" у сенсі цього винаходу.

Коли мине певний час, наприклад, до 100 днів, зазвичай до 70 або до 50 днів, краще біля 70 днів після імунізації, специфічні антитіла, вироблені імунізованими тваринами, можна відібрати відомими фахівцям способами. Переважно тварин знекровлюють й відбирають проби сироватки, які містять антитіла. У переважному варіанті здійснення винаходу антитіла, що використовуються на стадії а) просто представлені пробю сироватки від імунізованої тварини. Перед стадією б) діючу речовину переважно нейтралізують або інактивують шляхом прив'язування антитіл. Переважно прив'язування носить специфічний характер.

Термін "специфічне зв'язування" у цьому винаході означає, що антитіло, присутнє у винаході, виявляє специфічність до діючої речовини, наявної у композиції, що випробується а відтак селективно зв'язує зазначену діючу речовину, але не сторонні агенти, що можуть бути потенційно присутніми у композиції, що випробується. У переважному варіанті здійснення винаходу антитіло за винаходом зв'язує виключно зазначену діючу речовину, але не сторонні агенти, що можуть бути потенційно присутніми. У разі, якщо діюча речовина є антигеном, як описано вище, специфічне прив'язування антитіла до діючої речовини може також бути перехресною реакцією, а це означає, що антитіло згідно з винаходом посідає перехресну реактивність. Термін "перехресна реактивність" у цьому винаході означає здатність того чи

іншого антитіла реагувати з двома або більше антигенами, які мають спільний або дуже гомологічний епітоп. Таке може мати місце, якщо у композиції, що випробується, присутні дві чи більше діючі речовини, або два чи більше антигени.

Нейтралізована діюча речовина у сенсі цього винаходу – це діюча речовина, яка вступає до взаємодії із специфічним антитілом, наприклад, утворюючи комплекс із специфічним антитілом, а відтак по суті втрачає дієвість. У переважному варіанті здійснення нейтралізована діюча речовина є повністю недієвою. Недієва діюча речовина у сенсі цього винаходу по суті неспроможна виконувати свою функцію, наприклад, фармакологічну функцію. Також недієва діюча речовина не може чинити патогенну дію при контакті з лініями детекторних клітин, чутливих до діючої речовини, або коли її вводять дослідним тваринам. Кожен з наведених вище заходів забезпечує, що занесений агент, якщо його виявляють на випробуваннях, не є діючою речовиною композиції.

У переважному варіанті здійснення винаходу специфічне антитіло реагує з вірусним антигеном або з часткою вірусу, знищуючи або інгібуючи таким чином його патогенність, тобто заразливості або вірулентності. За бажанням нейтралізуючу спроможність специфічного антитіла можна випробувати до проведення стадії b). Прийоми виявлення нейтралізації добре знайомі фахівцям, наприклад, можна змішувати одержані специфічні антитіла або сироватку, що містить специфічні антитіла, з референтним штамом, який посідає перехресну реактивність щодо специфічних антитіл. Після реакції референтний штам можна інокулювати на лінії детекторних клітин, чутливих до зараження референтним штамом, наприклад, на лініях клітин Vero, MRC-5 або MDCK.

Через певний час, наприклад, через 14 днів, ці лінії детекторних клітин перевіряють на наявність патологічних явищ. Інший спосіб перевірки нейтралізуючої спроможності антитіла полягає у випробуванні заразливості на яєчній моделі (це випробування описане, наприклад, у Європейській Фармакопеї, розділ 2.6.16). Патогенна дія – це несприятлива дія на розвиток або утримання клітини, зокрема, пов'язана з бактеріальними та/або вірусними інфекціями. До патогенних дій належать, зокрема, цитопатичні ефекти (ЦПЕ), розрив клітини, інгібування росту, інгібування синтезу білку або апоптоз. ЦПЕ – це помітні зміни у структурі клітини, які можуть бути різними у залежності від виду клітини й причини смерті, і фахівці визначають їх відомими прийомами. Наприклад, до найпоширеніших проявів вірусної інфекції належать такі морфологічні зміни, як округлення клітини та її відокремлення від підкладки, лізис клітини, утворення синцитію та внутрішньоклітинних тілець. Нейтралізуюча активність характеризується скороченням ЦПЕ та інгібуванням гемаглютинації, або скороченням гемадсорбції червоних кров'яних клітин до інфікованих клітин. Нейтралізуюча активність також характеризується випробуванням гемаглютинації до кондиціонованого середовища клітин.

Однак усі ці випробування нейтралізуючої спроможності є референтними. Це означає, що якщо можна показати нейтралізуючу спроможність антитіла на один раз створену систему, це випробування не можна повторяти з незмінним результатом на наново створених зразках тієї самої системи.

Якщо випробувана сироватка або антитіло не виявляють потрібної нейтралізуючої активності, можна виконати подальшу оптимізацію щодо структури вектора, виду, застосованого для імунізації, дози та шляху введення ДНК утворень або векторів відповідно, схем імунізації та взяття проб, а також формату випробування нейтралізуючої спроможності. "Достатня нейтралізуюча спроможність" у цьому винаході означає, що комплекс антитіло-діюча речовина не чинить помітної дії при виконанні відповідного випробування нейтралізації.

Згідно із способом за винаходом, на стадії b) визначають наявність або відсутність стороннього або занесеного агента. Ці випробування можна проводити на дорослих мишах, мишах-сисунцях та морських свинках згідно з вимогами нормативних документів, зокрема, наведеними у Європейській Фармакопеї, 2005, розділ 2.6.16 (партія вірусу-затравки). Випробування на віруси, що поширюються у пташиних тканинах, описане в Європейській Фармакопеї, 2005, розділ 2.6.16 (партія вірусу-затравки та вірусний харвест).

Далі, утворення також можна використовувати для активної імунізації тваринних випробувальних систем перед інокуляцією композицією, що випробується, як описано в розділі 2.6.16 Європейській Фармакопеї, 2005 (2.6.16.). Тоді не потрібно провадити попередню нейтралізацію вірусу-затравки, а здатність тваринної випробувальної моделі реагувати на забруднюючі агенти лишається незмінною. Таким чином додатково підвищується міцність випробувальної системи, зменшується кількість тварин, задіяних у випробуванні згідно з розділом 2.6.16, і суттєво скорочується час, потрібний для доведення відповідності вимогам розділу 2.6.16.

Переважно в описаних вище варіантах здійснення винаходу антитіло та діюча речовина не походять від одного полінуклеотидного, переважно ДНК, утворення. Полінуклеотидне утворення можна використовувати для різних цілей – або виробляти антитіла проти діючої речовини для випробування на занесені агенти згідно з винаходом, або для вироблення діючої речовини у масштабі препарату, тобто полінуклеотидне утворення, задіяне у виробленні діючої речовини, наприклад, вірусного антигену або вірусної частки, не використовується для одержання специфічних антитіл, які нейтралізують чи інактивують цю діючу речовину. У цьому винаході вираз "не походять від одного полінуклеотидного утворення" означає, що полінуклеотидні утворення відрізняються між собою принаймні одним структурним та/або функціональним компонентом, наприклад, відносно окремих частин цілого утворення, або приготовані у різних системах. Наприклад, як відомо фахівцям, полінуклеотидні утворення або вектори відповідно можуть розрізнятися функціональними елементами, що їх вони містять, у залежності від призначення. Якщо вектор, наприклад, слугує лише для розмноження полінуклеотиду або вставки відповідно у придатній клітині-хазяїні, він може містити принаймні одне походження реплікації (ori), який дозволяє напівнезалежну реплікацію вектора та його вставки у клітині-хазяїні. Крім того, такі вектори можуть містити додаткові функціональні елементи, як от сайт множинного клонування (MCS), який включає липкі кінці нуклеотидів для введення вставки або консенсусні сайти множинної рестрикції ферментів, куди можна вставляти полінуклеотид. Якщо бажаною є транскрипція вставки, то вектор додатково містить послідовність промоторів. Однак цим векторам зазвичай бракує функціональних послідовностей, необхідних для експресії полінуклеотиду. Якщо потрібна експресія полінуклеотиду з метою спровокувати підсилене вироблення антитіл проти експресованого поліпептиду, вектори додатково містять послідовність поліаденилювання, яка створює поліаденильований хвіст наприкінці транскрибованої пре-mРНК, що захищає мРНК від екзонуклеаз і забезпечує транскрипційну та трансляційну термінацію. Більш того, такий поліаденильований хвіст стабілізує вироблення мРНК. Крім того, нетранслюєма область (UTR) зовсім не зачіпається або зачіпається лише на мінімальну довжину, бо вона посідає специфічні характеристики, які можуть перешкодити транскрипції або трансляції. До того ж ці вектори містять ще послідовність Козака у мРНК, яка складає рибосому для трансляції мРНК.

У разі, коли діюча речовина, наявна у композиції, що випробується, являє собою вірусний антиген або вірусну частку, одержану із застосуванням полінуклеотидного утворення, то вірусний антиген або вірусна частка одержують із застосуванням такого полінуклеотидного утворення, яке переважно відрізняється від утворення, яким імунізували дослідну тварину, тобто використали для вироблення антитіл на стадії а), переважно специфічно прив'язуються до продукту експресії полінуклеотидного утворення й вироблені з полінуклеотидного утворення, застосованого для імунізації. Наприклад, ці два полінуклеотидні утворення можуть відрізнятися наявністю послідовності поліаденилювання, нетранслюємої області або області промотора, а переважно саме наявністю послідовності поліаденилювання.

Якщо, навпаки, полінуклеотидні утворення, застосовані для одержання діючої речовини, містять не лише кодуєчу послідовність цієї діючої речовини, а ще й послідовність кодування забруднювача, то після імунізації суб'єкта цим полінуклеотидним утворенням така послідовність кодування забруднювача знайде експресію поряд з кодуєчою послідовністю діючої речовини в організмі даного суб'єкта. Внаслідок того організм суб'єкта вироблятиме антитіла, специфічні не лише щодо діючої речовини, а й щодо (полі)пептиду-забруднювача. Як наслідок, ці специфічні до забруднювача антитіла нейтралізуватимуть забруднювач, що призведе до хибно негативних результатів випробування.

Однак при застосуванні різних полінуклеотидних утворень можна уникнути хибно негативних результатів випробування на сторонні агенти, оскільки антитіла проти цього поліпептиду-забруднювача не виробляються. Як описано вище, полінуклеотидні утворення можуть відрізнятися структурними та/або функціональними елементами у залежності від призначення. У випадку полінуклеотидного утворення, яке згідно з винаходом застосовується для вироблення специфічних антитіл, переважно використовується вектор експресії, оскільки бажаною є експресія полінуклеотиду, що кодує принаймні частину діючої речовини, в організмі імунізованого суб'єкта. Також полінуклеотидні утворення можуть відрізнятися щодо нуклеотиду, який вони кодують. Наприклад, при застосуванні цього винаходу вектор експресії, застосований для імунізації суб'єкта, не обов'язково має нести полінуклеотидну послідовність, яка кодує цілу діючу речовину. Для вироблення специфічних антитіл в організмі імунізованого суб'єкта цілком достатньо, якщо вектор експресії несе нести полінуклеотидну послідовність, яка кодує лише частину діючої речовини, наприклад, кодує одну або кілька консервативних областей діючої речовини.

Далі, у переважному варіанті здійснення винаходу полінуклеотидна послідовність, яка кодує принаймні частину діючої речовини, може бути оптимізована за кодонами, зокрема, відносно суб'єкта, якого імунізують полінуклеотидним утворенням (див. далі). Здійснивши зазначені вище заходи, а саме різні структурні та/або функціональні елементи, експресію полінуклеотидної послідовності, яка кодує лише частину діючої речовини, та оптимізацію полінуклеотидної послідовності за кодонами, можна звести практично нанівець ризик додаткової експресії послідовності, що кодує забруднення. Це набуває особливої ваги, коли композиція, що випробується, має відповідати високим вимогам якості, наприклад, використовується у фармацевтичних композиціях, зокрема, вакцинах. Більш того, зазначені заходи щодо полінуклеотиду додатково призводять до суттєвого збільшення швидкості експресії, а це дає поліпшення вироблення антитіл й відповідно посилення нейтралізуючої спроможності.

В іншому переважному варіанті здійснення винаходу полінуклеотидне утворення, що кодує принаймні частину діючої речовини, оптимізоване за кодонами, зокрема, щодо суб'єкта, імунізованого полінуклеотидним утворенням. Як відомо фахівцям, кожна окрема амінокислота кодується принаймні одним і щонайбільше шістьма кодонами. Попередні дослідження показали, що застосування кодонів у генах, що кодують поліпептиди клітини, розрізняється у залежності від виду (Kanaya, S, Y. Yamada, Y.Kudo and T. Ikemura (1999), "Studies of codon usage and tRNA genes at 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species specific diversity of codon usage based on multivariate analysis", *Gene* 238:143-155). Дегенерація генетичного коду надає можливість фахівцеві, серед іншого, адаптувати полінуклеотидну послідовність до кодонів, яким віддає перевагу клітина-хазяїн, оптимізуючи таким чином експресію потрібного поліпептиду, що зв'язує антиген, згідно з винаходом. Фахівцям відомо, як саме адаптувати полінуклеотидну послідовність до кодонів, яким віддає перевагу цільова клітина-хазяїн або організм, який імунізують полінуклеотидним утворенням. Наприклад, якщо імунізований організм є твариною, як от кріль, вівця, коза, щур або миша, полінуклеотидну послідовність можна адаптувати до кодонів, яким віддає перевагу відповідна тварина. Існують певні програмні засоби (алгоритми) для оптимізації будови кожного гену як для специфічного під даний організм застосування кодонів, так і для специфічного під даний організм застосування пар кодонів, наприклад, програма "Трансляція протеїнів-інженерія-технології" від CODA genomics.

У подальшому переважному варіанті здійснення антитіло використовують для нейтралізації або інактивації даної діючої речовини з наступним випробуванням на віруси та/або бактерії як сторонні агенти. Ці віруси та/або бактерії, на які проводять випробування, можна обрати, наприклад, з-поміж *Pneumovirinae*, як от рід *Pneumovirus*, у тому числі респіраторний синцитіальний вірус (RSV); *Morbilliviruses* сімейства *Paramyxoviridae*, як от вірус кору; *Enteroviruses* сімейства *Picornaviridae*, серед них віруси *Coxsackie*, наприклад, Коксеї В5, еховіруси, група ентеровірусів А-D та ріновіруси; *Reoviridae* ссавців, зокрема, ортореовіруси (такі реовіруси ссавців, як реовірус 1, 2 та 3) і ротавіруси; члени сімейства *Retroviridae*, наприклад, *Orthoretrovirinae*, як от ретровіруси, *Mefarparamyxoviruses* сімейства *Paramyxoviridae*, як людський метаневмовірус (HMPV), або віруси паргрипу типів 1, 2, 3 та 4; *Rubulaviruses* сімейства *Paramyxoviridae*, як вірус свинки; *Togaviridae*, як от *Rubellavirus*; *Coronaviridae*, як коронавірус атипової пневмонії та інші людські коронавіруси, у тому числі коронавірус OC43, 229E, NL63 та HKU1; *Rhinoviruses* сімейства *Picornaviridae*, як М-штами ріновірусу; вірус *Varicella Zoster* (VZV), відомий також як вірус людського герпесу 2 (HHV3); *Polyomaviridae*, як от поліомавірус SV-40, поліомавірус ВК та поліомавірус JC; свинячі цирковіруси; свинячі цирковіруси, як от вірус везикулярної хвороби свиней та вірус Тешена-Тайфана; члени сімейства *Parvoviridae*, як собачий парвовірус (CPV), бокавіруси або свинячі парвовіруси; віруси *Parainfluenza* (PIV); члени сімейства *Orthomyxoviridae*, серед них віруси грипу типів А і В; члени сімейства *Paramyxoviridae paramyxovirinae*, включаючи PIV-1, PIV-2 та PIV-3; *Herpesviridae*, як от віруси простого герпесу 1 та 2, віруси простого людського герпесу типів 6, 7 або 8, цитомегаловірус та вірус Епштейна-Барра; *Adenoviridae*, як от аденовіруси, у тому числі людські, мавпячі та пташині аденовіруси, включаючи пташиний аденовірус 1; пташині цирковіруси; пташині *Reoviridae*, зокрема, ортореовіруси, як пташині реовіруси; члени сімейства *Papillomaviridae*, включаючи вірус людської папіломи; члени сімейства *Flaviviridae*, включаючи вірус Західного Нілу, та *Birnaviridae*, у тому числі вірус інфекційної бурсальної хвороби (також відомий як вірус гумборо), та/або в якому антитіло використовують для випробування бактерій як сторонніх речовин, зокрема, бактерій *Chlamydia*, включаючи *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* та *C. psittaci*; а також *Mycoplasma*.

Далі, в одному з переважних варіантів здійснення винаходу поліпептид, що міститься у полінуклеотидному утворенні, містить послідовність кодування гемоглоїніну (НА) та/або

нейрамідази (NA). Гемоглютинін, наприклад, знаходиться на поверхні вірусів грипу. Це антигенний глікопротеїн, який відповідає за зв'язування вірусу із зараженою клітиною. Сьогодні відомо принаймні 16 різних НА антигенів грипу. Ці підтипи нумеруються від H1 до H16. NA –це фермент, який розриває глікозидні зчеплення нейрамінової кислоти. Зараз відомі щонайменше дев'ять підвидів нейрамінідази грипу. Їх можна знайти у відомих фахівцям базах даних, як от PubMed database (наприклад,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore> and
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/145284465?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence~ResultsPanel.SequenceRVDocSum>).

Згідно з переважним варіантом здійснення винаходу, полінуклеотидне утворення містить будь-яку з цих послідовностей кодування НА та/або NA, поодинокі або у комбінаціях. Також полінуклеотидне утворення може містити лише частини цих послідовностей. Переважно полінуклеотидне утворення містить повні послідовності або частини послідовностей кодування H1, H2, H3, H5, H6, H7, N1, N2, N3 або N7, поодинокі або у комбінаціях, найкраще H5. в іншому переважному варіанті полінуклеотидне утворення містить повні послідовності або частини послідовностей кодування H1N1, H2N2, H3N2, H6N1, H7N3 або H7N7, найкраще послідовності або частини послідовностей кодування H5N1.

У ще одному переважному варіанті здійснення винаходу діюча речовина являє собою антиген грипу, а полінуклеотидне утворення містить полінуклеотидну послідовність, яка принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 100 % тотожна нуклеїновій кислоті, наведеній у послідовностях № 1 або № 2. Такі полінуклеотидні послідовності оптимізовані за кодонами для ефективною експресії, а саме збудованої на векторі експресії ДНК концепції імунізації антигену грипу у суб'єкті-ссавці, переважно на одній або обох послідовностях кодування грипу НА та NA, найкраще на послідовностях кодування H5 та N1 відповідно. Полінуклеотидне утворення може також містити, наприклад, полінуклеотидні послідовності, які гібридизуються у додаткову спіраль із зазначених нуклеотидних послідовностей (нуклеїнової кислоти, наведеній у послідовностях № 1 або № 2) або являють собою дегенерати вищенаведених нуклеотидних послідовностей. Терміни "гібридизуються" та "гібридизація" означають процес, у якому односпіральный полінуклеотид об'єднується з додатковою полінуклеотидною спіраллю. У цьому винаході гібридизація відбувається у нормальних умовах, переважно за жорстких вимог, як описано у Sambrook et al. (2000), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. Придатні жорсткі вимоги можуть полягати у фізрозчині біля 0.9 M та температурах від 35 °C до 65 °C. Під жорсткими умовами гібридизації можуть матися на увазі:

Буферний розчин гібридизації: 7 % SDS (додецилсульфату натрію)

250 mM NaCl

250 mM К-фосфатного буферу з pH 7.0

1 mM EDTA

Температура гібридизації: 58 °C – 60 °C

Тривалість гібридизації: усю ніч

Промивний буфер: (I) 2 × SSC (буферу для денатурації), 0.1 % SDS

(II) 0.2 × SSC, 0.1 % SDS

Температура та час промивки: each 2 × 30 хв кожна при 55 °C – 60° C.

Зазначені полінуклеотиди, які принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 100 % тотожні нуклеїновій кислоті, наведеній у послідовностях № 1 або № 2, також містять фрагменти, похідні, аналоги або частини полінуклеотидних послідовностей. Ці фрагменти, похідні, аналоги або частини можуть також біти природними варіаціями або наслідком мутацій, які можуть мати природні причини або бути причиненими цілеспрямованим мутагенезом. Більш того, такі варіації можуть містити синтезовані послідовності.

Термін "фрагменти" треба розуміти як частини полінуклеотидної послідовності, достатньо довгі, щоб закодувати один з описаних поліпептидів. Термін "похідне" тут означає, що послідовності відрізняються описаних вище полінуклеотидних послідовностей в одній або кількох позиціях, але мають високий ступінь гомологічності до цих послідовностей. Гомологічність означає тотожність принаймні на 40 %, зокрема, принаймні на 60 % - 70 %, переважно принаймні на 80 %, 82 %, 84 %, 86 % або 88 %, а найкраще на принаймні 90 %, 92 %, 94 %, 96 % або 98 %. Варіації вищеописаних полінуклеотидних послідовностей можуть бути наслідком, наприклад, делеції, підстановки, вставки або рекомбінації.

Для визначення ступеню гомологічності (= тотожності) між двома амінокислотами або нуклеотидними послідовностями дві послідовності ставлять поряд і порівнюють амінокислоти

або нуклеотиди у кожній позиції. Якщо одна позиція в обох послідовностях зайнята однаковою амінокислотою або нуклеотидом, то молекули у цій позиції є (=тотожні). Ступінь гомологічності між двома послідовностями є функцією кількості однакових спільних позицій (тобто гомологічність = кількість однакових позицій від загальної кількості позицій \times 100).

Гомологічність розраховується на всю площину послідовності амінокислот або нуклеотидів. Для порівняння різних послідовностей для фахівців існує чимало програм, збудованих на різних алгоритмах. Найбільш надійні результати дають алгоритми Нідлмана та Вунша або Сміта та Вотермана. Для співставлення та порівняння послідовностей можна застосовувати програми "Pileup" (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) або "Gap" та "BestFit" [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970), а також Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))], які включені до програмного пакету GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)]. Значення гомологічності послідовностей, наведені вище у відсотках, можна визначати за допомогою програми "Gap" для всієї площі послідовності з наступними поправками: вага розриву: 50, вага довжини: 3, середня збіжність: 10.000 та середня незбіжність: 0.000. Це можуть бути стандартні поправки до аналізу гомологічності послідовностей.

Цей винахід також стосується застосування полінуклеотидного утворення, яке містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, для створення специфічних антитіл проти зазначеної діючої речовини при випробуванні наступних станів:

- i) наявність або відсутність діючої речовини у композиції, що випробується
- ii) наявність або відсутність будь-якого стороннього або заразного агента у композиції, де антитіло одержують імунізацією суб'єкта полінуклеотидним утворенням і де діючу речовину нейтралізують або інактивують зазначеним антитілом.

Застосування полінуклеотидних утворень згідно з винаходом дозволяє швидко, ефективно й надійно випробувати композиції, що містять діючі речовини. Застосування антитіл, одержаних імунізацією суб'єкта полінуклеотидним утворенням, дозволяє уникнути забруднень, які можуть з'явитися при імунізації суб'єкта самою діючою речовиною. Внаслідок того застосування полінуклеотидних утворень за винаходом запобігає хибно негативних результатів випробувань. Крім того, це сприяє виробленню антитіл, які застосовуються у відповідних випробуваннях, а відтак прискорює самі випробування. Це має особливе значення, коли діюча речовина у композиціях, що випробується, являє собою або походить від частки вірусу, бо скорочує час до масового випуску вакцини. У цілому при застосуванні полінуклеотидного утворення, яке містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, для вироблення специфічних антитіл проти тієї самої діючої речовини відсутність будь-якої активності композиції є ознакою того, що антитіла повністю нейтралізували або інактивували діючу речовину і що композиція, що випробується, більш не містить жодних антигенів.

Відсутність будь-якої активності у відповідь на дану діючу речовину в композиції, що випробується, означає, що наявна у композиції діюча речовина була нейтралізована або інактивована внаслідок специфічного зв'язування з антитілом до діючої речовини. Нейтралізована діюча речовина взаємодіє із специфічним антитілом, наприклад, утворюючи з ним комплекс. А відтак стає нездатною до активності, переважно нейтралізована діюча речовина стає цілком неефективною. Неефективна діюча речовина у сенсі цього винаходу, наприклад, більш нездатна виконувати свою фармакологічну або імунологічну функцію. Також неефективна діюча речовина стає неспроможною спричинювати будь-яку патогенну дію при контакті з активними лініями детекторних клітин, чутливих до діючої речовини. Нейтралізуючу спроможність антитіла можна випробувати, як описано вище. Однак композиція, яка визнана активною, ще містить діючі речовини, а значить, є ефективною.

Полінуклеотидне утворення, діюча речовина, композиція, що випробується, і сторонній або заразний агент описані вище, як і імунізація придатного суб'єкта та нейтралізація діючої речовини. Переважно діючою речовиною є антиген, краще вірусний антиген або вірусна частка, або діюча речовина містить принаймні один компонент вірусу або вірусної частки, переважно діючою речовиною є частка вірусу грипу. Переважно композиція, що випробується, являє собою пробу клітинної культури, в якій виробляється діюча речовина, або продукт, одержаний з цієї клітинної культури, причому переважно композиція, що випробується, являє собою фармацевтичну композицію, краще за все препарат вакцини або його проміжний продукт. Також переважно композиція, що випробується, являє собою вірус-затравку або композицію, що містить вірус-затравку, відповідно.

Також є бажано, щоб сторонній або заразний агент являв собою вірус, як описано вище.

Із застосуванням полінуклеотидного утворення, яке містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, для створення специфічного антитіла проти цієї діючої

речовини можна проводити контрольні випробування (позитивні або негативні). При цьому композицію випробують, зокрема, на наявність або відсутність у неї діючої речовини, проти якої спрямоване антитіло. Для цього антитіло, одержане імунізацією придатного суб'єкта полінуклеотидною композицією, вводять у контакт із композицією, що випробується. Якщо композиція, що випробується, не виявляє жодної активності після додання специфічного антитіла, це означає наявність діючої речовини у композиції. За бажанням можна перед контактом специфічного антитіла з композицією, що випробується, випробувати нейтралізуючу спроможність антитіла, як описано вище.

У подальшому переважному варіанті здійснення винаходу за допомогою полінуклеотидного утворення, яке містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, можна провести, наприклад, випробування на сторонні агенти, як описано вище.

Цей винахід також стосується способу одержання фармацевтичної композиції, зокрема вакцини, однією з операцій якого є спосіб випробування композиції на сторонні агенти, як описано вище. Випробування на сторонні агенти можна проводити на будь-якій стадії виробничого процесу фармацевтичної композиції. Переважно випробування проводять на партіях посівного матеріалу або зборі вірусних клітин, що вирости, краще на партіях посівного матеріалу. Більш того, випробування можна проводити й повторно, наприклад, на початку та наприкінці культивування клітин, а також у його середині. Випробування на сторонні агенти можна також виконувати на готових препаратах вакцин, наприклад, на одній або кількох пробах продукційної партії.

За бажанням проводять операцію обробки фармацевтичної композиції, зокрема, вакцини або її проміжного продукту, та/або клітинної культури, з якої одержують фармацевтичну композицію або вакцину, причому сторонній агент видаляють та/або інактивують. Прийоми видалення стороннього агента з відповідної композиції або клітинної культури відомі фахівцям і полягають у хімічному та/або фізичному видаленні або інактивації, наприклад, фільтрації, абсорбції, хімічній обробці, наприклад, формальдегідом або бета-пропіолактоном, таких фізичних методах, як нагрівання та/або електромагнітне опромінювання (наприклад, ультрафіолетове або гамма-опромінювання) тощо. Додатковою перевагою застосування способу за винаходом є те, що після виявлення наявності стороннього агента можна підібрати конкретно під нього шлях його інактивації та/або видалення. Наприклад, якщо у композиції, що випробується, виявлено сторонній агент, можна вдаватися до того методу видалення та/або інактивації, який гарантовано видаляє та/або інактивує саме цей агент. Видалення та/або інактивація такого стороннього агента дозволяє уникнути відбраковування всієї партії композиції, заощаджуючи таким чином час і кошти.

Також цей винахід стосується використання антитіла, створеного проти продукту експресії полінуклеотидного утворення, яке містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, де антитіло специфічно прив'язується до діючої речовини, для очистки зазначеної діючої речовини, причому антитіло та діюча речовина одержані з різних полінуклеотидних утворень. Вирази "антитіло, створене проти продукту експресії полінуклеотидного утворення" та "антитіло та діюча речовина одержані з різних полінуклеотидних утворень" розглянуто вище. Термін "очистка" тут означає, зокрема, афінну очистку, коли білки очищують, утримуючи їх у колонці завдяки спорідненості з іншими білками, наприклад, антитілами (одержаними, як описано вище), які було імобілізовано на твердій підкладці, наприклад, колонці, та розділяють різні антигени. Переважно діючою речовиною є вірусний антиген, зокрема, антиген грипу. Застосування антитіла згідно з винаходом дозволяє швидку та високоспецифічну очистку вірусних часток, які походять від штаму вірусу, який треба очистити, або представляють цей штам, оскільки антитіла, що використовуються при очистці, специфічно створені проти продукту експресії саме цього штаму вірусу.

Переважно антитілом, яке використовується для очистки діючої речовини, є описане вище антитіло. Також переважно антитіло, яке використовується для очистки діючої речовини, містить мітку спорідненості для прив'язування до твердої фази.

Далі, цей винахід стосується полінуклеотиду, який містить послідовність, що принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 98 % збігається з нуклеїною кислотою, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2. Такий полінуклеотид описано вище.

Цей винахід також стосується полінуклеотидного утворення, що містить послідовність, яка принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 98 % збігається з нуклеїною кислотою, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2. Найкраще полінуклеотидне утворення містить полінуклеотид, який містить послідовність, наведену в описах послідовностей № 1 або 2.

Зазначений поліпептид описано вище, як і полінуклеотидне утворення.

Інший аспект цього винаходу пов'язаний з прокаріотичними або еукаріотичними клітинами-хазяями, які містять полінуклеотиди згідно з винаходом або полінуклеотидні утворення із вмістом зазначеного полінуклеотиду. Переважно клітини-хазяї стабільно або перехідно трансформовані зазначеними полінуклеотидними утвореннями згідно з винаходом. Треба зазначити, що трансформація відбувається за стандартними протоколами, які наведені, наприклад, у

Sambrook et al. (2000), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold

Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. Також у винаході йдеться про нелюдські організми, трансгенних тварин, а також трансгенні мікроорганізми, які містять зазначені полінуклеотиди, або вектори, або полінуклеотидні утворення згідно з винаходом.

Переважно клітини-хазяї тварин та мікроорганізмів за винаходом приймають експресію та синтезують поліпептид, що зв'язує антигени, згідно з винаходом.

Ці клітини-хазяї можуть бути прокаріотичними або еукаріотичними; переважно це клітини мікроорганізмів, краще клітини бактерій, дріжджів, грибків та водоростей. Особлива перевага серед клітин мікроорганізмів надається клітинам *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Pichia pastoris* або *Schizosaccharomyces*, а найкращими є клітини *Escherichia coli*.

Далі, згідно з винаходом пропонується антитіло, специфічне до поліпептиду, кодованого полінуклеотидом згідно з винаходом, та спосіб одержання такого антитіла, згідно з яким:

а) виробляють полінуклеотидне утворення згідно з винаходом та

б) імунізують придатний суб'єкт, переважно придатну нелюдську тварину, наприклад, мишу, щура або кроля, а найкраще кроля, зазначеним полінуклеотидним утворенням.

Полінуклеотидне утворення та суб'єкт імунізації описані вище. Антитіла можна витягати будь-яким відомим фахівцям чином. Антитіла можна використовувати, наприклад, для нейтралізації або видалення специфічного антигену.

Цей винахід також передбачає застосування набору з елементів для випробування композиції на сторонні агенти, яке включає

а) полінуклеотидне утворення, яке містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини

с) клітину-хазяїн.

Терміни "сторонній агент", "полінуклеотидне утворення", "діюча речовина" та "клітина-хазяїн", як і спосіб випробування на сторонні агенти, розглянуті вище.

Винахід також стосується набору з елементів, який містить

а) полінуклеотидне утворення, яке містить послідовність, що принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 98 % збігається з нуклеїновою кислотою, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2, або полінуклеотидне утворення, яке містить послідовність, наведену в описах послідовностей № 1 або 2,

б) клітину-хазяїн.

Терміни "сторонній агент", "полінуклеотидне утворення", "діюча речовина" та "клітина-хазяїн" розглянуті вище.

Полінуклеотидне утворення, яке містить послідовність, що принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 98 % збігається з нуклеїновою кислотою, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2, або полінуклеотидне утворення, яке містить послідовність, наведену в описах послідовностей № 1 або 2, використовують для трансформації придатних клітин-хазяїв, як от клітини бактерій, дріжджів, грибків, водоростей, рослин або комах, переважно бактеріальних клітин, як клітини *E. coli*. Трансформовані клітини-хазяї культивують у придатному середовищі, а потім збирають та лізують, виділяючи полінуклеотидне утворення. Підсилене полінуклеотидне утворення можна далі використовувати для імунізації суб'єкта, як описано вище. Імунізований суб'єкт, у свою чергу, виробляє антитіла, спрямовані проти продукту експресії полінуклеотидного утворення, у даному випадку проти білку, який становить принаймні частину діючої речовини. Ці антитіла надалі використовуються для випробування на сторонні агенти композиції, що містить принаймні одну діючу речовину, кодовану, принаймні частково, послідовністю, що принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 98 % збігається з нуклеїновою кислотою, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2, або кодовану, принаймні частково, послідовністю, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2.

Спосіб випробування зазначених сторонніх агентів у композиції описаний вище.

Винахід докладніше ілюструється наступними прикладами та кресленнями, які, проте, слугують лише для ілюстрації й жодним чином не обмежують обсяг винаходу.

Короткий опис креслень

Фіг. 1 показує нуклеотидну послідовність оптимізованого за кодонами антигену гемоглітиніну (НА; опис послідовності № 1). Перший та три останні нуклеотиди (підкреслені) представляють початок та припинення кодону відповідно.

Фіг. 2 показує нуклеотидну послідовність оптимізованого за кодонами антигену (НА; опис послідовності № 2). Перший та три останні нуклеотиди (підкреслені) представляють початок та припинення кодону відповідно.

Фіг. 3 показує карту ДНК рCMV-НА, яка містить оптимізовану за кодонами послідовність кодування НА.

Фіг. 4 показує карту ДНК рCMV-НА, яка містить оптимізовану за кодонами послідовність кодування НА.

Фіг. 5 показує цілі плазмідні ДНК послідовності рCMV-НА. Ферменти рестрикції плазмідного утворення підкреслені, а оптимізована за алгоритмом CODA послідовність генів НА виділена жирним.

Фіг. 6 показує цілі плазмідні ДНК послідовності рCMV-НА. Ферменти рестрикції плазмідного утворення підкреслені, а оптимізована за алгоритмом CODA послідовність генів НА виділена жирним.

Приклади

1. Одержання поліпептиду, що кодує НА та NA, і ДНК утворення

Готують вектори ДНК з відомих послідовностей білків гемоглітиніну (НА) та нейрамінідази (НА) вірусу WietNam/1194/2004 (H5N1) (послідовності кодування НА та NA відповідно наведені у базі даних, PubMed, див. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/145284463?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2,PEntrez,Sequence.SequenceResultsPanel.SequenceRVDocSum>,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/145284406?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2,PEntrez,Sequence.SequenceResultsPanel.SequenceRVDocSum>,

Послідовності кодування НА та NA оптимізують на комп'ютері, як описано, наприклад, у Roth, D. A. et al., "Translational Engineering and Synthetic Biology", Landes Bioscience, 2007.

Зокрема, застосування кодонів та пар кодонів у послідовностях кодування НА та NA оптимізують відповідно до *Oryzoflagus cuniculus*. У межах розумного інтервалу варіювання гомологів, як описано вище, можна також виконати оптимізацію кодонів для інших суб'єктів, імунізованих представленими послідовностями кодування НА та NA. Нетранслюємі регіони на 5° у зворотному напрямку також оптимізують, щоб запобігти появі вторинних структур РНК, які можуть заважати запуску трансляції. Оптимізовані за алгоритмом CODA гени НА та NA складають і клонують до векторів рCMV, які можна купити у низки постачальників, наприклад, Clontech Laboratories, Inc. Обидва утворення рCMV посідають наступні особливості:

- вектор експресії цитомегаловірусу (CMV) у ссавців, що активується промотором й використовується для вироблення високих рівнів транскриптів РНК,

- консенсусну послідовність Козака, яка розміщена перед стартовим кодоном ATG для забезпечення ефективного зв'язування рибосом, а відтак максимального рівня трансляції білку,
- сигнал термінації транскрипції полі(А)сигнал, розміщений у кінці гену для забезпечення правильного припинення транскрипції.

Оптимізовані за алгоритмом CODA гени НА та NA субклонують до вектора CMV, що активується промотором, за допомогою ферментів рестрикції (Nhe I та Xba I) й називають їх рCMV-НА та рCMV-NA відповідно. Правильність послідовностей підтверджують гідролізом ферменту рестрикції та секвенуванням ДНК. Карти векторів та послідовності ДНК представлені на фіг. 3-6.

ДНК утворення роздільно трансфектують до клітин *E. coli*, з яких готують банк вихідних клітин (МСВ). Його випробують на стерильність, бактеріофаги, утримування маркерів плазмиду та ідентифікацію плазми дів за стандартними методиками, відомими фахівцям.

2. Утворення плазмиду

Великомасштабне вироблення плазмиду здійснюють з культури *E. coli*, після чого плазмиди виділяють, очищують та характеризують. Очищену масу плазмиду випробують на цілісність ДНК, співвідношення OD 260/280, аналіз агарозного гелю, аналіз рестрикції, послідовність ДНК, білки-забруднювачі та ендотоксини за стандартними методиками, відомими фахівцям.

3. Імунізація тварин і вироблення антисироватки

Далі виробляють антисироватку, імунізуючи 2 групи по 6 кролів. Кожного кроля інокулюють 0,5 мл ДНК матеріалу (тобто плазмиду) у 0-й, 28-й та 56-й дні досліду. Кожна доза містить 1,0 г сумарної ДНК. Одну групу кролів імунізують одновалентною ДНК НА, а другу – двохвалентною 1:1 сумішшю ДНК НА та NA. Проби крові до та після імунізації беруть у всіх тварин у 0-й, 28-й, 35-й, 42-й та 56-й дні. На 70-й день усіх тварин умертвляють знекровлюванням. Усі кролі були

здорові, активні й не виявляли жодних клінічних ознак протягом усього періоду спостережень. Вії лишалися здоровими, дожили до кінця дослідів й не виявляли реакцій на антиген.

Одержану кров з вмістом вироблених антитіл можна переробити, наприклад, на проби сироватки з вмістом нейтралізуючих антитіл або ізолювати антитіла, специфічні до плазмиду/продукту вектора експресії.

4. Випробування на нейтралізацію

Проби сироватки з зібраної крові випробують на нейтралізуючу спроможність проти робочого вірусу-затравки (WSV) пандемічного штаму NIBRG-14. NIBRG-14 – це реасортантний штам типу Wiet Nam/1194/2004, що його використовують для вироблення вакцин; цей штам можна одержати з NIBSC (див. <http://l-w.nibsc.ac.uk/> та <http://www.nibsc.ac.uk/flu~site/pandemic.html>). Випробування сироватки на нейтралізацію проводять таким чином:

Після подвійного розбавлення WSV змішують послідовно із зразками останнього забору крові 12 кролів, підданих чотирьом трикратним розбавленням. Розбавлення сироватки проводять в окремі колби, а потім гомогенізують та покривають краї легким трясінням у колбі. WSV закачують піпеткою прямо до розбавленої сироватки, а одержану суміш злегка гомогенізують. Розбавлений розчин переливають до нової чистої колби та інкубують 2 години при 37 °C, злегка помішуючи на хитній пластині.

За день до інокуляції клітин готують колби по 75 см³ для кожної лінії клітин: 6 колб для нейтралізованого WSV, одна для позитивного контролю та контролю інгібування, одна для негативного контролю.

Позитивний контроль

Позитивний контроль відповідає інокуляції біля 1000 TCID₅₀ ("ефективних доз тканинної культури" – кількості патогенного агента, яка викликає патологічні зміни у 50 % клітинних культур) вірусу людського парагрипу 3. Один позитивний контроль можна інокулювати на 0-й день, щоб він слугував як позитивний контроль для випробування гемадсорбції та/або гемаглютинації на 14-й день.

Контроль інгібування

Цільові клітини інокулюють випробуваною пробою, в яку перед тим впорскують біля Target cells can be inoculated with the sample to be tested previously spiked with about 1000 TCID₅₀ вірусу людського парагрипу 3.

Негативний контроль

Для негативного контролю кожен ліній клітин інокулюють специфічним для неї розбавлюючим середовищем. Цей контроль знаходиться у тих саме умовах, що й дослідна проба.

Інокуляція

Далі оброблений, тобто потенційно нейтралізований, розбавлений розчин WSV інокулюють до трьох ліній детекторних клітин (клітини Vero cells (одержані від American Type Culture Collection (ATCC) CCL-81; Yasumunra Y. et al., 1962), клітини MRC-5 (одержані від ATCC CCL-171; Jacobs J. P. et al., 1970) та клітини MDCK (ECACC 84121903; S. H. Darby, 1958)). До кожної колби інокулюють по 3 мл кожного розчину (розбавник, проба) для потенційно нейтралізованого WSV й контролів. Після 70+/-10 хвилин при 37 °C +/- 2 °C інокулят можна видалити. Далі видаляють середовище виживання до кінцевого обсягу 20 мл. Колби з культурою тримають при 37 °C +/- 2 °C у присутності 5 +/- 0.5 % CO₂.

Інокульовані клітини регулярно обстежують 14 днів під інвертованим мікроскопом і перевіряють на наявність цитопатичних ефектів (ЦПЕ) та гемаглютинуючу активність. Нейтралізуюча спроможність виявляється стеженням за ЦПЕ, випробуваннями на гемадсорбцію та гемаглютинацію.

4.1 Стеження за ЦПЕ

Протягом дослідів клітини регулярно обстежують під інвертованим мікроскопом.

4.2 Випробування гемадсорбції

Випробування гемадсорбції проводять наприкінці дослідів (на 14-й день). Моношарові клітини промивають один або два рази буфером PBS. Далі до кожної дучки додають розчин, який містить 0,4 % трьох типів еритроцитів (людські, морських свинок лінії Hartley та півня), у PBS. Гемадсорбція чутлива до вірусної інфекції й дає позитивний результат, коли один з видів еритроцитів фіксується на клітинах. Після інкубації при 5 °C +/- 3 °C протягом біля 30 хвилин клітини досліджують під мікроскопом. Потім дучки інкубують при 37 °C +/- 2 °C ще 30 хвилин і досліджують знову.

4.3 Випробування гемаглютинації

Випробування гемаглютинації проводять на супернатанті клітинних культур з колб, застосованих для випробування гемадсорбції, на 14-й день. Супернатант відокремлюють та освітлюють на центрифугу з малими обертами. Освітлений супернатант вміщують до 6 дучок. До кожної дучки додають розчин, який містить 0,25 % трьох типів еритроцитів (людські, морських свинок лінії Hartley та півня), у PBS. Після витримки біля 30 хвилин при 5 °C+/-3 °C супернатанти досліджують під мікроскопом. Потім 6 дучок інкубують при 37 °C+/-2 °C ще 30 хвилин і досліджують знову. Досліджена проба вважається вільною від вірусних забруднень специфічних ліній клітин, якщо в ній не помічені вірусні CPE й немає ознак специфічної активності при гемадсорбції та/або гемаглютинації.

Додатково досліджують ще 48 зразків крові за тією самою методикою, але використовують лише одну лінію клітин (MDCK). Результати порівнюють з одержаними з використанням сироватки, одержаної після інокуляції кролів інактивованим реасортантним вірусом типу WietNam/11203/2004 - штамом, який викликає антитіла з перехресною реакцією проти WietNam/1194/2004 у тхорів.

4.4 Курячі яйця з ембріонами

Згідно з Європейською Фармакопеєю, 6 видання, розділ 2.6.16, випробування гемаглютинації можна проводити на курячих яйцях з ембріонами.

Застосовують SPF (вільні від специфічних патогенів) яйця (походженням з Couvoir de Cerveloup, 400, domaine de Cerveloup 38210 Vourey, Франція), які після одержання витримували при 12 °C +/- 3 °C, їх піддають інкубації при 37 °C +/- 2 °C та вологості повітря 70 %.

Приготування проб

WSV нейтралізують антисироваткою від кролів чи овець. Можна додати 1 % водний розчин антибіотиків, щоб запобігти бактеріальному зараженню яєць. Далі проби впорскують до яєць відповідними голками.

Попередня інкубація яєць

Після одержання і до інкубації яйця перевіряють і відбраковують пошкоджені. Далі яйця інкубують при 37 °C 9-11 днів. Наприкінці попередньої інкубації яйця знову перевіряють під холодним світлом без нагрівання, відбраковуючи незапліднені яйця й ті, де ембріони померли.

Інокуляція

Для аналізу проби (потенційно нейтралізований WSV) 30 яєць інокулюють після 9-11 днів інкубації через алантоїн, а для контролю інокулюють 25 яєць.

Для негативного контролю яйця інокулюють PBS з доданням антибіотиків (наприклад, 10 яєць), нерозбавленою антисироваткою кролів (наприклад, 5 яєць) та двома видами овечої антисироватки (по 5 яєць на кожний).

Для позитивного контролю у випробуванні гемаглютинації використовують вірус Sendai (нерозбавлений).

Інокуляцію здійснюють наступним чином:

Після дезінфекції шкаралупи 55 яєць у них пробивають отвір та впорскують по 0,5 мл проб через алантоїн. Отвори у шкаралупі замазують і яйця інкубують при 37 °C +/- 2 °C 7 днів. Після закінчення інкубації яйця обстежують і збирають алантоїнову рідину від живих ембріонів. У разі виявлення мертвих ембріонів рідину від них зберігають при < - 70 °C та 5 °C+/-3 °C (у разі бактеріального забруднення) для подальших досліджень.

Випробування гемаглютинації

Наприкінці інкубації проводять випробування гемаглютинації наступним чином:

Рідини освітлюють на центрифугу (2500 g, 10 хвилин) і розливають 200 мкл рідин по чотирьох 96-дучкових планшетах (50 мкл на планшет) для випробувань гемаглютинації.

До двох 96-дучкових планшетів додають 50 мкл розчину, який містить 0,5 % еритроцитів (морських свинок, куплені у Charles River Laboratory, Франція), а до інших двох 96-дучкових планшетів додають 50 мкл розчину, який містить 0,5 % еритроцитів (курячих). Половину планшетів інкубують при 5 °C +/- 3 °C, інші – при кімнатній температурі. Після двох годин інкубації планшети перевіряють на гемаглютинативну діяльність.

Проби, які піддані випробуванню, вважаються вільними від забруднень, якщо у рідинах, відібраних з інокульованих яєць, не помітно жодної специфічної гемаглютинативної діяльності.

5. Випробування на занесені / сторонні агенти

Далі нейтралізуючу сироватку використовують у випробуванні на занесені агенти. Випробування проводиться у відповідності до нормативних документів (Європейська фармакопея, розділ 2.6.16). Випробування проводять на дорослих мишах, мишах-сисунцях та морських свинках, наприклад, у відповідності до вимог Європейської фармакопеї, 2005, розділ 2.6.16 (партія вірусу-затравки). Треба зазначити, що мишей-сисунців можна піддавати інокуляції композицією, що випробується, у віці 1-2 днів. Випробування на вірус, що поширюється у

пташиних тканинах, проводяться у відповідності до вимог Європейської фармакопеї, 2005, розділ 2.6.16 (партія вірусу-затравки та вірусний харвест).

5.1 Дорослі миші: лінія CD1

Три групи по 10 дорослих мишей лінії CD1 (15-20 г, куплені у Charles River Laboratory, Франція) акліматизують протягом принаймні 48 годин. Одній групі вводять нейтралізовану сироватку (30 мкл впорскують внутрішньоцеребрально (Ic), 500 мкл впорскують внутрішньочеревно (IP)), одну групу тримають у резерві на випадок смертей у ході спостереження, а третя група являє собою негативний контроль.

Протягом дослідження мишей регулярно спостерігають (один або два рази на добу). Вважається, що у пробі відсутній вірус, якщо 80 % мишей з групи, яка одержала нейтралізовану пробу, вижили до кінця дослідження (21 день).

5.2 Миші-сисунці лінії CD1

30 мишей у віці 1-2 днів (куплені у Charles River Laboratory) інокують нейтралізованою сироваткою, 10 мишей слугують негативним контролем. Кожному сисунцю впорскують 10 мкл Ic та 100 мкл IP сироватки, що випробується.

Протягом дослідження мишей регулярно спостерігають (один або два рази на добу). Вважається, що у пробі відсутній вірус, якщо 80 % мишей з групи, яка одержала нейтралізовану пробу, вижили до кінця дослідження (14 днів).

5.3 Морські свинки лінії Hartley

3 дев'яти морських свинок (350-450 г, куплені у Charles River Laboratory, Франція), п'ятьом впорскують IP 5000 мкл випробуваної композиції. Чотирьох тварин спостерігають протягом 42 днів як негативний контроль.

Вважається, що у пробі відсутній вірус, якщо протягом дослідження не виявлено наслідків вірусної інфекції (смертей або макроскопічних вражень).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб випробування на сторонні агенти композиції, яка містить принаймні одну діючу речовину, згідно з яким:

а) здійснюють контакт між антитілом, виробленим проти продукту експресії полінуклеотидного конструкту, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, з композицією, яка містить принаймні одну діючу речовину, причому антитіло прив'язується до діючої речовини,

б) визначають наявність або відсутність сторонніх агентів у композиції після стадії а) на тваринних моделях, причому в стадії а) на:

а-1) утворюють антитіло, вироблене проти продукту експресії полінуклеотидного конструкту, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, у якому зазначене антитіло утворюють імунізацією суб'єкта полінуклеотидним конструктом, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, та

а-2) здійснюють контакт між зазначеним антитілом та композицією, яка містить принаймні одну діючу речовину.

2. Спосіб за п. 1, у якому діючу речовину нейтралізують або інактивують зв'язуванням з антитілом перед стадією б).

3. Спосіб за п. 1, у якому на стадії визначення наявності або відсутності сторонніх агентів у композиції:

а) використовують тварину нелюдського виду, яка була інокульована полінуклеотидним конструктом, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, та інокують цю тварину композицією, що випробується,

б) визначають частку тварин, які вижили після певного періоду часу, причому в разі, коли принаймні 80 % інокульованих тварин вижили й не показують ознак інфікування протягом зазначеного періоду часу, композицію вважають такою, що не містить сторонніх агентів, а коли виживають менше 80 % інокульованих тварин та/або принаймні одна тварина показала ознаки зараження за цей період, композицію вважають такою, що містить сторонні агенти.

4. Спосіб за пп. 1, 2, у якому на стадії визначення наявності або відсутності сторонніх агентів у композиції:

а) інокують тварину нелюдського виду композицією, яка підлягає випробуванню й містить нейтралізовану або інактивовану діючу речовину,

б) визначають частку тварин, які вижили після певного періоду часу, причому в разі, коли принаймні 80 % інокульованих тварин вижили й не показують ознак інфікування протягом зазначеного періоду часу, композицію вважають такою, що не містить сторонніх агентів, а коли

виживають менше 80 % інокульованих тварин та/або принаймні одна тварина показала ознаки зараження за цей період, композицію вважають такою, що містить сторонні агенти.

5. Спосіб за п. 3 або 4, у якому тварин нелюдського виду вибирають з-поміж дорослих мишей, сисунців мишей та морських свинок, а частку тварин, що вижили, та наявність ознак інфекції визначають після періоду принаймні 7-10 днів, краще 21 дня після інокуляції композицією, яка підлягає випробуванню, якщо інокульованими тваринами були дорослі миші, після періоду 14 днів після інокуляції композицією, яка підлягає випробуванню, якщо інокульованими тваринами були сисунці мишей, і після періоду принаймні 42 днів після інокуляції композицією, яка підлягає випробуванню, якщо інокульованими тваринами були морські свинки.
6. Спосіб за будь-яким з пп. 3-5, у якому інокуляцію композицією, яка підлягає випробуванню, проводять внутрішньоцеребрально та/або внутрішньочеревно.
7. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому стадію визначення наявності або відсутності сторонніх агентів у композиції здійснюють у відповідності до нормативних документів, переважно у відповідності до вимог Європейської Фармакопеї, 2005, розділ 2.6.16.
8. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому композицією, яка підлягає випробуванню, є проба клітинної культури, з якої виробляють діючу речовину, або продукт, одержаний із зазначеної клітинної культури, або вірус-затравка, або композиція, що містить вірус-затравку.
9. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому композиція являє собою фармацевтичну композицію, переважно препарат вакцини або його проміжний продукт.
10. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому діючою речовиною є антиген, переважно вірусний антиген, або діючою речовиною є принаймні один компонент вірусу чи частка вірусу, найкраще діючою речовиною є частка вірусу грипу.
11. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому антитіло одержують імунізацією суб'єкта полінуклеотидним конструктором.
12. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому антитіло та діючу речовину одержують з різних полінуклеотидних конструкторів.
13. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому антитіло використовують для випробування вірусів як сторонніх агентів.
14. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому полінуклеотидний конструктор містить послідовність кодування НА (гемаглютинину) та/або NA (нейрамінідази).
15. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому полінуклеотидний конструктор, який містить послідовність, що кодує принаймні частину діючої речовини, є оптимізований за колонами, зокрема, для суб'єктів, що використовуються для імунізації полінуклеотидним конструктором.
16. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому полінуклеотидний конструктор містить послідовність, яка принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 98 % збігається з нуклеїновою кислотою, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2, або полінуклеотидний конструктор містить послідовність, наведену в описах послідовностей № 1 або 2.
17. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому полінуклеотидний конструктор міститься в організмі нелюдських видів, трансгенній тварині або мікроорганізмі.
18. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому антитіло специфічне до поліпептиду, закодованого полінуклеотидом, як визначено у пункті 17.
19. Спосіб за п. 18, у якому антитіло одержують способом, згідно з яким:
 - а) створюють полінуклеотидний конструктор за п. 16,
 - б) імунізують придатний суб'єкт зазначеним полінуклеотидним конструктором.
20. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, у якому діюча речовина являє собою антиген грипу, а полінуклеотидний конструктор містить послідовність, яка принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 98 % збігається з нуклеїновою кислотою, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2, а в оптимальному варіанті діюча речовина являє собою антиген грипу, а полінуклеотидний конструктор містить послідовність, наведену в описах послідовностей № 1 або 2.
21. Застосування антитіла, яке одержують імунізацією суб'єкта полінуклеотидним конструктором, який містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, де діюча речовина нейтралізована або інактивована зазначеним антитілом, при випробуванні на будь-який з наступних станів:
 - i) наявність або відсутність діючої речовини у композиції, що випробується,
 - ii) наявність або відсутність будь-яких сторонніх або заразлих агентів у композиції.
22. Спосіб одержання фармацевтичної композиції, зокрема вакцини, у якому принаймні на одній стадії виробничого процесу:
 - а1) здійснюють спосіб за будь-яким з пп. 1-20, або

а2) здійснюють застосування за п. 21; а за бажанням також

б) обробляють фармацевтичну композицію, зокрема вакцину, або її проміжний продукт, та/або обробляють клітинну культуру, з якої походить фармацевтична композиція або вакцина, з метою виділення та/або інактивації стороннього агента.

5 23. Застосування антитіла, виробленого проти продукту експресії полінуклеотидного конструкту, який містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, де антитіло специфічно прив'язується до діючої речовини, з метою очищення від зазначеної діючої речовини, причому антитіло та діюча речовина походять з різних полінуклеотидних конструктів.

24. Застосування набору елементів, який містить

10 а) полінуклеотидний конструкт, що містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини та

б) клітину-хазяїн,

для випробування сторонніх агентів у композиції згідно із будь-яким з пунктів 1-20.

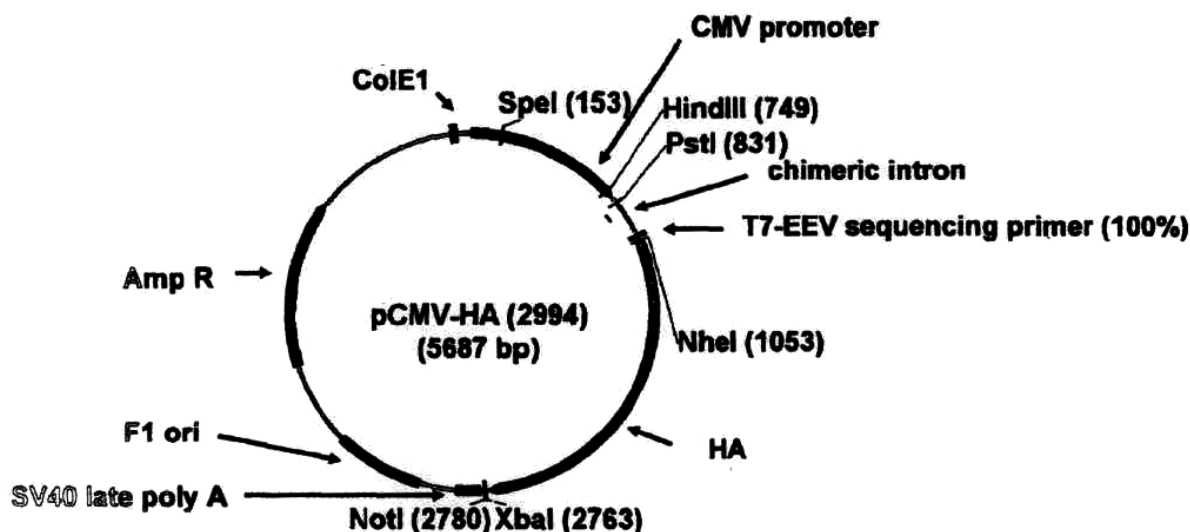
15 25. Застосування за п. 24, у якому полінуклеотидний конструкт містить послідовність кодування принаймні частини діючої речовини, яка принаймні на 90 %, переважно принаймні на 95 %, а найкраще на 98 % збігається з нуклеїновою кислотою, наведеною в описах послідовностей № 1 або 2, або полінуклеотидний конструкт містить послідовність, наведену в описах послідовностей № 1 або 2.

ATGGAGAAAATTGTGCTGCTGTTCCGCATTGTGTCCCTGGTGAAGTCCGACCAGATCTGCATCGGCTA
 TCACGCCAACAACTCCACCGAGCAGGTGCACACCATTATGGAAAAGAATGTGACCGTGACCCATGCAC
 AAGACATCCTGGAAAAGACCCACAACGGCAAACTGTGCGACCTGGACGGCGTGAAGCCCCTGATCCTG
 CGCGACTGCTCCGTGGCTGGGTGGCTGCTGGGAAACCCTATGTGCGACGAGTTCATCAATGTGCCCGA
 GTGGTCCTACATCGTTGAGAAAGCCAACCCCGTCAACGACCTGTGTTACCCCGGTGACTTCAACGACT
 ACGAGGAGCTCAAGCACCTGCTCTCCCGGATCAACCACCTTCGAGAAAATCCAGATCATCCCCAAATCC
 TCCTGGTCCAGCCACGAAGCCTCCCTCGGCGTGTCTCCGCTTGCTCCCTACCAGGGCAAGTCCTCCTT
 CTTCCGCAACGTGCTGTGGCTGATCAAAAAGAACTCCACCTACCCCAACCATTAAGCGGTCTTACAACA
 ACACCAACCAGGAAGACCTGCTGGTGCTGTGGGGCATCCACCATCCCAACGACGCCGCTGAGCAGACC
 AAGCTGTACCAGAACCCTACCACCTACATCTCCGTCCGGGACATCCACACTGAACCAGCGCCTCGTGCC
 CCGCATTGCCACCCGCGAGCAAGGTGAATGGGCAGTCCGGCCGCATGGAGTTCTTCTGGACAATCCTGA
 AGCCCAACGACGCTATCAACTTCGAGTCCAACGGCAACTTCATCGCTCCCGAGTATGCCTACAAGATC
 GTTAAAAAGGGCGACTCCACAATCATGAAGTCCGAGTTGGAGTACGGCAACTGCAACACCAAGTGCCA
 GACACCCATGGGCGCTATCAACTCCTCCATGCCCTTCCACAACATCCATCCCTGACCATTGGCGAGT
 GCCCCAAGTACGTCAAGTCCAACCGGCTGGTCCTGGCTACCGGCCTCCGCAACTCCCCTCAAAGGGAA
 CGCAGGCGCAAAAAGAGAGGCCTGTTCCGAGCCATAGCTGGGTTTATTGAGGGAGGGTGGCAGGGCAT
 GGTGGATGGGTGGTACGGCTACCATCACTCCAACGAGCAGGGCTCCGGGTATGCCGCCGACAAGGAGT
 CCACCCAGAAGGCCATTGACGGCGTGACCAACAAGGTGAACAGCATCATCGACAAGATGAACACCCAG
 TTCGAGGCTGTTGGCCGGGAGTTCAACAACCTTGAGCGCCGCATCGAGAACCTGAACAAAAAGATGGA
 GGACGGCTTCTTGATGTGTGGACCTACAACGCTGAGCTCCTGGTGCTGATGGAGAACGAGCGGACCC
 TGGACTTCCACGACTCCAACGTCAAGAACCTGTACGACAAAGTGCGCCTCCAGCTGCGGGACAACGCC
 AAGGAGCTCGGGAATGGCTGCTTCGAGTTCTACCACAAGTGCGACAACGAGTGATGGAGTCCGTGCG
 CAATGGCACCTACGACTATCCCCAGTACTCCGAAGAGGCCCGCCTGAAGCGCGAAGAGATCTCCGGGG
 TGAAGTTGGAGTCCATTGGCATCTACCAGATCCTGAGCATCTACTCCACCGTGGCTTCTCCTCCCTCGCC
 CTCGCCATTATGGTGGCTGGCCTGTCCCTGTGGATGTGCTCCAACGGCTCCCTGCAATGTCGCTAA

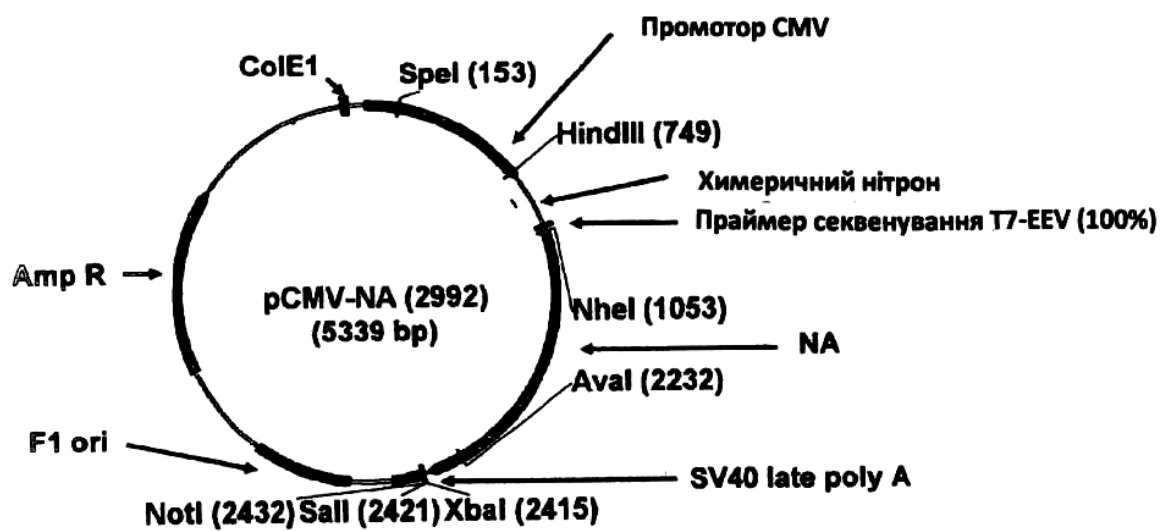
Фіг. 1

ATGAACCCCAACCAGAAGATCATCACCATTGGCAGCATCTGCATGGTGACCGGGATCGTTAGCCTGAT
 GCTGCAGATCGGCAACATGATCAGCATCTGGGTGTCCACAGCATCCATACCGGCAACCAGCACCAGT
 CCGAGCCCATCTCCAACACCAACCTGCTGACCGAGAAAGCTGTGCCTCCGTGAAGCTGGCTGGCAAC
 TCCTCCCTGTGTCCTATCAATGGGTGGGCTGTGTACTCCAAGGACAACTCCATTTCGCATCGGCAGCAA
 AGGGGATGTCTTCGTGATCCGCGAGCCTTTTCATCTCCTGTAGCCACCTCGAATGCCGGACCTTCTTCC
 TGACACAAGGAGCCCTGCTGAACGACAAGCACTCCAACGGCACCGTGAAGGACCGCTCTCCCCACCGC
 ACCCTGATGTCCTGCCCCGTGGCGAAGCCCCCTAGCCCCCTACAACCTCCCGGTTTCGAGTCCGTGCGCTG
 GAGCGCCTCTGCCTGTCATGATGGGACCTCTTGGCTGACCATTGGCATCTCCGGCCCTGATAATGGAG
 CAGTGGCTGTGCTGAAGTACAACGGCATCATCACCATAACCTTAAGTCTGGCGCAACAACATCCTC
 CGCACCCAGGAGTCCGAGTGTGCCTGTGTCAATGGCTCGTGCTTTACCGTGATGACCGATGGGCCAAG
 CAATGGACAAGCCTCCCAACAAGATCTTCAAGATGGAAAAGGGCAAGGTGGTGAAGTCCGTGAGTTGG
 ACGCCCCTAATTACCACTACGAGGAGTGCAGCTGTTACCCTGACGCTGGGGAGATCACCTGTGTGTGC
 AGGGACAACCTGGCACGGGAGCAACAGGCCTTGGGTCTCCTTCAACCAGAACTTGGAGTACCAGATCGG
 CTACATCTGTTCCGGGGTGTTCGGGGATAATCCCAGGCCTAACGATGGCACCGGGTCTGTGGCCCTG
 TGAGCTCCAACGGCGCAGGCGGGGTCAAGGGCTTCTCGTTCAAATATGGCAATGGCGTGTGGATCGGG
 CGCACCAAGTCCACAACTCCCGGTCCGGCTTCGAGATGATCTGGGACCCCAATGGATGGACCGAGAC
 AGACAGCTCCTTCTCCGTCAAGCAGGACATTGTGGCTATCACCGACTGGAGCGGGTACAGCGGCAGCT
 TCGTGCAGCACCCCGAGCTCACAGGCCTCGACTGCATTGCGCCCTGCTTTTGGGTGGAAGTATCCGG
 GGACGGCCTAAGGAGAGCACAACTCTGGACCTCCGGCTCCAGCATCTCCTTCTGCGGCGTGAAGTCCGA
 CACAGTGGGGTGGTCTTGGCCTGACGGAGCTGAAGTGCCCTTCACCATTGACAAGTAA

Фиг. 2



Фиг. 3



Фіг. 4

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCAT
 TGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGT
 TGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
 GGAGTTCGCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAT
 TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTTCATTGACGTCAATGGGTG
 GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTAT
 TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTTCCTA
 CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAAT
 GGGCGTGGATAGCGGTTTGA CTACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTT
 GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGG
 GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCACTAGA
 AGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAGTCTC
 GAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTT
 AAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTTCTGATAGGCACCTATT
 GGTCTTACTGACATCCACTTTGCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCGATTCAATTACAGCTCTTA
 AGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCGCCACCATGGAGAAAATTGTGCTGCTGTTTCG
 CCATTGTGTCCCTGGTGAAGTOCGACAGATCTGCATCGGCTATCACGCCAACCACTCCACCGAGCAG
 GTCGACACCATTATGGAAAAGAAATGTGACCGTGACCCATGCACAAGACATCCTGGAAAAGACCCACAA
 CGGCAAACTGTGCGACCTGGACGGCGTGAAGCCCTGATCCTGCGCGACTGCTCCGTGGCTGGGTGGC
 TGCTGGGAAACCTTATGTGCGACGAGTTCAATGTGCGCGAGTGCTTCTACATCGTTGAGAAAGCC
 AACCCCGTCAACGACCTGTGTTAACC CGGTGACTTCAACGACTACGAGGAGCTCAAGCACTGCTCTC
 CCGGATCAACCACTTCGAGAAAATCCAGATCATCCCAAAATCCTCCTGGTCCAGCCACGAAGCCTCC
 TCGGCGTGTCTCCGCTTGTCCCTACCGGCAAGTCTCTCTTCTTCCGCAACGTGCTGTGGCTGATC
 AAAAAGAACTCCACCTACCCACCATTAAGCGGTCTACAACAACCAACCAGGAAGACCTGCTGGT
 GCTGTGGGGCATCCACCATCCCAACGACGCGCTGAGCAGACCAAGCTGTACCAGAACCCTACCACCT
 ACATCTCCGTCGGGACATCCACACTGAACAGCGCTCGTGCCCCGATTGCCACCCGAGCAAGGTG
 AATGGGCAGTCCGGCGCATGGAGTTCTTCTGGACAATCCTGAAGCCCAACGACGCTATCAACTTCGA
 GTCCAACGGCAACTTCATCGCTCCCGAGTATGCTACAAGATCGTTAAAAAGGGCGACTCCACAATCA
 TGAAGTCCGAGTTGGAGTACGGCAACTGCAACACCAAGTGCCAGACACCCATGGGCGCTATCAACTCC
 TCCATGCCCTTCCACAACATCCATCCCTGACCATTGGCGAGTGCCCCAAGTACGTCAAGTCCAACCG
 GCTGGTCTGCTGCTACCGGCTCCGCAACTCCCTCAAAGGGAAACGCAGGCGCAAAAAGAGAGGCTGT
 TCGGAGCCATAGCTGGGTTCAATTGAGGGAGGGTGGCAGGCGATGGTGGATGGGTGGTACGGCTACCAT
 CACTCCAACGAGCAGGGCTCCGGGTATGCCGCGACAAGGAGTCCACCAGAAGGCCATTGACGGCGT
 GACCAACAAGGTGAACAGCATCATCGACAAGATGAACACCCAGTTGAGGCTGTTGGCCGGGAGTTCA
 ACAACTTGGAGCGCCGCATCGAGAACCTGAACAAAAGATGGAGGACGGCTTCTGGATGTGTGGACC
 TACAACGCTGAGCTCCTGGTGTGATGGAGAACGAGCGGACCTGGACTTCCACGACTCCAACGTCAA
 GAACCTGTACGACAAAGTGGCGCTCCAGCTGCGGGACAACGCCAAGGAGCTCGGGAATGGCTGCTTCG
 AGTTCTACCACAAGTGGGACAACGAGTGTATGGAGTCCGTGCGCAATGGCACCTACGACTATCCCCAG
 TACTCCGAAGAGGCCCCGCTGAAGCGCGAAGAGATCTCCGGGGTGAAGTTGGAGTCCATTGGCATCTA
 CCAGATCCTGAGCATCTACTCCACCGTGGCTTCTCCTCGCCCTCGCCATTATGGTGGCTGGCCTGT
 CCCTGTGGATGTGCTCCAACGGCTCCCTGCAATGTGCTAACTAGAGTGCACCTGGGCGGCCGCTTC
 GAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
 TTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAAGCTGCAATAAACAAGTTAA
 CAACAACAATTGCATTCTATTTTATGTTTTCAGGTTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGT
 AAAACCTCTACAAATGTGGTAAATCGATAAGTATCCGGGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACC
 GATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC
 GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTT
 CGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCC
 CTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGATGGTTCA
 CGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAG
 TGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGA
 TTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGGAATTTTAAAC
 AAAATATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACAC
 CGCATATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCC

Фиг. 5

AACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCG
 TCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTC
 GTGATACGCCATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTT
 TCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA
 TGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTTC
 CGTGTCGCCCTTATTTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGT
 GAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCG
 GTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA
 TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCA
 GAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAT
 TATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGA
 CCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACC
 GGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT
 TCGGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG
 GCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGTGATAAAATC
 TGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTA
 TCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA
 GGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACCTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT
 AAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCC
 CTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGAT
 CCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTT
 GCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATA
 CTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC
 GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTC
 AAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCT
 TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
 GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCT
 TCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGAT
 TTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAACCAAGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTC
 CTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGGCTCGACAGATCT

Фіг. 5 (продовження)

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCAT
 TGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGT
 TGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
 GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAT
 TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG
 GAGTATTTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTAT
 TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTTCCTA
 CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAAT
 GGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
 GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGG
 GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCACTAGA
 AGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATGCTAACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAGTCTC
 GAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTT
 AAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTTCTGATAGGCACCTATT
 GGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAGCTCTTA
 AGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCGCCACCATGAACCCCAACCAGAAGATCATCA
CCATTGGCAGCATCTGCATGGTGACCGGGATCGTTAGCCTGATGCTGCAGATCGGCAACATGATCAGC
ATCTGGGTGTCCACAGCATCCATACCGGCAACCAGCACCACTCCGAGCCCATCTCCAACACCAACCT
GCTGACCGAGAAAGCTGTGCGCTCCGTGAAGCTGGCTGGCAACTCTCCCTGTGTCTATCAATGGGT
GGGCTGTGTACTCCAAGGACAACTCCATTCGCATCGGCAGCAAGGGGATGTCTTCGTGATCCGCGAG
CCTTTCATCTCCTGTAGCCACCTCGAATGCCGGACCTTCTTCCTGACACAAGGAGCCCTGCTGAACGA
CAAGCACTCCAACGGCACCGTGAAGGACCGCTCTCCCCACCGCACCCCTGATGTCTGCCCGCTCGGGC
AAGCCCTAGCCCTACAACTCCCGGTTGAGTCCGTGCGCTGGAGCGCTCTGCCTGTCTATGATGGG
ACCTCTTGGCTGACCATTTGGCATCTCCGGCCCTGATAATGGAGCAGTGGCTGTCTGAACTACAACGG
CATCATCACCGATACCAATTAAGTCTTGGCGCAACAACATCTCCGCACCCAGGAGTCCGAGTGTGCT
GTGTCAATGGCTCGTGCTTTACCGTGATGACCGATGGGCAAGCAATGGACAAGCCTCCCAAGATC
TTCAAGATGGAAAAGGGCAAGGTGGTGAAGTCGTCGAGTTGGACGCCCCTAATTACCACTACGAGGA
GTGCAGCTGTACCTGACGCTGGGGAGATCACCTGTGTGTGCAGGGACAACGGCACGGGAGCAACA
GGCCTTGGGTCTTCCTTCAACCAGAACTTGGAGTACCAGATCGGCTACATCTGTTCGGGGGTGTTCGGG
GATAATCCCAGGCCTAACGATGGCACCGGGTCTCTGTGGCCCTGTGAGCTCCAACGGCGCAGGCGGGGT
CAAGGGCTTCTCGTTCAAAATATGGCAATGGCGTGTGGATCGGGCGCACCAAGTCCACAAACTCCCGGT
CCGGCTTCGAGATGATCTGGGACCCCAATGGATGGACCGAGACAGACAGCTCCTTCTCCGTCAAGCAG
GACATTGTGGCTATCACCGACTGGAGCGGTACAGCGGCAGCTTCGTGCAGCACCCCGAGCTCACAGG
CCTCGACTGCATTCCGGCCCTGCTTTTGGGTGGAACTGATCCGGGGACGGCCTAAGGAGAGCACAACT
GGACCTCCGGCTCCAGCATCTCTTCTGCGGCGTGAACCTCCGACACAGTGGGGTGGTCTCGGCTGAC
GGAGCTGAACTGCCCTTCACCAATTGACAAGTAATCTAGAGTCGACCTGGGCGGGCGCTTCGAGCAGAC

Фиг. 6

ATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTG
 TGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAACAAGTTAACAACAACA
 ATTGCATTCAATTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTC
 TACAAATGTGGTAAAATCGATAAGTATCCGGGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCCGACCGATCGCCC
 TTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGGCGGG
 TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCT
 TCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGG
 TTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGG
 GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAATCT
 TGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCG
 ATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAATAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATT
 AACGCTTACAATTTCTGTGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACACCGCATATG
 GTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCG
 CTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGG
 AGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTTCATCCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACG
 CCTATTTTTATAGGTTAATGTGATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAA
 ATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAA
 TAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCG
 CCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCTTCTGTTTTTGCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA
 AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC
 CTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGC
 GGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACT
 TGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGT
 GCTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTGGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGA
 GCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAAGTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGA
 ATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAA
 CTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAA
 AGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCG
 GTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTT
 ATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTC
 ACTGATTAAGCATTTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTC
 ATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGT
 GAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTT
 TCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATC
 AAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAATCTGTTCTT
 CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCAGCGCCTACATACCTCGCTCTGCT
 AATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGAT
 AGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGA

Фіг. 6 (продовження)

ACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAG
AAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGG
GAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGA
TGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTT
TTGCTGGCCTTTTGCTCACATGGCTCGACAGATCT

Фіг. 6 (продовження)

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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

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