

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038610**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.22

(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201592175

(22) Дата подачи заявки
2014.07.18

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИНАКТИВИРОВАННОГО РОТАВИРУСА

(31) **61/856,294**

(32) **2013.07.19**

(33) **US**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/US2014/047164**

(87) **WO 2015/010002 2015.01.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛАНКО ТИРГЕЗУНДХАЙТ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Дэккер Брент Е., Херберт Джон М.,
Рэймниц Майкл Дж. (US)**

(74) Представитель:
**Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Лыу Т.Н., Глухарёва А.О., Карпенко
О.Ю., Строкова О.В. (RU)**

(56) **WO-A2-2009032913
WO-A1-2008039022**

M.K. ESTES ET AL.: "Rotavirus Stability and Inactivation", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 43, no. 2, 1 May 1979 (1979-05-01), pages 403-409, XP055143707, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/0022-1317-43-2-403, page 404

M.G. BRUCE ET AL.: "Recognition of rotavirus antigens by mouse L3T4-positive T helper cells", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 75, no. 8, 1 August 1994 (1994-08-01), pages 1859-1866, XP055143708, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/0022-1317-75-8-1859, page 1860

BAOMING JIANG ET AL.: "Immunogenicity of a thermally inactivated rotavirus vaccine in mice", HUMAN VACCINES, vol. 4, no. 2, 4 November 2007 (2007-11-04), pages 143-147, XP055026153, page 146

(57) Раскрыты способы получения инактивированного ротавируса непосредственно из супернатантов культуры клеток, содержащих активный или инфекционный ротавирус (например, ротавирус крупного рогатого скота) без предварительного выделения или очистки ротавируса из супернатантов культуры клеток. В некоторых вариантах реализации инактивированный ротавирус (например, ротавирус крупного рогатого скота) получают путем нагревания объема супернатанта культуры по меньшей мере до температуры, при которой инактивируется ротавирус. В некоторых вариантах реализации ротавирус (например, ротавирус крупного рогатого скота) инактивируют один раз во всем объеме путем нагревания по меньшей мере до температуры, при которой инактивируется ротавирус. В некоторых вариантах реализации температуру супернатанта культуры клеток поддерживают в течение подходящего периода времени, который можно определить при помощи любого теста, описанного в изобретении. Затем инактивированный ротавирус (например, ротавирус крупного рогатого скота) может быть выделен из супернатанта культуры.

038610 B1

038610 B1

Область техники

Изобретение относится к получению инаktivированного ротавируса непосредственно из супернатанта культуры клеток. Также описаны композиции, содержащие инаktivированный ротавирус, полученный непосредственно из супернатанта культуры клеток.

Уровень техники

Один из типов вирусных вакцин содержит инаktivированные вирусы. Активные или инфекционные вирусы могут быть инаktivированы таким образом, что они больше не будут являться инфекционными и больше не смогут реплицироваться для получения вирусного потомства. Однако для того, чтобы быть эффективными в составе вакцины, инаktivированные вирусы должны все еще сохранять способность стимулировать иммунный ответ (т.е. сохранять иммуногенность) при введении субъекту.

Существуют различные способы инаktivации ротавирусов. Согласно одному способу ротавирус может быть инаktivирован с применением помощью химических веществ. Согласно одному из примеров в качестве указанного химического вещества можно использовать β -пропиолактон.

Согласно другому способу инаktivации ротавирусов можно использовать нагревание ротавируса (термическую инаktivацию). В известных способах тепловой инаktivации ротавирусов перед термической инаktivацией указанных вирусов вирусы очищают или выделяют из среды, в которой они обычно находятся. В одном примере перед нагреванием или термической инаktivацией ротавирус, размножающийся в культивируемых клетках, выделяли из клеточной культуральной среды или супернатанта, где выращивали инфицированные вирусом клетки (публикация РСТ № WO 2009/032913). В одном примере выделенные ротавирусы затем суспендировали в водном буфере, имеющем определенную осмоляльность (например, 200-500 мОсм), определенную концентрацию соли с двухвалентным катионом (в диапазоне приблизительно от 1 до 15 мМ), определенное количество сахара и/или сахарного спирта (в диапазоне приблизительно от 1 до 20% мас./об.) (публикация РСТ № WO 2009/032913). Выделенные ротавирусы, суспендированные в водном буфере, имеющем определенную осмоляльность, определенную концентрацию соли с двухвалентным катионом и определенную концентрацию сахара и/или сахарного спирта, затем термически инаktivировали.

Сущность изобретения

Раскрыты способы получения инаktivированных ротавирусов из супернатантов культуры клеток, содержащих активные или инфекционные ротавирусы, путем нагревания супернатантов культуры клеток. В одном примере ротавирусы представляют собой ротавирусы крупного рогатого скота. В одном примере указанный способ получения инаktivированного ротавируса включает непосредственное нагревание объема супернатанта культуры клеток, содержащего активный ротавирус, до температуры, при которой инаktivировается ротавирус. Как правило, ротавирус в супернатанте культуры клеток, который непосредственно нагревали, тестируют для подтверждения того, что температура и время нагревания были достаточными и что больше не присутствует активный или инфекционный вирус. В одном примере супернатант культуры клеток не имеет одну или более из следующих характеристик: осмоляльность в диапазоне от 200-500 мОсм, концентрацию соли с двухвалентным катионом в диапазоне приблизительно от 1 до 15 мМ, и сахара и/или сахарного спирта в диапазоне приблизительно от 1 до 20% мас./об. Инаktivированный ротавирус является иммуногенным. Обычно иммуногенность такого термически инаktivированного ротавируса превосходит иммуногенность химически инаktivированного ротавируса, например химически инаktivированного при помощи β -пропиолактона. В различных примерах супернатант культуры клеток можно подвергнуть отфильтрации перед нагреванием. После термической инаktivации инаktivированные ротавирусы могут быть выделены из супернатанта культуры клеток. Тепловую инаktivацию ротавирусов в супернатанте культуры клеток можно выполнять путем нагревания до температуры по меньшей мере приблизительно 60°C или до любой температуре из 65, 70, 75 или 80°C. Данную температуру обычно поддерживают в течение периода времени, по истечении которого ротавирусы являются инаktivированными. В различных примерах данный период времени может составлять 15, 60, 120, 240 мин и другие периоды времени. Как правило, по существу, весь объем супернатанта культуры клеток нагревают до требуемой температуры в течение заданного времени. В одном примере весь объем супернатанта культуры клеток нагревают до требуемой температуры в течение заданного времени. В одном примере способ может также включать стадию замораживания. Замораживание супернатанта культуры клеток можно проводить по меньшей мере приблизительно в течение 12 ч или других периодов времени. В некоторых случаях супернатант культуры клеток, который был нагрет, затем был заморожен, может быть разморожен и снова нагрет, в одном примере, до той же температуры и в течение того же периода времени, что и на начальной стадии нагревания. В одном примере pH супернатанта культуры клеток составляет $7,6 \pm 0,1$.

В другом примере способ получения инаktivированного ротавируса включает отбор супернатанта культуры клеток, содержащего активный ротавирус из культивируемых клеток, инфицированных ротавирусом, и непосредственное нагревание объема супернатанта культуры клеток до температуры, при которой инаktivировается ротавирус. В различных примерах могут быть включены одна или более дополнительных стадий. Например, супернатант культуры клеток можно отфильтровать до непосредственного

нагревания, супернатант культуры клеток можно заморозить после непосредственного нагревания и/или ротавирус можно выделить из супернатанта культуры клеток после непосредственного нагревания. Как правило, ротавирус тестируют после непосредственного нагревания для подтверждения того, что отсутствует активный, инфекционный вирус.

Также раскрыты композиции, содержащие ротавирусы, инаktivированные способами, описанными в настоящем документе. В дополнение к ротавирусу, инаktivированному описанными способами, композиции также могут содержать один или более адъювантов и/или фармацевтически приемлемых носителей. Различные композиции также могут содержать антигены из одного или более инфекционных агентов в дополнение к ротавирусу. Также раскрыты способы стимуляции иммунного ответа у субъекта, включающие введение указанному субъекту композиции, содержащей ротавирусы, инаktivированные способами, описанными в настоящем документе. В одном примере субъект представляет собой крупный рогатый скот. В одном примере композицию вводят субъекту по меньшей мере дважды. Многократное введение может быть отделено друг от друга различными периодами времени, в одном примере, приблизительно от двух до двенадцати недель. Согласно указанному способу указанные композиции можно вводить субъекту с использованием различных путей введения, например подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутрикожного, интранодального (intranodal), интраназального и перорального пути введения.

Также раскрыты антитела, полученные посредством введения субъекту заявленных композиций. Антитела могут применяться в способах для нейтрализации ротавируса путем введения указанных антител к животному.

Подробное описание изобретения

Определения.

В настоящем документе "ротавирус" означает любой ротавирус из семейства Reoviridae. Ротавирусы могут инфицировать людей или животных (например, любые из группы ротавирусов A, B, C, D, E и/или F), включая любые их штаммы, серотипы, генотипы и/или реассортанты. В одном примере ротавирус заражает крупный рогатый скот. Примеры коммерчески доступных вакцин для применения у людей, которые можно получить при помощи способов, описанных в настоящем документе, могут включать Rotarix® (GlaxoSmithKline), RotaTeq® (Merck Sharp & Dohme Corp.) и/или ROTOVAC (Bharat Biotech International). Примеры коммерчески доступных вакцин предназначенных для человека, которые можно получить при помощи способов, описанных в настоящем документе, могут включать ротавирусную вакцину для лошадей (Pfizer), вакцину против ротавирусной диареи телят (Inactivate), Rotavec® Corona (Merck Sharp & Dohme Animal Health), Calf-Guard (Pfizer Animal Health) и тому подобные. Способы, описанные в настоящем документе, можно также использовать для получения вакцины для применения у животных, отличных от человека, таких как отдельные особи/популяции крупного рогатого скота, лошади и свиньи. В настоящем документе "активный ротавирус" или "живой ротавирус" означает, что ротавирусы являются инфекционными или способны размножаться с получением вирусного потомства.

В настоящем документе "неактивный ротавирус" или "мертвый ротавирус" означает, что ротавирусы не являются инфекционными или не способны размножаться с получением вирусного потомства. Такие вирусы иногда могут упоминаться как убитые или инаktivированные. В настоящем документе неактивные ротавирусы получают из активных ротавирусов посредством термообработки.

В настоящем документе "супернатант культуры клеток" или "супернатант культуры" означает среду, которую применяют для поддержания роста культивируемых клеток. Как правило, в настоящем документе клетки инфицированы ротавирусами, и супернатант культуры клеток содержит активное ротавирусное потомство, произведенное инфицированными клетками.

В настоящем документе "непосредственное нагревание объема супернатанта культуры клеток" в отношении ротавирусов, как правило, относится к нагреванию супернатанта культуры клеток до температуры и в течение периода времени для получения полной инаktivации ротавируса без какой-либо предварительной очистки или выделения ротавируса из супернатанта культуры клеток. Таким образом, не происходит очистки или выделения ротавируса из супернатанта культуры клеток перед термической инаktivацией вируса в супернатанте культуры клеток.

В настоящем документе "выделенный ротавирус" означает, что ротавирус был очищен или выделен из супернатанта культуры клеток. В одном примере ротавирус можно выделить из супернатанта культуры клеток при помощи высокоскоростного центрифугирования (для осаждения вируса) и затем суспендировать в водном буфере. Водный буфер, содержащий ротавирус, затем можно нагревать для термической инаktivации в нем ротавируса. Способы согласно изобретению, описанные в настоящем документе, не требуют выделения ротавируса из супернатанта культуры клеток.

Ротавирусы непосредственно из супернатанта культуры клеток.

В настоящем документе раскрыты способы получения инаktivированного ротавируса путем непосредственного нагревания объема супернатанта культуры, содержащего активный ротавирус, до температуры, при которой инаktivировается ротавирус (например, термическая инаktivация), и композиции, содержащие ротавирусы, инаktivированные таким образом. "Непосредственное нагревание объема супер-

натанта культуры клеток, содержащего живой ротавирус", как правило, означает, что супернатант культуры, содержащий активный ротавирус (например, живой, инфекционный, способный размножаться для получения вирусного потомства), не подвергают обработке или манипуляциям (например, не подвергают "предварительной обработке") перед применением нагревания для инактивации ротавируса, кроме сбора для проведения обработки. Вирус не очищают или не выделяют из супернатанта культуры до термической обработки. Термин "инактивированный ротавирус" обычно относится к вирусу, который не является активным, не является инфекционным и не способен размножаться для получения вирусного потомства (например, не является продуктивным). Инактивированный ротавирус может упоминаться как убитый, мертвый и/или непродуктивный. Как правило, по меньшей мере, с целью включения в состав вакцины, желательно, чтобы инактивированный ротавирус сохранял иммуногенность (например, способность стимулировать иммунный ответ) при введении субъекту. Как правило, способы, описанные в настоящем документе, приводят к полной инактивации активных ротавирусов, содержащихся в супернатанте культуры клеток, - не остается активных ротавирусов. Инактивированный ротавирус, полученный при помощи описанных способов, является иммуногенным, это означает, что его введение субъекту будет стимулировать или вызывать иммунный ответ у указанного субъекта. Как правило, ротавирус, инактивированный при помощи способов, описанных в настоящем документе, лучше стимулирует иммунный ответ у субъекта по сравнению с введением эквивалентного количества ротавируса, инактивированного химически с применением β -пропиолактона в качестве одного из примеров (т.е. термически инактивированный ротавирус является более иммуногенным). Поэтому иммуногенность термически инактивированного ротавируса превосходит иммуногенность химически инактивированного ротавируса. Таким образом, например, иммуногенность термически инактивированного ротавируса может быть выше иммуногенности химически инактивированного ротавируса. Иммунный ответ у субъекта можно измерить при помощи различных методов, известных в данной области техники. В одном примере непосредственного нагревания объема супернатанта культуры (например, который также может упоминаться как супернатант культуры клеток), содержащего ротавирус, супернатант культуры можно профильтровать (например, с применением 70, 1,0 и/или 0,45 мкм шприцевого фильтра и т.п.), перед проведением процесса инактивации (например, нагреванием, и т.д.), но в некоторых вариантах реализации это не будет считаться предварительной обработкой супернатанта культуры. Фильтрация обычно может удалять остатки клеток, но не очищать или выделять вирус из супернатанта культуры. Как правило, однако, если проводят фильтрацию, то после по меньшей мере одной стадии нагревания (например, как в примере 1). Процессы известного уровня техники, как правило, требуют какой-либо стадии выделения, очистки или стадии концентрирования вируса перед инактивацией ротавируса. Способы, описанные в настоящем документе, обычно не требуют стадии выделения перед инактивацией. Таким образом, в способах, описанных в настоящем документе, перед тепловой инактивацией не требуется "выделять" ротавирус (например, отделять от среды, в которой он обычно находится, например из супернатанта культуры клеток).

В одном примере раскрытого способа собирали среду от культивируемых клеток, инфицированных ротавирусом, и необязательно удаляли остатки клеток (например, путем фильтрации или низкоскоростного центрифугирования), но не очищали или не выделяли ротавирус из культуральной среды. Среду, содержащую ротавирус, затем подвергали термической обработке для термической инактивации ротавируса.

Кроме того, способы, описанные в настоящем документе, не требуют того, чтобы перед инактивацией ротавирус находился в каком-либо конкретном разбавляющем буфере. Как правило, перед тепловой обработкой ротавирус может находиться в любой жидкой среде, в которой вирус может оставаться активным (например, в условиях, которые не инактивируют вирус). Например, не требуется, чтобы супернатант культуры клеток (или супернатант культуры) имел какую-либо конкретную осмоляльность, тип соли и/или концентрацию (например, какой-либо конкретный тип и/или количество соли с двухвалентным катионом, такой как CaCl_2 , MgCl_2 и/или MgSO_4), сахар или сахарный спирт (например, сорбит, маннит, глицерин, глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу и/или трегалозу) для применения супернатанта в качестве исходного вещества (хотя один или более из указанных компонентов может присутствовать в зависимости от типа среды, применяемой для культивирования клеток). Способы, описанные в настоящем документе, предназначены для инактивации ротавируса без предварительной подготовки ротавируса в разбавляющем буфере, имеющем заранее заданную осмоляльность, соль и/или концентрацию соли, сахар или сахарный спирт (хотя, опять же, один или более из указанных компонентов может присутствовать в зависимости от типа среды, применяемой для культивирования клеток). Например, перед тепловой инактивацией не требуется наличие разбавляющего буфера, но он может присутствовать, например водный буфер, такой как фосфатный буфер, Tris-буфер, цитратный буфер, боратный буфер, глициновый буфер, ацетатный буфер, сукцинатный буфер, HEPES-буфер, малеатный буфер, PIPES-буфер, MOPS-буфер, MOPSO-буфер, гистидиновый буфер и/или NaHCO_3 буфер, с наличием или отсутствием конкретного значения pH (например, pH 5-9). Кроме того, для данных способов не требуется наличие или отсутствие каких-либо конкретных аминокислот, витаминов и/или тому подобного, или каких-либо конкретных их количеств. В некоторых вариантах реализации, таким образом, способы, описанные в настоящем документе, предложены для непосредственного нагревания объема супернатанта культуры клеток любого типа, содержащего живой ротавирус (например, ротавирус крупного рогатого скота), без наличия ка-

кой-либо конкретной осмоляльности, соли или концентрации соли, сахара и/или сахарного спирта, буфера, аминокислоты и/или витамина, показателей pH и/или присутствия в супернатанте культуры клеток. Таким образом, в различных вариантах реализации ротавирус, подлежащий инаktivации, может содержаться или находиться в любой клеточной культуральной среде, подходящей для культивирования клеток млекопитающих (например, особенно тех, которые поддерживают инфекцию и производство ротавируса (например, ротавируса крупного рогатого скота) в таких клетках).

В одном примере описанного способа супернатант культуры клеток, содержащий ротавирус, который термически инаktivируют, не обладает одной или более из следующих характеристик: осмоляльности в диапазоне от 200-500 мОсм, концентрации соли с двухвалентным катионом в диапазоне приблизительно от 1 до 15 мМ, и сахара и/или сахарного спирта в диапазоне приблизительно от 1 до 20% мас./об. Например, соли с двухвалентными катионами могут включать, но не ограничиваются, CaCl_2 , MgCl_2 и MgSO_4 . Сахара могут представлять собой моносахариды или дисахариды. Примеры сахаров и сахарных спиртов могут включать, но не ограничиваются, сорбит, маннит, глицерин, глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу и трегалозу.

Таким образом, преимуществом способов, описанных в настоящем документе, является то, что специалист в данной области может просто получить супернатант культуры клеток и начать его обработку без какой-либо первоначальной предварительной обработки и/или стадий очистки. Такие стадии, конечно, можно выполнять после и/или между стадиями термической инаktivации для получения в конечном счете выделенного, инаktivированного ротавируса и/или его иммуногенных антигенов.

Термическая инаktivация ротавирусов.

Инаktivацию можно осуществлять путем получения супернатанта культуры клеток, содержащего активный ротавирус, и его нагревания до температуры, при которой ротавирус становится неактивным. Живым, инфекционным и/или ротавирусом с продуктивной инфекцией обычно является вирус, который способен инфицировать клетки и производить в них потомство. Неинфекционным и/или ротавирусом без продуктивной инфекции является ротавирус, который не способен инфицировать клетки и/или не способен производить в них потомство. В некоторых вариантах реализации температура, до которой и/или при которой нагревают супернатант культуры клеток, представляет собой температуру, при которой ротавирус инаktivируется ("температура инаktivации", например приблизительно 70°C, такая как, например, 65, 67, 69, 70, 72,5, 75, 77,5 или 80°C). Стадию нагревания обычно проводят в сосуде (например, в пробирке или колбе). После нагревания супернатант культуры клеток может быть перенесен в новый сосуд. В некоторых вариантах реализации применяют несколько стадий нагревания. В таких вариантах реализации первая стадия нагревания может называться как начальная стадия нагревания. За начальной стадией нагревания может необязательно следовать стадия замораживания, на которой замораживают супернатант культуры клеток при подходящей температуре (например, приблизительно -80°C) в течение подходящего периода времени (например, от одного часа до ночи (например, восемь часов) или более). Необязательную стадию замораживания обычно проводят в новом сосуде. За данной стадией замораживания затем может следовать вторая стадия нагревания, например, с применением приблизительно тех же условий, что и на начальной стадии нагревания (например, при температуре инаktivации) с получением инаktivированного ротавирусного препарата. Инаktivированный ротавирусный препарат можно заморозить до момента, пока он не потребуется (например, для тестирования и/или применения в вакцине). В некоторых вариантах реализации начальная стадия нагревания может быть единственной стадией нагревания, необходимой для инаktivации ротавируса (например, может не требоваться вторая стадия нагревания). В таких вариантах реализации начальную стадию нагревания можно проводить путем повышения температуры всего объема супернатанта культуры до температуры инаktivации и сразу проводить следующую стадию (например, замораживание). Таким образом, в таких вариантах реализации супернатант культуры клеток дополнительно подвергают обработке (например, выполняют следующую(ие) стадию(и)), как только весь объем достигнет температуры инаktivации. В других вариантах реализации супернатант культуры можно выдерживать при температуре инаktivации в течение подходящего периода времени (например, приблизительно в течение 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 мин) перед дальнейшей обработкой (например, перед проведением следующей(их) стадии(й)). Вторую стадию нагревания можно проводить, как описано для начальной стадии нагревания (например, проводить дальнейшую обработку, как только весь объем достигнет температуры инаktivации, или после поддержания температуры инаktivации в течение подходящего периода времени). Стадия замораживания обычно разделяет первую и вторую стадию нагревания. Замораживание также можно использовать для хранения супернатанта культуры, который нагревали таким образом, что в нем инаktivировался ротавирус.

В некоторых вариантах реализации процесс может включать повышение температуры супернатанта культуры клеток до соответствующей температуры (например, приблизительно 70°C) в течение соответствующего периода времени (например, приблизительно в течение двух часов), необязательно с последующим замораживанием супернатанта культуры клеток после нагревания в течение подходящего периода времени (например, приблизительно в течение восьми часов), и затем необязательно с повторным

нагреванием супернатанта культуры клеток до соответствующей температуры (например, приблизительно 70°C) в течение соответствующего периода времени (например, приблизительно в течение 2 ч). Затем супернатант культуры можно фильтровать через подходящий фильтр (например, 10 или 70 мкм фильтр).

Тестирование нагретых ротавирусов для подтверждения инактивации.

Обычно ротавирусные препараты, которые обрабатывали для инактивации вируса, тестируют для подтверждения отсутствия активного вируса в препарате (т.е. для подтверждения того, что препарат содержит только инактивированный вирус). В применяемых анализах обычно определяют активные вирусы (например, живые, инфекционные, способные размножаться для получения вирусного потомства). В одном примере анализа препараты или часть препаратов, обработанные для инактивации вируса, применяют для инфицирования каких-либо клеток, восприимчивых к заражению ротавирусом. Наличие активного вируса в препарате можно определять, например, путем фиксации клеток и окрашивания реагентами для выявления ротавируса в клетках, как описано выше. Другие способы обнаружения активного вируса можно осуществлять за счет применения метода инфицированных клеточных фокусов (infectious center assay) или анализов для определения выработки вирусного потомства клетками. Можно применять различные способы.

Например, клетки, из которых можно получить супернатант культуры клеток, могут включать любые клетки, восприимчивые к заражению ротавирусом и репликации ротавируса (например, MA104, MDBK, VERO и другие клетки). Клетки можно выращивать, например, в планшетах, в роллерных флаконах, в биореакторах или при помощи любых средств, известных в данной области техники. Для получения подходящего супернатанта культуры клеток клетки можно культивировать в присутствии соответствующего количества (например, MOI 0,003) живого ротавируса крупного рогатого скота в течение соответствующего периода времени (например, двух часов) при соответствующих условиях (например, 37°C, 5% CO₂). Затем каждый образец можно фильтровать (например, при помощи шприцевого фильтра (например, 1,0 мкм)) и вносить в новый сосуд. Далее образец можно обрабатывать при помощи, например, нагревания, как описано в настоящем документе, и необязательно переносить в новый сосуд. Поскольку после обработки образцы обычно замораживают, то каждый образец можно размораживать вместе с неинактивированными образцами (например, с положительными контрольными образцами). Испытуемые образцы затем можно концентрировать (например, 10×). Затем можно получать серийные разведения (например, десятикратные серийные разведения) каждого испытуемого образца. Сформировавшиеся испытуемые клетки (трехдневная культура, монослой, 100% конфлюентность (например, клетки MA104) затем можно промывать и заменять среду на подходящую среду (например, 0% DME (HyClone)). Затем испытуемые образцы можно добавлять в каждую ячейку/биореактор (например, GE Hollow Fiber, RFP-50-C-3MA), содержащую тестируемые клетки, с последующим подходящим периодом инкубации (например, 2 ч при 37°C, 5% CO₂), чтобы дать возможность ротавирусу адсорбироваться на клетках. Затем клетки можно промывать и обновлять среду (например, DME (HyClone), содержащую 20 мл/л L-глутамин (ASL 31012) и 2 мл/л трипсина). После соответствующего периода времени (например, три дня), клетки можно фиксировать (например, с помощью 80% ацетона) и окрашивать реагентом для обнаружения ротавируса (например, моноклональными антителами к ротавирусу крупного рогатого скота с последующим добавлением реагента для детекции (например, вторичные антитела)) и анализировать на присутствие на клетках антител к ротавирусу. Обычно, ротавирус не обнаруживается в отрицательном контроле или в образцах, в которых ротавирус был инактивирован. В противоположность этому, положительные контрольные образцы, и образцы, в которых ротавирус не были инактивированы, будут положительно окрашены.

Применение термически инактивированного ротавируса.

Способы, описанные в настоящем документе, можно применять для получения вакцин для введения субъекту. Применяемый в настоящем документе термин "субъект" или "хозяин" обычно означает индивида. Субъект или хозяин может охватывать домашних животных, таких как кошки и собаки, сельскохозяйственных животных (например, крупный рогатый скот, лошадей, свиней, овец и коз), лабораторных животных (например, мышей, кроликов, крыс, морских свинок) и птиц. В некоторых вариантах реализации субъект или хозяин может представлять собой млекопитающее, например приматов или человека. Таким образом, в настоящем описании также раскрыты способы стимуляции у субъекта иммунного ответа, специфичного в отношении ротавирусов, и/или способы иммунизации субъекта против ротавирусной инфекции путем введения ему композиции, содержащей инактивированный ротавирус, как описано в настоящем документе. Данное раскрытие также описывает инактивированные ротавирусы и композиции, содержащие ротавирусы, применяемые для введения. Такие способы и композиции могут включать комбинацию таких инактивированных ротавирусов (или препарат, содержащий инактивированный ротавирус) с одним или более фармацевтически приемлемым носителем с получением состава, подходящего для введения. Примеры подходящих фармацевтических носителей и их составы могут быть описаны, например, в Remington's: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005). Для придания составу изотоничности в составе можно использовать соответствующее количество фармацевтически приемлемой соли. Примеры фармацевтически приемлемых но-

сителей включают, но не ограничиваются, стерильную воду, физиологический раствор, буферные растворы, такие как раствор Рингера, и раствор декстрозы. Значение pH раствора обычно составляет приблизительно от 5 приблизительно до 8 или приблизительно от 7 приблизительно до 7,5. Фармацевтические композиции могут также содержать носители, загустители, разбавители, буферы, консерванты, поверхностно-активные вещества, адъюванты, иммуностимуляторы. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что определенные носители могут быть более предпочтительными в зависимости, например, от пути введения и концентрации вводимой композиции.

Фармацевтические композиции также могут содержать один или более активных ингредиентов, таких как антимикробные агенты, противовоспалительные агенты и анестетики. В дополнение к инактивированному ротавирусу фармацевтические композиции могут содержать дополнительные антигены от других агентов. Такие композиции, содержащие антигены от нескольких агентов, могут называться комбинированными вакцинами.

Для стимуляции или усиления иммунного ответа также можно включать адъюванты. Неограничивающие примеры подходящих классов адъювантов включают адъюванты гелевого типа (т.е. алюминия гидроксид/фосфат ("квасцы-адъюванты")), фосфат кальция, адъюванты микробного происхождения (мурамилдипептид (MDP)), бактериальные экзотоксины (холерный токсин (CT), субъединицу В природного холерного токсина (CTB), лабильный токсин E.coli (LT), коклюшный токсин (PT), олигонуклеотиды CpG, последовательности BCG, столбнячный анатоксин, монофосфориллипид A (MPLA), например, из E.coli, Salmonella Minnesota, Salmonella typhimurium, или Shigella exseri), адъюванты в виде частиц (био-разлагаемые полимерные микросферы), иммуностимулирующие комплексы (ISCOM)), адъюванты на основе масляных эмульсий и поверхностно-активных веществ (неполный адъювант Фрейнда (FIA), микрофлюидизированные эмульсии (MF59, SAF) сапонины (QS-21), Emusligen® (например, Emulsigen® D)), синтетические (мурамилпептидные производные (мурабутид, треонил-MDP), неионногенные блок-сополимеры (L121), полифосфазен (PCCP), синтетические полинуклеотиды (поли A:U, поли I:C), производные талидомида (CC-4407/ACTIMID)), RN3-лиганд, или полилактидгликолиды (PLGA), микросферы, 3-дез-О-ацилированный монофосфориллипид A (3D-MPL). Также подходят фрагменты, гомологи, производные и гибриды любого из указанных токсинов при условии, что они сохраняют адъювантную активность.

Иммунологическая композиция может представлять собой, например, фармацевтическую композицию и/или состав, который при введении хозяину (например, животному), индуцирует или усиливает иммунный ответ, направленный на антиген(ы) ротавируса (например, на иммуноген), содержащийся в композиции (например, на инактивированный ротавирус). Такие ответы могут включать образование антител (например, посредством стимуляции В-клеток) или Т-клеточный ответ (например, цитолитический ответ), как описано выше, которые могут быть защитными или нейтрализующими (например, или могут не быть). Защитный или нейтрализующий иммунный ответ может представлять собой ответ, который наносит ущерб ротавирусу (или клеткам, содержащим ротавирус) и благоприятен для хозяина (например, путем уменьшения или предотвращения инфекции). Как используется в настоящем документе, защитные или нейтрализующие антитела и/или клеточные ответы могут вступать в реакцию с ротавирусом, полученным, как описано в настоящем документе, и/или несущими его клетками. При испытании на животных данные антитела и/или клеточные ответы могут уменьшить или ингибировать тяжесть, время и/или летальность ротавирусной инфекции. Иммунологическая композиция может представлять собой композицию, которая при введении хозяину приводит к терапевтическому (например, обычно вводят во время активной инфекции) и/или защитному (например, обычно вводят до или после активной инфекции) и/или нейтрализующему иммунному ответу. Такая иммунологическая композиция также может рассматриваться как вакцина.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации также предложены способы лечения и/или предотвращения ротавирусной инфекции. Также предложены способы лечения одного или более болезненных состояний, вызванных ротавирусом или с участием ротавируса в организме млекопитающего, включающие введение млекопитающему по меньшей мере одной или более эффективных доз инактивированного ротавируса, полученного как описано в настоящем документе (например, и/или одной или более композиций и/или составов, содержащих ротавирус). Как правило, введение инактивированного ротавируса субъекту стимулирует у субъекта иммунный ответ, специфичный по отношению к ротавирусу. Инактивированный ротавирус можно вводить в подходящей величине дозы. Инактивированный ротавирус можно вводить один или более раз; если введение происходит более одного раза, каждое из них может быть в той же самой или в разных дозах. В некоторых вариантах реализации инактивированный ротавирус и/или его антигены можно вводить субъекту любым путем и в подходящей величине дозы приблизительно один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более раз. Подходящие пути введения могут включать, например, подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, интранодальный (intranodal), интраназальный и/или пероральный путь введения. Также дозы могут быть отделены во времени друг от друга одинаковыми или различными интервалами. Например, дозы могут быть разделены посредством 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 ч, 1, 2, 3 неделями, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцами, 1,5, 2, 3, 4, 5 годами или любым периодом времени до, после и/или между любыми

из данных периодов времени. В некоторых вариантах реализации инактивированный ротавирус можно вводить отдельно или в сочетании с другими агентами (например, антибиотиками, другими вакцинами, питательными веществами и т.д.). Такие другие агенты можно вводить одновременно или в разное время и/или с разной частотой. Другие варианты реализации таких способов также могут быть подходящими для применения, как могут легко определить специалисты в данной области техники.

Также предложены способы индукции выработки антител, которые могут быть защитными и/или нейтрализующими, и/или могут вступать в реакцию с инактивированным ротавирусом, полученным как описано в настоящем документе. Композиции и способы применения таких антител также предложены в настоящем документе. Способы получения и применения различных видов антител хорошо известны специалистам в данной области техники и будут подходить для применения (см., например, Harlow et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Harlow et al. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Portable Protocol No. 1, 1998; Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)); Jones et al. *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al. *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta (Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992); Verhoeven et al. (*Science*, 239:1534-1536 (1988); Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991); Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991); Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995); а также патенты США № 4816567; 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; и 5661016). В некоторых вариантах применения антитела могут содержаться в супернатанте гибридомы или асцита и применяться напрямую или после концентрирования с использованием стандартных методик. В других вариантах применения антитела могут быть дополнительно очищены с применением, например, высаливания и ионообменной хроматографии, или аффинной хроматографии с использованием лигандов в виде белка А, белка G, белка А/G и/или белка L, ковалентно связанных с твердой подложкой, такой как гранулы агарозы, или при помощи комбинации данных методов. Антитела можно хранить в любом подходящем виде, включая замороженный продукт (например, приблизительно при -20 или -70°C), в лиофилизированной форме, или при нормальных условиях охлаждения (например, приблизительно при 4°C). При хранении в жидком виде, предпочтительно применение подходящего буфера, такого как трис-буферный солевой раствор (TBS) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Антитела и их производные можно включать в композиции, описанные в настоящем документе, для применения *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах реализации антитело, антитела и/или смеси антител могут вступать в реакцию с ротавирусом и могут применяться для предотвращения и/или лечения ротавирусной инфекции (например, путем пассивной иммунизации). Другие способы получения и применения антител (например, для обнаружения ротавируса) доступны специалисту в данной области техники и также могут подходить для применения, что легко будет определить специалисту в данной области техники.

Практическую ценность (например, иммуногенность) любых материалов, описанных в настоящем документе, можно проанализировать при помощи любого из множества способов, известных специалистам в данной области, включая описанные в настоящем документе (например, анализа сывороточной нейтрализации вируса с применением клеток млекопитающих). Любой один или более анализов, описанных в настоящем документе, или любой другой один или более подходящий анализ, можно применять для определения пригодности любых материалов, описанных в настоящем документе, для применения по назначению. Понятно, что данные способы являются иллюстративными и неограничивающими; также могут подходить для применения другие анализы. В некоторых вариантах реализации предпочтительно, чтобы композиция и/или состав, содержащие инактивированный ротавирус, как описано в настоящем документе, проявляли иммуногенные свойства (например, индуцировали детектируемый и/или нейтрализующий и/или защитный иммунный ответ после введения хозяину). Наличие нейтрализующего и/или защитного иммунного ответа может быть показано путем демонстрации того, у субъектов (например, человека или другого животного), которым вводили инактивированный ротавирус, изменяется заражение ротавирусом (например, снижается), по сравнению с субъектами, которым не вводили материалы. Подходящие модели на животных, которые можно применять для таких определений, могут включать, например, кроликов и/или крупный рогатый скот, как описано в примерах в настоящем документе. Например, одному или более подопытному животному (например, кроликам, крупному рогатому скоту или подобной модели) можно вводить (например, подкожно, внутримышечно, внутрикожно, интраназально) инактивированный ротавирус, полученный как описано в настоящем документе, и далее по прошествии соответствующего периода времени (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 недель), и анализировать для идентификации производства антител к ротавирусу и/или клеток иммунной системы (например, Т-клеток), и/или тестировать живым ротавирусом для определения того, защищены ли животные от инфекции, и/или уменьшается ли тяжесть инфекции. У животного(ых) после введения и/или проверочного заражения можно проводить мониторинг иммунных функций (например, активность Т-клеток, образование антител) с применением стандартных методов (например, анализа нейтрализации

вируса, ИФА). Сыворотку можно анализировать на общую выработку антител или на экспрессию отдельных подтипов. На полученных данных можно проводить статистический анализ (например, точный критерий Фишера, тест Вилкоксона, тест Манна-Уитни или другие тесты). Таким образом, инактивированный ротавирус, и/или композиции и/или составы, содержащие ротавирус, полученные как описано в настоящем документе (например, иммуногенные композиции) можно применять для предотвращения и/или лечения заболеваний, вызванных ротавирусом.

В настоящем изобретении предложен один или более способов получения инактивированного ротавируса путем непосредственного нагревания объема супернатанта культуры клеток, содержащего живой ротавирус, до температуры, при которой инактивируется ротавирус. Супернатант культуры клеток может содержать или демонстрировать, или не иметь кого-либо конкретного буфера, осмоляльности, концентрации соли, сахара, сахарного спирта, pH, аминокислоты, и/или витамина. Для супернатанта культуры клеток не требуется, чтобы он имел заранее определенный буфер, осмоляльность, концентрацию соли, сахара, сахарного спирта, pH, аминокислоту, и/или витамин для того, чтобы подходить для применения в способах, описанных в настоящем документе. Супернатант культуры клеток обычно содержит и/или происходит из клеточной культуральной среды, которая подходит для получения живого ротавируса крупного рогатого скота в клетках млекопитающих. Как указано выше, "непосредственное нагревание объема супернатанта культуры клеток, содержащего живой ротавирус", обычно означает, что супернатант культуры, содержащий активный (например, живой) ротавирус, не подвергают обработке (например, не подвергают "предварительной обработке"), кроме сбора для проведения обработки, или по меньшей мере каким-либо другим образом, который может привести к инаktivации ротавируса, до применения нагревания для инаktivации ротавируса. В некоторых способах инаktivированный ротавирус выделяют из супернатанта культуры клеток после инаktivации. В некоторых вариантах реализации, по существу, весь объем (например, 70, 80, 90, 95, или 99%) супернатанта культуры можно нагревать до требуемой температуры, а в некоторых весь объем супернатанта культуры нагревают до требуемой температуры. В некоторых вариантах реализации температура составляет по меньшей мере приблизительно от 60°C приблизительно до 80°C (например, приблизительно 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80°C). В некоторых вариантах реализации температура супернатанта культуры (например, по существу, всего объема или всего объема) поддерживается в течение по меньшей мере приблизительно от 15 мин до по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 8, 10, 11 или 12 ч. Некоторые варианты реализации дополнительно включают замораживание супернатанта культуры после нагревания, хотя это не является обязательным. Некоторые варианты реализации дополнительно включают последующее нагревание супернатанта культуры по меньшей мере еще один раз (например, после начальной стадии нагревания и/или замораживания). Температура начального и последующего нагревания может быть приблизительно одинаковой. В некоторых вариантах реализации pH супернатанта культуры составляет $7,6 \pm 0,1$. В настоящем описании также предложены композиции, содержащие инаktivированный ротавирус (например, ротавирус крупного рогатого скота), и/или антигены ротавируса (например, ротавируса крупного рогатого скота), полученные любым из способов, описанных в настоящем документе. Также предложены способы иммунизации животного такой композицией(ями). В некоторых вариантах реализации животное представляет собой крупный рогатый скот. В некоторых вариантах реализации композицию можно вводить животному по меньшей мере в два раза, и такие введения можно разделять во времени (например, приблизительно одой, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, десятью, одиннадцатью и/или двенадцатью неделями). Композицию(и) можно вводить животному посредством любого подходящего пути введения, например подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутрикожного, интранодального (intranodal), интраназального и/или перорального пути введения. В настоящем описании также предложены способы получения антител, антитела или антитела, полученные такими способами (например, дополнительно включающими выделение антитела или антител), и композиции, содержащие такие антитела. Также предложены способы применения таких антител (например, способы нейтрализации ротавируса (например, ротавируса крупного рогатого скота) *in vitro* или *in vivo* (например, путем введения такого антитела или антител животному (например, крупному рогатому скоту)).

Термины "примерно", "приблизительно" и тому подобные, если предшествуют списку числовых значений или диапазону, независимо относятся к каждому отдельному значению в списке или диапазоне, как если бы каждому отдельному значению в списке или диапазоне непосредственно предшествовал данный термин. Термины означают, что значения, к которым они относятся, являются точными, близкими или подобными им. Например, в некоторых вариантах реализации "примерно" или "приблизительно" в отношении конкретного значения может указывать на значение 99, 95 или 90% от этого значения. В качестве примера, если объем супернатанта культуры составляет 1 л, "примерно" или "приблизительно" 1 л может равняться 0,99, 0,95 или 0,9 л. В качестве другого примера, если температура составляет 70°C, "примерно" или "приблизительно" может равняться 69, 66 или 63°C. Понятно, что указанное приведено лишь в качестве примера.

Необязательно или опционально означает, что описываемое далее событие или обстоятельство мо-

жет произойти или может не произойти и что описание включает случаи, когда событие или обстоятельство имеет место, и случаи, когда его нет. Например, фраза "необязательно композиция может содержать комбинацию" означает, что композиция может содержать комбинацию различных молекул или может не содержать комбинацию, таким образом, описание включает как наличие комбинации, так и отсутствие комбинации (т.е. отдельные члены комбинации).

Диапазоны в настоящем документе могут быть выражены приблизительно от одного конкретного значения и/или приблизительно до другого конкретного значения. Когда обозначен такой диапазон, другой аспект включает приблизительно от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогичным образом, когда значения выражены как приблизительные величины посредством применения перед ними приблизительно или приблизительно, должно быть понятно, что конкретные формы значений представляют еще один аспект. А также понятно, что конечные точки каждого диапазона являются значимыми как по отношению к другой конечной точке, так и независимо от другой конечной точки. Диапазоны (например, 90-100%) предусматривают включение диапазона *per se*, а также каждого независимого значения в пределах диапазона, как если бы каждое значение было бы указано отдельно.

Когда термины "предотвращать", "предотвращая" и "предотвращение" применяют в настоящем документе в связи с конкретным лечением конкретного состояния (например, предотвращения инфекции), они предназначены для указания того, что у пациента, которого подвергают лечению, либо совсем не развивается клинически наблюдаемый уровень состояния, или развивается более медленно и/или в меньшей степени, если бы он/она совсем не получал(а) лечения. Данные термины не ограничиваются только ситуацией, в которой пациент не испытывает аспект какого бы то ни было состояния. Например, можно сказать, что лечение предотвратило состояние, если пациент получал его во время того, как подвергался воздействию, при котором можно было бы ожидать, что воздействие приведет к конкретному проявлению состояния, и в результате пациент испытывает меньшие и/или легкие симптомы состояния, чем ожидалось в противном случае. Лечение может "предотвращать" инфекцию, приводя к тому, что у пациента проявляются только легкие внешние симптомы инфекции; это не означает, что должно отсутствовать проникновение инфекционного микроорганизма в какую-либо клетку.

Аналогичным образом, термины "снижать", "снижая" и "снижение", применяемые в настоящем документе в связи с риском инфицирования при конкретном лечении (например, при снижении риска ротавирусной инфекции), обычно относятся к развитию инфекции у субъекта более медленно или в меньшей степени по сравнению с контрольным или базовым уровнем развития инфекции в отсутствие лечения (например, раскрыто введение или вакцинация с использованием полипептидов). Снижение риска инфекции может привести к проявлению у пациента только легких внешних симптомов инфекции или задержке симптомов инфекции; это не означает, что должно отсутствовать проникновение инфекционного микроорганизма в какую-либо клетку.

Все ссылки, приведенные в настоящем описании, включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Некоторые варианты реализации раскрыты далее в примерах ниже. Данные варианты реализации приведены в качестве примера и не предназначены каким-либо образом для ограничения объема формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Термическая инаktivация ротавируса.

Для получения ротавируса MA104 (клетки почки обезьяны) культивировали в биореакторах с применением микроносителей Cytodex-3 в количестве 4,0 г/л. В 15 л рабочий объем биореакторов засеивали $1,5 \times 10^5$ клеток/мл. По прошествии от 3 до 7 дней, или когда шарики микроносителя достигали более 95% конфлюентности, каждый биореактор подготавливали к инфицированию ротавирусом крупного рогатого скота (BRV) при множественности заражения (MOI) 0,003 (определяемой путем проведения подсчета ядер). Перед заражением клеток BRV инкубировали при 37°C в течение от 1 до 3 ч в свежей среде DMEM (14,85 л), содержащей трипсин типа IX (22,5 мл стокового раствора трипсина типа IX, также содержащего L-глутамин и гентамицин/амфотерицин В), для получения среды BRV. Перед добавлением среды BRV в биореактор, шарикам микроносителя давали осесть в течение как минимум 5 мин и удаляли приблизительно 90% истощенной среды. Затем в биореакторы закачивали подогретую, свежую среду (12,5 л среды DMEM, содержащей трипсин типа IX). Затем к ней добавляли два с половиной литра (2,5 л) среды BRV. После завершения инфицирования (например, в течение 24 ч после дрейфа pO_2 выше 20% установленного значения без утилизации), перед сбором вируса проводили перемешивание при 75 об/мин в течение приблизительно от 15 до 20 мин. Собранный вирус затем использовали для исследований термической инаktivации. В данных исследованиях собранный материал нагревали приблизительно до 70°C и отбирали 10 мл пробы каждые 15 мин в течение 8 ч. Через 4 ч нагретый материал переносили в другую емкость для завершения второй инкубации при 70°C в течение 4 ч. Каждый образец фильтровали через шприцевой фильтр 1,0 мкм и хранили в новом сосуде. Каждый отфильтрованный образец затем помещали на водяную баню с циркуляцией и температурой 70°C на 2 ч (при встряхивании два раза в течение двухчасового периода) и переносили в новый сосуд (10 мл стерильный флакон). В данных экспе-

риментах каждый образец затем помещали в морозильную камеру при -80°C на ночь. Далее образцы помещали на водяную баню с циркуляцией и температурой 70°C на 2 ч (при встряхивании два раза в течение двухчасового периода) и переносили в новый сосуд. Затем эти образцы до тестирования хранили в морозильной камере при -80°C .

BRV также химически инактивировали с применением бета-пропиолактона (BPL). Приблизительно получали 500 мл супернатанта культуры клеток MA104, инфицированных BRV. В данном способе для инактивации добавляли два мл раствора BPL (10%) в 18 мл охлажденной стерильной воды на каждый литр супернатанта культуры клеток, содержащих ротавирус. Затем смесь перемешивали при 4°C в течение максимум 24 ч. Затем смесь хранили при 4°C (обычно обеспечивая общее время инактивации менее 52 ч). Для тестирования отбирали от одного до двух мл с целью определения инактивации ротавируса с применением тех же способов, что применяли ранее, или для образцов, инактивированных нагреванием.

Для анализа каждый образец размораживали вместе с неинактивированными образцами (например, с положительными контрольными образцами). Затем получали десятикратные серийные разведения каждого образца. Сформировавшиеся испытуемые клетки MA104 (трехдневная культура, монослой, 100% конфлюентность) промывали и заменяли среду на DME (HyClone), не содержащую сыворотку. Затем один мл каждого испытуемого образца добавляли в каждую лунку, содержащую тестируемые клетки, с последующим двухчасовым инкубационным периодом (37°C , 5% CO_2) для адсорбции. Затем добавляли 2 мл подпитывающей среды DME, не содержащей сыворотку и содержащей 20 мл/л L-глутамин (ASL 31012) и 2 мл/л трипсина. После трех дней культивирования клетки фиксировали при помощи 80% ацетона и окрашивали моноклональными антителами, специфичным к BRV (82×100 NAN разбавленный 1:1000 в ФСБ в течение 2 ч при 37°C , окрашивали антителами козы к антителам мыши с меткой FITC # 55493 разбавленными 1:1000 в ФСБ, в течение 2 ч при 37°C) и анализировали путем обнаружения флуоресценции. Ротавирус не был обнаружен ни в одной из лунок с отрицательным контролем, и лишь в редких случаях обнаружен в лунках, содержащих разведения инактивированных нагреванием образцов. Лунки с положительными контрольными образцами были положительными в отношении ротавируса. Для дальнейших экспериментов использовали только полностью инактивированный вирус.

В другом тесте получали однодневные или двухдневные культуры клеток MA104 ($\geq 70\%$ конфлюентности), как описано в предыдущем тесте (например, удаляли питательную среду и заменяли на DME, не содержащую сыворотки). Образцы ротавируса для испытаний получали путем нагревания при 70°C супернатанта культуры, содержащего живой ротавирус, в течение одного или двух часов с последующим замораживанием при -80°C до проведения тестирования инактивации (например, одностадийного процесса инактивации). Другие образцы ротавируса получали путем нагревания при 70°C супернатанта культуры, содержащего живой ротавирус, в течение одного или двух часов с последующим замораживанием при -80°C , до проведения тестирования инактивации, далее осуществляли вторую стадию инактивации нагреванием при 70°C в течение 1 или 2 ч и замораживали при -80°C до проведения тестирования инактивации (например, двухстадийного процесса инактивации). Испытуемые клетки MA104 инкубировали с различными испытуемыми образцами ротавируса в течение как минимум 3 дней и исследовали на цитопатический эффект (CPE). CPE не наблюдали ни в одном из отрицательных контрольных образцов или инактивированных нагреванием образцов (при одночасовом, двухчасовом, одно- или двухстадийном процессе инактивации), что указывает на то, что в каждом процессе полностью инактивировался ротавирус, присутствующий в клеточной культуральной среде. В противоположность этому, CPE наблюдали во всех положительных контрольных образцах.

Пример 2. Иммуногенность термически инактивированного ротавируса.

А. Испытания на кроликах.

В данном исследовании сравнивали серологический ответ кроликов (которых ранее не подвергали антигенам ротавируса крупного рогатого скота (BR)), иммунизированных BR, полученный с использованием общепринятого протокола инактивации с β -пропиолактоном (BPL-BR) или процедур тепловой инактивации, описанных в примере 1 (называемых "HI-BR"). Исследовали шесть вакцин с адъювантом эмульсигеном (30% эмульсиген D). Перед введением антигенов у кроликов брали кровь для получения базового среднего геометрического значения титра (GMT). Кролики получали подкожно 1,25 мл начальную дозу (priming dose) в $0(\pm 2)$ день и подкожно бустерную дозу (boost dose) на $20(\pm 2)$ день. Обработываемые группы были организованы, как показано в табл. 1.

Таблица 1

Группа	Антиген	Количество кроликов
1	3X HI-BR*	10
2	1X HI-BR	10
3	0,5X HI-BR	10
4	3X BPL-BR	10
5	1X BPL-BR	10
6	0,5X BPL-BR	10

*X - стандартная доза BRV в коммерческом продукте.

Образцы сыворотки получали на 35 день (например, приблизительно через 14 дней после вакцинации (DPV)). GMT сыворотки на 35 день анализировали на содержание антител к ротавирусу с применением анализа нейтрализации вируса (VNA) и ИФА. VNA проводили путем нагревания инактивирующих образцов исследуемой сыворотки на водяной бане при 56-58°C в течение 30-60 мин. Клетки MA104 (мोनослои от четырех до шести дней) приводили в контакт с серийными разведениями исследуемой сыворотки в разбавленной среде (DMEM, 2% L-глутамин, 5% ФБС, 0,2 мл/л гентамицина, 0,2 мл/л амфотерицина В). Сток ротавируса готовили в разбавленной среде для вируса (DMEM, 2% L-глутамин, 700 мл/л трипсина типа IX, 0,2 мл/л гентамицина, 0,2 мл/л амфотерицина В) до содержания 50-500 FAID₅₀/мл вируса (FAID₅₀/мл = 50% инфицирующей дозы, определенной при помощи флуоресцентно-меченных антител, на мл) и перемешивали в течение 45-60 мин при комнатной температуре. Данный вирусный раствор затем последовательно разбавляли до 1:20000-25000 в разбавленной среде и серийные разведения инкубировали с образцами сыворотки в течение 50-70 мин. Далее смесь вируса и сыворотки (наряду с положительным и отрицательным контролем) добавляли к клеткам MA104 и клетки культивировали в течение 2-3 дней при 37°C (5% CO₂ в инкубаторе). Затем клетки промывали, фиксировали при помощи 80% ацетона (30±5 мин), и инкубировали с первичными антителами к BRV с последующими вторичными флуоресцентными антителами. Титры рассчитывал с применением метода Спирмана-Карбера и выражали как величину, обратную разведению сыворотки, которое ингибирует рост вируса более чем на 50% относительно индикаторных лунок для данного разведения. Проводили ИФА с применением стандартных процедур. Результаты данных исследований обобщены в табл. 2.

Таблица 2

Группа	Средние значение GMT (0 день)	Средние значение GMT VNA (35 дней/ +14DPV2 (=14 дней))	Диапазон GMT VNA (35 дней/ +14DPV2 (=14 дней))	Среднее значение ИФА (35 дней/ +14DPV2 (=14 дней))	Диапазон ИФА (35 дней/ +14DPV2 (=14 дней))
1 (3X HI-BR)	2	3520	1218-19484	609	512-1024
2 (1X HI-BR)	2	3189	1218-5793	323	128-1024
3 (0,5X HI-BR)	2	4240	1722-8192	416	256-512
4 (3X BPL-BR)	2	11	3-64	2	2
5 (1X BPL-BR)	2	9	6-45	2	2-4
6 (0,5X BPL-BR)	2	5	3-10	3	2-32

Как показано в табл. 2, инактивированный нагреванием BR дает гораздо более сильный гуморальный ответ, чем BPL-инактивированный BR, как измерено при помощи анализа нейтрализации вируса или ИФА.

В. Испытания на крупном рогатом скоте.

В данном исследовании сравнивали серологический ответ крупного рогатого скота (естественных хозяев BRV), которых ранее не вакцинировали против ротавируса, при введении антигенов ротавируса крупного рогатого скота (BR), полученных с использованием общепринятого протокола инактивации с β-пропиолактоном (BPL-BR) или процедур тепловой инактивации, описанных в примере 1 (HI-BR). Исследовали шесть вакцин с адъювантом эмульсигеном (30% эмульсиген D) (табл. 3). Животные получали внутримышечно 5 мл (в/м начальная доза (в области шеи) в день 0 и бустерная доза (также в/м) на 84 день исследования (12 недель после иммунизации). Уровни антител определяли в образцах сыворотки,

полученных в 0 день исследования (при предварительном отборе сыворотки; животные, как правило, имеют некоторое количество антител к BRV из-за пассивной передачи через молозиво), 14, 28, 56, 84, 98 и 112 день. После сбора сыворотку хранили при -20°C . Анализы нейтрализации вируса проводили, по существу, как описано выше, за исключением того, что вирусный раствор серийно разбавляли 1:2 и затем до 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5} в разбавленной среде. Обрабатываемые группы были организованы, как показано в табл. 3.

Таблица 3

Группа	Антиген	Количество животных
1	3X HI-BR*	10-15
2	1X HI-BR	10-15
3	0,5X HI-BR	10-15
4	3X BPL-BR	10-15

*X - стандартная доза BR в коммерческом продукте.

Результаты данного исследования приведены в табл. 4.

Таблица 4

Группа	Средние значение GMT (0 день)	Диапазон GMT (0 день)	Средние значение GMT VNA (98 дней/ +14DPV2 (=112 дней))	Диапазон GMT VNA (98 дней/ +14DPV2 (=112 дней))
1 (3X HI-BR)	225	32-1448	9255	2263-30444
2 (1X HI-BR)	175	45-861	11536	3805-25600
3 (0,5X HI-BR)	193	91-1448	6321	1131-18102
4 (3X BPL-BR)	186	91-1448	162	71-566

Как показано в табл. 4, инактивированный нагреванием BR дает гораздо более сильный гуморальный ответ, чем BPL-инактивированный BR, как измерено при помощи анализа нейтрализации вируса.

Несмотря на то что определенные варианты реализации описаны с точки зрения предпочтительных вариантов реализации, следует понимать, что варианты и модификации будут очевидны специалистам в данной области техники. Таким образом, предполагается, что прилагаемая формула изобретения охватывает все такие эквивалентные варианты, которые находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения инактивированного ротавируса, включающий непосредственное нагревание объема супернатанта культуры клеток, содержащего не подвергавшийся манипуляциям активный ротавирус, до температуры, при которой ротавирус инактивируется, причем указанная температура составляет приблизительно $60-80^{\circ}\text{C}$, причем указанный супернатант культуры клеток не имеет одно или более из: осмоляльность в диапазоне от 200-500 мОсм, концентрацию соли с двухвалентным катионом в диапазоне приблизительно от 1 до 15 мМ, и сахара и/или сахарного спирта в диапазоне приблизительно от 1 до 20% мас./об.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный инактивированный ротавирус является иммуногенным.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что иммуногенность указанного инактивированного ротавируса превосходит иммуногенность химически инактивированного ротавируса.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный ротавирус представляет собой ротавирус крупного рогатого скота.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанная температура составляет приблизительно 70°C .

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанную температуру супернатанта культуры поддерживают в течение от приблизительно 15 мин до приблизительно 240 мин.

7. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанную температуру супернатанта культуры поддерживают в течение от приблизительно 15 мин до приблизительно 60 мин.

8. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанную температуру супернатанта куль-

туры поддерживают в течение приблизительно 60 мин.

9. Способ по любому из пп.1-8, дополнительно включающий замораживание указанного супернатанта культуры клеток.

10. Способ по любому из пп.1-8, включающий нагревание супернатанта культуры клеток по меньшей мере на двух отдельных стадиях.

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что рН супернатанта культуры клеток составляет $7,6 \pm 0,1$.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
