



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.10.08

(51) Int. Cl. **C07K 14/08** (2006.01)
C12N 7/06 (2006.01)

(21) Номер заявки
201891371

(22) Дата подачи заявки
2017.01.20

(54) ИНАКТИВАЦИЯ ВИРУСОВ С ПОМОЩЬЮ ДЕЛИПИДИРОВАНИЯ

(31) **62/287,488**

(32) **2016.01.27**

(33) **US**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/US2017/014267**

(87) **WO 2017/132059 2017.08.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛАНКО ЮЭС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Диаз Лейла, Ву Стивен (US)

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

(56) CHAM B.E. ET AL.: "Delipidation of a hepadnavirus: Viral inactivation and vaccine development", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 137, no. 1, 1 October 2006 (2006-10-01), pages 160-163, XP027892287, ISSN: 0166-0934 [retrieved on 2006-10-01], p. 160, col. 2, par. 2 - p. 161, col. 1, par. 3 US-AI-2009017069

D.R.M. GRAHAM ET AL.: "Cholesterol Depletion of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus with - Cyclodextrin Inactivates and Permeabilizes the Virions: Evidence for Virion-Associated Lipid Rafts", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 77,

no. 15, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 8237-8248, XP055360317, US, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.77.15.8237-8248.2003, p. 8237, col. 2, par. 2-3, p. 8238, col. 1, par. 1, p. 8241, col. 2, par. 3, p. 8243, col. 1, par. 1

ZIDOVETZKI ET AL.: "Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - BIOMEMBRANES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1768, no. 6, 24 May 2007 (2007-05-24), pages 1311-1324, XP022095183, ISSN: 0005-2736, DOI: 10.1016/J.BBAMEM.2007.03.026, p. 1312, col. 1, 2

WO-A1-2013163337

DANTHI P. ET AL.: "Cholesterol removal by methyl-beta-cyclodextrin inhibits poliovirus entry", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 78, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 33-41, XP002412283, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.78.1.33-41.2004, p. 33, col. 2, par. 3, p. 34, col. 1, par. 4

KABOURIDIS P.S. ET AL.: "Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 30, no. 3, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 954-963, XP002233040, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/1521-4141(200003)30:3<954::AID-IMM.U954>3.3.CO; 2-P, p. 955, col. 1 par. 2, p. 955, Fig.1

(57) Изобретение относится к вакцинам, содержащим оболочечные вирусы, из оболочек которых были деплетированы липиды с применением метил-β-циклодекстрина (МБЦД). Делипидирование оболочечных вирусов в двухстадийном процессе аннулирует инфекционность данных вирусов, что позволяет безопасно применять делипидированные вирусы в вакцинах. Применение МБЦД для деплетирования липидов, таких как холестерин, в отличие от других способов, приводит к получению вирусов меньше чем с 20% холестерина необработанного вируса, но такие делипидированные вирусы сохраняют по меньшей мере 85% содержания белков необработанного вируса. Делипидирование с помощью МБЦД также сохраняет иммуногенность вирусных белков. Данное изобретение использования обработки МБЦД в двухстадийном процессе для делипидирования оболочечного вируса представляет собой новую альтернативу для получения инактивированных вирусов, которые включены в эффективные вакцины.

Данное изобретение относится к вакцинам, содержащим оболочечные вирусные частицы, оболочки которых делипидированы с применением метил β -циклодекстрина (МБЦД).

Вирус представляет собой мобильный генетический элемент, который сам по себе не обладает метаболической активностью. Вместо этого вирус должен заражать клетку-хозяина и использовать энергию и процессы этой клетки-хозяина для воспроизведения. Некоторые вирусы "голые", это означает, что отдельные вирусные частицы, или вирион, состоят только из капсида, окружающего вирусный геном и, возможно, нескольких неструктурных белков, кодируемых вирусом. В других вирусах капсид заключен в мембрану или оболочку. Поскольку вирусный геном в целом, как правило, слишком мал для кодирования белков, участвующих в синтезе липидов, такие оболочечные вирусы должны создавать свои оболочки из липидов клетки-хозяина. Таким образом, содержание липидов в вирусной оболочке изменяется в зависимости от липидных характеристик клетки-хозяина.

Вирусы хорошо адаптированы к организмам их хозяев и часто являются патогенными, вызывая болезнь и даже смерть их хозяев. Вирусы могут оказывать большое экономическое влияние либо путем заражения людей и/или их домашних животных, либо путем поражения растения и животных, которые являются источником пищи. Вакцины являются предпочтительным способом защиты животного-хозяина от вирусной инфекции. Вакцина создает защитные иммунные ответы на вирусы, включающие в себя антитела и клеточный иммунитет. Оба типа ответов часто требуются для ослабления новых инфекций клеток-хозяев и для удаления вирусных частиц и инфицированных клеток из хозяина.

Почти 40 лет назад, Moore et al. (J. Virol. 27(2):320-329, 1978) продемонстрировал, применяя безхолестериновые везикулы, что деплетирование холестерина в вирусных оболочках может уменьшить способность вирусных частиц инфицировать клетки-мишени. Напротив, другие исследователи сообщили, что вирусная инфекционность требует наличия холестерина в мембране клеток-мишеней, но не в вирусной оболочке. Другие постулировали, что процесс удаления холестерина, а не отсутствие холестерина в оболочках является причиной снижения инфекционности. Независимо от роли холестерина в функции вируса, не была продемонстрирована полная и постоянная потеря инфекционности для деплетированных по холестерину вирусов, а также не было показано, что деплетированные по холестерину вирусы полезны в безопасных и эффективных вакцинах.

Сообщалось о химических средствах деплетирования холестерина, таких как, например, применение циклодекстринов, *n*-бутанола, диизопропилового эфира (ДИПЭ), фторэфира, такого как севлофлан, поверхностно-активных веществ, таких как TRITON X-100™ (полиэтиленгликоль *p*-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фениловый эфир или полиоксиэтилен-октилфениловый эфир) или TWEEN 20™ (ПЭГ (20) сорбитанмонолаурат), диэтилового эфира и их комбинаций. Некоторые химические средства оказались слишком агрессивными, приводя к потере вирусных белков вирионами или к структурным изменениям оставшихся белков. Наличие и нативная конформация белков будут необходимыми для того, чтобы вирионы, деплетированные по холестерину, были пригодными для вакцин, в частности вакцин, которые стимулируют продуцирование нейтрализующих антител, направленных на белки вирусной оболочки.

В некоторых случаях было показано, что деплетирование холестерина является обратимым. Добавление экзогенного холестерина может восстановить вирусную оболочку и возобновить инфекционность. Это может представлять собой проблему безопасности, связанную с применением деплетированных по холестерину вирусов в вакцинах, поскольку холестерин и другие липиды, присутствующие в крови, или других жидкостях организма, или даже в мембранах клеток-хозяев, которые контактируют с деплетированными по холестерину вирионами, могут потенциально восстанавливать вирионы и возобновлять инфекционность.

Вакцины, содержащие ослабленные вирусы, обычно считаются наиболее эффективными при создании защитного иммунитета. Тем не менее существует опасение, что ослабленные вирусы могут мутировать или рекомбинировать и, таким образом, возвращаться к вирулентному состоянию. Инактивированные (т.е. убитые) вирусы обычно считаются более безопасными для применения в вакцинах, но средства инактивации часто изменяют или разрушают антигенные эпитопы, так что эффективность в качестве стимуляторов защитного иммунитета уменьшается или теряется.

Оболочечные вирусы из-за отсутствия эффективных вакцин продолжают представлять опасность для здоровья людей и животных, а болезни, вызванные оболочечными вирусами, оказывают огромное экономическое влияние. Необходимы улучшенные вакцины, которые являются как безопасными, так и эффективными. Например, улучшенный способ инактивации оболочечных вирусов, который сохраняет иммуногенность вирусных антигенов, поддерживает целостность вирионов и обладает ничтожной или отсутствующей угрозой безопасности, был бы полезен для облегчения заболеваний, вызванных оболочечными вирусами. В данном документе раскрывается такой улучшенный способ вирусной инактивации, включающий делипидирование вирусных оболочек с помощью МБЦД.

Соответственно, согласно данному изобретению предложен способ приготовления инактивированного оболочечного вируса, включающий смешивание раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирование первой смеси в течение первого периода времени; смешивание оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для по-

лучения второй смеси и инкубирование указанной второй смеси в течение второго периода времени. Концентрация МБЦД в первой смеси составляет по меньшей мере от 5 до около 100 мМ. Дополнительно, концентрация МБЦД в первой смеси составляет от около 20 до около 40 мМ. Еще дополнительно, концентрация МБЦД в первой смеси составляет около 20, около 30 или около 40 мМ.

Согласно данному изобретению предложен способ приготовления инактивированного оболочечного вируса, включающий смешивание раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирование первой смеси в течение первого периода времени; смешивание оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирование указанной второй смеси в течение второго периода времени; причем концентрация МБЦД в второй смеси составляет по меньшей мере от 10 до около 100 мМ. Дополнительно, концентрация МБЦД в второй смеси составляет от около 30 до около 50 мМ. Еще дополнительно, концентрация МБЦД в первой смеси составляет около 30, около 40 или около 50 мМ.

Согласно данному изобретению предложен способ приготовления инактивированного оболочечного вируса, включающий смешивание раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирование первой смеси в течение первого периода времени; смешивание оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирование указанной второй смеси в течение второго периода времени; причем первый период времени составляет от около 15 мин до около 24 ч. Дополнительно, первый период времени составляет от около 4 до около 24 ч. Еще дополнительно, первый период времени составляет около 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 или 24 ч.

Согласно данному изобретению предложен способ приготовления инактивированного оболочечного вируса, включающий смешивание раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирование первой смеси в течение первого периода времени; смешивание оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси; и инкубирование указанной второй смеси в течение второго периода времени; причем второй период времени составляет от около 4 до около 48 ч. Дополнительно, второй период времени составляет от около 24 до около 48 ч. Еще дополнительно, второй период времени составляет около 24, 30, 36, 40, 44 или 48 ч.

Согласно данному изобретению предложен способ приготовления инактивированного оболочечного вируса, включающий смешивание раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирование первой смеси в течение первого периода времени; смешивание оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирование указанной второй смеси в течение второго периода времени; причем температура первой смеси в течение первого периода времени является комнатной температурой или составляет от около 20 до около 25°C. Дополнительно, температура первой смеси в течение первого периода времени составляет от около 22 до около 24°C.

Согласно данному изобретению предложен способ приготовления инактивированного оболочечного вируса, включающий смешивание раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирование первой смеси в течение первого периода времени; смешивание оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирование указанной второй смеси в течение второго периода времени; причем температура второй смеси в течение второго периода времени является комнатной температурой или составляет от около 20 до около 25°C. Дополнительно, температура второй смеси в течение второго периода времени составляет от около 22 до около 24°C.

Согласно данному изобретению предложен способ приготовления инактивированного оболочечного вируса, включающий смешивание раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирование первой смеси в течение первого периода времени; смешивание оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирование указанной второй смеси в течение второго периода времени; причем оболочечный вирус выделяют из первой смеси перед стадией получения второй смеси. В альтернативном варианте и без ограничений, второй раствор МБЦД может быть смешан прямо с первой смесью. Прямое смешивание может быть выполнено в той же емкости для инактивации, что и при первом смешивании, или первая смесь может быть перемещена в новый сосуд для инактивации перед смешиванием со вторым раствором МБЦД.

Согласно данному изобретению предложен способ приготовления инактивированного оболочечного вируса, включающий смешивание раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирование первой смеси в течение первого периода времени; смешивание оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси; и инкубирование указанной второй смеси в течение второго периода времени; причем первый период времени дополнительно включает перемешивание первой смеси. Перемешивание могло бы составлять от около 30 до около 100 об/мин. Предпочтительно перемешивание могло бы составлять от око-

ло 40 до около 60 об/мин. Наиболее предпочтительно, перемешивание могло бы составлять около 50 об/мин.

Согласно данному изобретению предложен способ приготовления инаktivированного оболочечного вируса, включающий смешивание раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирование первой смеси в течение первого периода времени; смешивание оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирование указанной второй смеси в течение второго периода времени; причем второй период времени дополнительно включает перемешивание второй смеси. Перемешивание могло бы составлять от около 30 до около 100 об/мин. Предпочтительно перемешивание могло бы составлять около 50 об/мин.

Соответственно, согласно данному изобретению предложен способ приготовления инаktivированного оболочечного вируса, включающий смешивание раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирование первой смеси в течение первого периода времени; смешивание оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирование указанной второй смеси в течение второго периода времени; причем оболочечный вирус представляет собой вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС). Оболочечный вирус также может представлять собой вирус эпизоотической диареи свиней (ВЭДС).

Согласно данному изобретению предложен делипидированный оболочечный вирус, полученный с помощью способа смешивания раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирования первой смеси в течение первого периода времени; смешивания оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирования указанной второй смеси в течение второго периода времени. Предпочтительно концентрация МБЦД в первой смеси составляет по меньшей мере от 5 до около 100 мМ или от около 20 до около 40 мМ. Предпочтительно концентрация МБЦД во второй смеси составляет по меньшей мере от 10 до около 100 мМ, или от около 30 до около 50 мМ, или около 30, около 40 или около 50 мМ. Предпочтительно первый период времени составляет от около 15 мин до около 24 ч, или от около 4 до около 24 ч, или около 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 или 24 ч. Предпочтительно второй период времени составляет от около 4 до около 48 ч, или от около 24 до около 48 ч, или около 24, 30, 36, 40, 44 или 48 ч. Предпочтительно температура первой смеси в течение первого периода времени является комнатной температурой, или составляет от около 20 до около 25°C или даже от около 22 до около 24°C. Предпочтительно температура второй смеси в течение второго периода времени является комнатной температурой или составляет от около 20 до около 25°C или даже от около 22 до около 24°C. Предпочтительно оболочечный вирус выделяют из первой смеси перед стадией получения второй смеси. В альтернативном варианте и без ограничений, второй раствор МБЦД может быть смешан прямо с первой смесью. Прямое смешивание может быть выполнено в той же емкости для инаktivации, что и при первом смешивании, или первая смесь может быть перемещена в новый сосуд для инаktivации перед смешиванием со вторым раствором МБЦД. Предпочтительно первый период времени дополнительно включает перемешивание первой смеси, причем перемешивание может составлять от около 30 до около 100 об/мин, от около 40 до около 60 об/мин или около 50 об/мин. Предпочтительно второй период времени дополнительно включает перемешивание второй смеси, причем перемешивание может составлять от около 30 до около 100 об/мин, от около 40 до около 60 об/мин или около 50 об/мин. Предпочтительно оболочечный вирус представляет собой вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) или вирус эпизоотической диареи свиней (ВЭДС).

Согласно данному изобретению предложена вакцина, содержащая делипидированный оболочечный вирус, полученный с помощью способа смешивания раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирования первой смеси в течение первого периода времени; смешивания оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирования указанной второй смеси в течение второго периода времени. Предпочтительно концентрация МБЦД в первой смеси составляет по меньшей мере от 5 до около 100 мМ, или от около 20 до около 40 мМ. Предпочтительно концентрация МБЦД во второй смеси составляет по меньшей мере от 10 до около 100 мМ, или от около 30 до около 50 мМ, или около 30, около 40, или около 50 мМ. Предпочтительно первый период времени составляет от около 15 мин до около 24 ч, или от около 4 до около 24 ч, или около 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 или 24 ч. Предпочтительно второй период времени составляет от около 4 до около 48 ч, или от около 24 до около 48 ч, или около 24, 30, 36, 40, 44 или 48 ч. Предпочтительно температура первой смеси в течение первого периода времени является комнатной температурой или составляет от около 20 до около 25°C, или даже от около 22 до около 24°C. Предпочтительно температура второй смеси в течение второго периода времени является комнатной температурой или составляет от около 20 до около 25°C, или даже от около 22 до около 24°C. Предпочтительно оболочечный вирус выделяют из первой смеси перед стадией получения второй смеси. В альтернативном варианте и без ограничений, второй раствор МБЦД может быть смешан прямо с пер-

вой смесью. Прямое смешивание может быть выполнено в той же емкости для инактивации, что и при первом смешивании, или первая смесь может быть перемещена в новый сосуд для инактивации перед смешиванием со вторым раствором МБЦД. Предпочтительно первый период времени дополнительно включает перемешивание первой смеси, причем перемешивание может составлять от около 30 до около 100 об/мин, от около 40 до около 60 об/мин или около 50 об/мин. Предпочтительно второй период времени дополнительно включает перемешивание второй смеси, причем перемешивание может составлять от около 30 до около 100 об/мин или около 50 об/мин.

Предпочтительно оболочечный вирус представляет собой вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) или вирус эпизоотической диареи свиней (ВЭДС).

Согласно данному изобретению предложена вакцина, содержащая делипидированный оболочечный вирус, полученный с помощью способа смешивания раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирования первой смеси в течение первого периода времени; смешивания оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирования указанной второй смеси в течение второго периода времени; причем вакцина дополнительно содержит по меньшей мере одно из: адъювант, стабилизатор, консервант и разбавитель для составления смесей. Предпочтительно адъювант представляет собой водный полимерный адъювант, причем полимер представляет собой акрилат или полиакрилат. Предпочтительно стабилизатор включает в себя по меньшей мере одно из: сахара, углеводы, белки и желатины. Предпочтительно консервант представляет собой антибиотик или биостатическое соединение, которое замедляет, ингибирует или предотвращает рост, метаболическую активность или размножение микроорганизмов. Предпочтительно разбавителем для составления смесей является вода, забуференный фосфатом физиологический раствор, среда для культивирования клеток или другой раствор, содержащий физиологическое количество соли и pH.

Согласно данному изобретению предложено применение делипидированного оболочечного вируса, полученного с помощью способа смешивания раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирования первой смеси в течение первого периода времени; смешивания оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирования указанной второй смеси в течение второго периода времени; причем применение включает лечение болезни или симптома, вызванного оболочечным вирусом.

Согласно данному изобретению предложено применение делипидированного оболочечного вируса в изготовлении лекарства для лечения болезни или симптома, вызванного оболочечным вирусом; причем делипидированный оболочечный вирус получают с помощью способа смешивания раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором МБЦД для получения первой смеси; инкубирования первой смеси в течение первого периода времени; смешивания оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси и инкубирования указанной второй смеси в течение второго периода времени.

Как применяется в данном документе, "оболочечный вирус" представляет собой любой вирус, имеющий билипидную мембрану, или оболочку, окружающую нуклеопротеиновое ядро. Вирусные оболочки обычно получают из мембран клеток-хозяев и содержат фосфолипиды, гликолипиды, сфинголипиды и стерин, такие как холестерин. Оболочечные вирусы включают в себя вирусы, которые имеют геномы, кодируемые либо ДНК, либо РНК. Виды оболочечных вирусов включают в себя, без ограничения, герпесвирусы, поксвирусы, иридовирусы, гепаднавирусы, ретровирусы, ортомоксивирусы, ареннавирусы, буниавирусы, парамиксовирусы, мононегавирусы, рабдовирусы, филовирусы, коронавирусы, артеривирусы, флавиивирусы и тогавирусы. Обнаруживаются новые оболочечные вирусы, и оболочечные вирусы классифицируют и реклассифицируют по мере лучшего охарактеризования вируса. Более полное описание оболочечных вирусов можно найти в таких книгах, как "Fields Virology" (D.M. Knipe and P.M. Howley, eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2013), сейчас в шестом издании.

Термин "вирус", как применяется в данном документе, может означать либо вид вируса, либо, взаимозаменяемо, отдельную инфекционную единицу или единицы, содержащие нуклеиновые кислоты, белки и оболочку. "Вирусная частица" представляет собой отдельную инфекционную единицу, и данный термин является синонимом термина "вирион".

"Делипидирование" представляет собой процесс удаления или деплетирования липидов из вирусной оболочки. Делипидирование измеряется количеством холестерина, удаленного из вирусных частиц с помощью МБЦД. Однако МБЦД также может извлекать, удалять или истощать другие липиды, такие как фосфолипиды. Было также показано, что МБЦД взаимодействует с некоторыми белками, хотя описанный в данном документе способ минимизирует потерю белков среди вирусных белков в результате опосредованного МБЦД делипидирования.

"Инфекционность" представляет собой способность вируса обеспечить инфекцию в клетке-хозяине, которая представляет собой любую клетку из человека или другого животного, способную поддерживать репликацию вируса. Инфекционность может быть измерена, например, количеством или процентом клеток-хозяев, инфицированных заданным количеством вирусных частиц или количеством или процентом вирусных частиц, необходимых для инфицирования клетки-хозяина. Вирусные частицы могут быть под-

считаны операционно, например путем определения количества бляшкообразующих единиц (БОЕ) в аликвоте вирусных частиц. Количество вирусных частиц также может быть определено физически, например по присутствию конкретного вирусного белка, обнаруженного, например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), или путем измерения количества копий вирусного генома, присутствующего в растворе, обнаруженных, например, с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR).

"Антиген" представляет собой любую молекулу, поддающуюся специфическому обнаружению иммунной системой организма. Как правило, вирусным антигеном является вирусный белок, кодируемый вирусным геномом. Присутствие вирусных антигенов может быть специфически обнаружено как Т-лимфоцитами, так и В-лимфоцитами. "Иммуногенность" относится к способности антигена вызывать иммунный ответ. Для вакцин иммуногенность вирусного антигена будет предпочтительно приводить к формированию защитного иммунитета у животного, который бы уменьшал, ограничивал или ослаблял вирусную инфекцию.

В отличие от антигена, "адъювант" представляет собой неспецифический стимулятор иммунного ответа. Адъювант может стимулировать врожденный иммунный ответ путем связывания и активации рецептора распознавания паттернов (PRR). Такими стимуляторами PRR могут быть, например, вирусные или бактериальные нуклеиновые кислоты, липиды из бактерий или паразитов, или бактериальные белки или токсины, или любая искусственно созданная имитация таких молекул. Адъюванты также включают в себя, без ограничения, неорганические соединения, которые объединяют антигены для облегчения распознавания В-лимфоцитами или поглощения фагоцитами, такие как квасцы, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, гидроксид фосфата кальция или сульфат аммония; масла; и детергенты. Адъюванты также могут быть хозяйскими медиаторами иммунного сигналинга, такими как, без ограничения, цитокины, лимфокины, хемокины, интерфероны, анафилатоксины, факторы роста, факторы дифференциации и молекулы адгезии.

Как применяется в данном документе, термины "лечение", "лечить" или "терапия" включают в себя сдерживание, замедление, остановку, уменьшение, ослабление, или отмену прогрессирования или тяжести существующего симптома, нарушения, патологии или заболевания. Лечение может быть применено профилактически или терапевтически.

Как применяется в данном документе, "введение животному" включает в себя кожное, подкожное, внутримышечное, слизистое, подслизистое, трансдермальное, пероральное или интраназальное введение. Введение может включать в себя инъекцию или местное введение.

Следующие экспериментальные примеры иллюстрируют процессы делипидирования. Понятно, что другие варианты осуществления и применения будут очевидны специалистам в данной области техники и что изобретение не ограничено этими конкретными иллюстративными примерами или предпочтительными вариантами осуществления. Оболочечные вирусы содержат разные уровни холестерина в своих оболочках, в зависимости от, например, без ограничения, типа и вида оболочечного вируса и клетки-хозяина, в которой оболочечный вирус реплицируется. Как будет понятно специалисту в данной области техники, описанные в данном документе процессы делипидирования могут потребовать оптимизации для каждого конкретного стока вируса. Мембраны микроорганизмов могут содержать холестерин, хопанойды или другие стеринные и стеринно-подобные молекулы, и, таким образом, патогены, отличные от вирусов, также могут быть инактивированы способами, описанными в данном документе.

Пример 1.

Делипидировали штамм H1N1 A/WSN/33 вируса гриппа человека применяя нижеприведенные процедуры. В приведенных ниже примерах делипидирование вируса гриппа (IFV) ослабляет инфекционность. Поскольку способ делипидирования согласно данному изобретению сохраняет белки вирусной оболочки, ожидается, что животные, инокулированные делипидированным IFV, будут вырабатывать иммуногенные ответы, которые защитят их от заражения патогенной дозой вирулентного вируса.

Реагенты.

Штамм H1N1 A/WSN/33 вируса гриппа человека и линия его клеток-хозяев MDCK доступны в Wuxi AppTec (Шанхай, Китай). Другие реагенты включают в себя MEM (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния); EMEM (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури); бессывороточную среду ULTRAMDCK™ (Lonza, Inc., Аллендейл, Нью-Джерси); фетальную бычью сыворотку (ФБС; Invitrogen); 0,25% трипсин-ЭДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота; Invitrogen); метил-β-циклодекстрин (МБЦД, Sigma-Aldrich); набор для анализа холестерина AMPLEX Red (Invitrogen); набор для белкового анализа PIERCE™ BCA (Рокфорд, Иллинойс) и MTT (Sigma-Aldrich).

Размножение вируса гриппа H1N1 A/WSN/33 в клеточной линии MDCK.

Клетки высевают с IFV в соответствии со следующей процедурой. Среда отделяют от клеток MDCK, выращенных в колбах T-75, монослой клеток MDCK промывают 5 мл PBS при комнатной температуре и клетки открепляют с помощью 1,5 мл трипсина/ЭДТК при 37°C. Клетки ресуспендируют в 10 мл MEM, содержащей 10% ФБС, и осаждают центрифугированием при 800 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Клетки ресуспендируют в MEM, содержащей 10% ФБС, и плотность клеток доводят до

$2,5 \times 10^5$ клеток/мл. 15 мл суспензии клеток MDCK высевает в каждую колбу T-75 и колбы размещают при 37°C с 5% CO₂ и инкубируют в течение ночи.

Когда клетки MDCK сливаются больше чем на 90%, MEM удаляют из колб T75, добавляют 5 мл поддерживающей среды EMEM, содержащей 1% ФБС и 1 мкг/мл трипсина, и клетки инфицируют вирусом гриппа при множественности заражения (MOI) 0,01. Колбы инкубируют в течение 60-90 мин при 37°C с 5% CO₂ и осторожно встряхивают каждые 15 мин. В каждую колбу добавляют 10 мл поддерживающей среды EMEM, содержащей 1% ФБС и 1 мкг/мл трипсина, и колбы инкубируют в течение 48 ч при 37°C и 5% CO₂. Когда достигается примерно 80% цитопатического эффекта (ЦПЭ) вируса (обычно примерно через 48 ч), культуральные супернатанты собирают для получения IFV.

Очистка и титрование H1N1 A/WSN/33 IFV.

IFV очищают в соответствии со следующей процедурой. Собранный супернатант культуры центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин для удаления клеточного дебриса и супернатант собирают. Супернатант центрифугируют при 38000 об/мин в течение 60 мин для осаждения IFV. Осадок IFV ресуспендируют в соответствующем объеме забуференного физиологического раствора (PBS) с получением конечного титра $>1,0 \times 10^9$ бляшкообразующих единиц/мл (БОЕ/мл). Аликвоты по 100 мкл данного концентрированного исходного (стокового) раствора IFV хранят при -80°C.

IFV титровали для определения инфекционности *in vitro* применяя следующую процедуру. Используя клеточную культуру и описанные выше процедуры преобразования, клетки MDCK суспендируют в MEM, содержащей 10% ФБС до конечной плотности $2,5 \times 10^5$ клеток/мл. В каждую лунку 6-луночной плашки добавляют 2 мл суспензии клеток MDCK и плашки инкубируют в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. Вирусные стоки оттаивают на водяной бане с температурой 37°C с последующим центрифугированием при 500×g в течение 10 мин при 4°C. Получают серию разведений 1/10 стокового раствора и хранят при 4°C до применения, используя бессывороточную среду ULTRAMDCK™ и 2,5 мкг/мл трипсина в качестве буфера для разведения.

Когда клетки сливаются по меньшей мере на 90%, среду удаляют и в каждую лунку добавляют 0,5 мл буфера для разведения и 0,5 мл разведения вируса. Для отрицательного контроля применяют 1,0 мл буфера для разведения. Плашки осторожно встряхивают сразу же после добавления каждого разведения. Плашки инкубируют в течение 60-90 мин при 37°C в 5% CO₂ и качают каждые 15 мин. Каждую лунку каждой 6-луночной плашки затем покрывают 3 мл смеси 1:4 2,5% агарозы с низкой температурой плавления в растворе PBS и буфером для разведения при 37°C. Плашки инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин, чтобы позволить покрывающей смеси затвердеть; затем плашки инкубируют при 37°C с 5% CO₂ в течение 3 дней.

Бляшки визуализируют, применяя следующую процедуру. После того, как бляшки полностью сформируются (3 дня после инфицирования), добавляют 1 мл 4% параформальдегида и плашки инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч. Растворенную агарозу отбрасывают и к каждой лунке добавляют 0,1 мл 0,5% кристаллического фиолетового. Количество бляшек подсчитывают после 15 мин инкубации и переводят в титр на основе коэффициентов разбавления.

Делипидирование.

Процесс делипидирования для очищенного IFV проводят в двух параллельных реакциях: обработка растворителем, включающая контактирование IFV с МБЦД, и ложная обработка, при которой IFV обрабатывают таким же образом, но без воздействия МБЦД. Один и тот же титр IFV применяют как для ложной обработки, так и для обработки растворителем. IFV в ложной обработке может быть титрованным, чтобы получить косвенную меру количества делипидированного IFV, оставшегося после обработки растворителем.

Обработку растворителем и ложную обработку проводят в соответствии со следующей процедурой. Аликвоты (100 мкл) стока IFV, полученные выше ($>1,0 \times 10^9$ БОЕ/мл), разводят в 900 мкл PBS в пробирках "Eppendorf" до достижения конечного титра $1,0-5,0 \times 10^8$ БОЕ/мл. МБЦД в PBS добавляют к конечной концентрации 50 мМ для обработки растворителем или добавляют равный объем PBS для ложной обработки. Пробирки "Eppendorf" затем закрывают и герметизируют парафильмом. Все образцы закрепляют в орбитальном встряхивателе с воздушной баней с постоянной температурой SHZ-82 (Changzhou Guohua Appliance Co., Китай), предварительно нагретой до 37°C. Образцы, обработанные растворителем, и ложно обработанные образцы вращают с орбитальной скоростью вращения 220 об/мин при 37°C в течение 30 или 45 мин. Образцы вращают в микроцентрифуге в течение 1 мин, а супернатанты, содержащие IFV, переносят в ультрацентрифужные пробирки. Пробирки центрифугируют при 200000×g (OPTIMA™ L-100XP, Beckman Coulter, Inc., Индианаполис IN) в течение 30 мин, чтобы осадить IFV, и супернатанты отбрасывают. Осадки IFV ресуспендируют в 1/10 исходного объема, добавляемого к каждой пробирке "Eppendorf", и хранят при -80°C до дальнейшего анализа.

Характеристика делипидированного IFV.

Содержание белка в делипидированном IFV и ложно обработанном IFV определяют, применяя анализ BCA (набор для белкового анализа PIERCE™ BCA) в соответствии с инструкциями производителя.

Содержание холестерина определяют, применяя количественный анализ на холестерин (набор анализа холестерина AMPLEX® Red, Life Technologies, Остров Гранд, Нью-Йорк), выполняемый в соответствии с инструкцией производителя. Инфекционность *in vitro* измеряют, применяя те же процедуры титрования, которые указаны выше.

Активность гемагглютинации (ГА) определяют следующим образом. Свежую выделенную куриную кровь трижды промывают PBS, а эритроциты (красные кровяные тельца, ККТ) ресуспендируют в PBS до концентрации 1%. Делают разведения вируса (50 мкл) в PBS и смешивают с 50 мкл суспензии ККТ. Смесь добавляют в отдельные лунки 96-луночной плашки и ККТ дают отстояться в течение 45 мин. Лунки оценивают как отрицательные по ГА (т.е. отсутствие агглютинации ККТ), если присутствует точка или осадок ККТ, и считают, что лунка является положительной, если присутствует однородная суспензия ККТ.

Две серии делипидированных образцов IFV и ложно обработанных образцов IFV получают в соответствии с процедурой, описанной выше. Сток IFV, применяемый для тестов, имеет титр $2,2 \times 10^{10}$ БОЕ/мл. В первой серии ("раствор А") время делипидирования составляет 30 мин; во второй серии ("раствор В") время делипидирования составляет 45 мин. После ультрацентрифугирования характеризуют делипидированные образцы и ложно обработанные образцы.

Инфекционность *in vitro* показывает, что БОЕ делипидированных образцов составляет около $\sim 1/7000$ от таковых соответствующих ложно обработанных образцов. Результаты по инфекционности показаны в табл. 1. Несмотря на разницу в титрах, содержание белка в различных образцах находится в пределах 10% друг друга. Содержание белка в делипидированном IFV из раствора А составляет 97% от ложно обработанного образца; и содержание белка делипидированного IFV из раствора В составляет 93% от ложно обработанного образца (см. табл. 1). Также отмечается, что после обработки восстанавливается примерно 20% исходного материала, как определено по содержанию белка. Процент восстановления исходя из содержания белка сравним с измеренными титрами исходного материала ($2,2 \times 10^9$ БОЕ/мл) и ложно обработанными образцами ($4,0 \times 10^8$ БОЕ/мл, что составляет 18% от исходного титра). После делипидирования остается менее 2% холестерина по сравнению с ложной обработкой (см. табл. 1).

Таблица 1

Обработка		Инфекционность <i>in vitro</i> (БОЕ/мл)	Содержание белка (мг/мл)	Содержание холестерина (мкг/мл)
Раствор А (30 минут)	Ложная обработка	4×10^8	1,49	16,4
	Делипидированный	6×10^4 (1/6667) ^a	1,44 (97%) ^b	0,25 (1,5%) ^b
Раствор В (45 минут)	Ложная обработка	2×10^8	1,39	15,9
	Делипидированный	3×10^4 (1/6667) ^a	1,29 (93%) ^b	0,1 (0,6%) ^b

Примечания: ^a доля инфекционности, по сравнению с ложной обработкой; ^b процент по сравнению с ложной обработкой.

Ложная обработка показывает, что физическая обработка (встряхивание и центрифугирование) приводит к потере титра и белка. Делипидирование с помощью МБЦД в основном удаляет холестерин, но не белок, из IFV. Кроме того, IFV, обработанный МБЦД, имеет меньшую инфекционную активность *in vitro*, но инфекционность не была полностью аннулирована.

Сравнение делипидирования IFV с помощью диизопропилового эфира и МБЦД:

В дополнение к МБЦД для делипидирования IFV применяют другой липидный растворитель - диизопропиловый эфир (ДИПЭ). Образцы IFV того же исходного материала обрабатывают различными концентрациями ДИПЭ или 50 мМ МБЦД. Аликвоты того же количества IFV обрабатывают 2, 4, 8 или 12% ДИПЭ или 50 мМ МБЦД при 37°C в течение 30 мин. После кратковременного центрифугирования при $2000 \times g$ в течение 3 мин удаляют видимый растворитель, а водные продукты оставляют сушиться в вытяжном шкафу в течение 20 мин. Затем образцы центрифугируют при $200000 \times g$ в течение 30 мин для извлечения вирусных частиц. Инфекционность *in vitro*, активности по ГА, содержание белка и содержание холестерина в IFV показаны в табл. 2.

Обработка с помощью ДИПЭ при концентрации вплоть до 12% не столь эффективна для удаления холестерина, как 50 мМ МБЦД при тех же условиях. В то время как 12% ДИПЭ удаляет около 80% холестерина из IFV, 50 мМ МБЦД удаляет более 98%. Инфекционности IFV для этих двух обработок уменьшены в 32 и 2250 раз, соответственно, по сравнению с ложной обработкой, как определено путем сравнения БОЕ/мл. Удаление холестерина обоими растворителями относительно специфично, поскольку содержание белка снижается меньше чем на 20% при различных обработках. В пределах способности количественно оценивать активность гемагглютинации (ГА), 50 мМ МБЦД влияет на активность ГА в той же степени, что и 2-8% ДИПЭ.

Таблица 2

Обработка	БОЕ/мл	Единиц ГА	Белок (мг/мл)	Холестерин (мкг/мл)
Ложная обработка	$9,0 \times 10^8$	64	0,39	8,26
2% ДИПЭ	$1,2 \times 10^8$	32	0,39 (100%) ^a	6,61 (80,0%) ^a
4% ДИПЭ	$1,4 \times 10^8$	32	0,32 (82%) ^a	4,88 (59,1%) ^a
8% ДИПЭ	$9,0 \times 10^7$	32	0,36 (92%) ^a	3,47 (42,0%) ^a
12% ДИПЭ	$2,8 \times 10^7$	16	0,33 (85%) ^a	1,81 (21,9%) ^a
50 мМ МБЦД	$4,0 \times 10^5$	32	0,33 (85%) ^a	0,14 (1,7%) ^a

Примечание: ^a процент по сравнению с ложной обработкой.

Обработка растворителями в течение 45 мин.

Обработки выше повторяются, за исключением того, что продолжительность обработки с помощью МБЦД увеличивается с 30 до 45 мин. Результаты показаны в табл. 3.

Таблица 3

Обработка	БОЕ/мл	Единиц ГА	Белок (мг/мл)	Холестерин (мкг/мл)
Ложная обработка ^a	$1,2 \times 10^7$	32	0,42	6,16
10% ДИПЭ ^a	$1,0 \times 10^5$	16	0,21 (50%) ^c	1,32 (21,4%) ^c
50 мМ МБЦД ^b	$1,0 \times 10^3$	32	0,39 (94%) ^c	0,15 (2,5%) ^c

Примечание: ^a вращение с донышка на крышку при 37°C в течение 30 мин;

^b вращение с донышка на крышку при 37°C в течение 45 мин; ^c процент по сравнению с ложной обработкой.

Как и при 30-минутной обработке, 45-минутная обработка 50 мМ МБЦД удаляет около 97% холестерина для IFV и делает вирус более чем в 10000 раз менее инфекционным *in vitro* по сравнению с ложной обработкой. Напротив, 10% ДИПЭ (30-минутная обработка) является менее эффективным при удалении холестерина (около 80%) и приводит примерно к 120-кратному уменьшению инфекционности *in vitro*. МБЦД не оказывает в известной мере влияния на активность ГА, в то время как 10% ДИПЭ в известной мере значительно снижает ее. Содержание белка снижается до 50% после обработки 10% ДИПЭ по сравнению с 6%-ным уменьшением после 50 мМ МБЦД.

Представленные в данном документе два набора экспериментов демонстрируют, что 50 мМ МБЦД селективно удаляет холестерин и делает делипидированный IFV менее инфекционным, сохраняя при этом большинство белков. Однако ни один из данных способ обработки не был способен полностью аннулировать инфекционность и, таким образом, полностью инактивировать вирус, поэтому для полной инактивации вирусов гриппа требуется дополнительная оптимизация процедуры. Дополнительная оптимизация может включать в себя, без ограничения, увеличение времени обработки с помощью МБЦД, и обработку вируса в течение второго периода времени с помощью МБЦД.

Пример 2.

Обработка штамма ВРРСС с помощью МБЦД селективно удаляет холестерин, снижает вирусную инфекционность и сохраняет большую часть вирусных белков.

Реагенты.

Штамм вируса ВРРСС, применяемый в данном примере, представляет собой RESP (Академия сельскохозяйственных наук провинции Цзянсу, Китай). Используемая линия клеток-хозяев - Marc-145 (Wuxi AppTec, Шанхай, Китай). Другие применяемые реагенты такие же, как в Примере 1 выше, за исключением DMEM (Invitrogen), которую используют при культивировании клеток Marc-145.

Размножение ВРРСС в клетках Marc-145.

Клетки высевают с ВРРСС в соответствии со следующей процедурой. Среду отделяют от клеток Marc-145, выращенных в колбах T-75, монослой клеток Marc-145 промывают 5 мл PBS при комнатной температуре и клетки открепляют с помощью 1,5 мл трипсина/ЭДТК при 37°C. Клетки ресуспендируют в 10 мл DMEM, содержащей 10% ФБС, и осаждают центрифугированием при 800 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Клетки ресуспендируют в DMEM, содержащей 10% ФБС, и плотность клеток доводят до $2,5 \times 10^5$ клеток/мл. 15 мл суспензии клеток Marc-145 высевают в каждую колбу T75 и колбы размещают при 37°C с 5% CO₂ и инкубируют в течение ночи.

Когда клетки Marc-145 сливаются больше чем на 90%, DMEM удаляют из колб T-75, добавляют 5 мл поддерживающей среды EMEM, содержащей 2% ФБС, и клетки инфицируют вирусом ВРРСС при МОИ 0,1. Колбы инкубируют в течение 60-90 мин при 37°C с 5% CO₂ и осторожно встряхивают каждые 15 мин. В каждую колбу добавляют 10 мл поддерживающей среды EMEM, содержащей 2% ФБС, и колбы инкубируют в течение 96 ч при 37°C и 5% CO₂. Когда достигается примерно 80% ЦПЭ (как правило, через 96 ч), культуральные супернатанты собирают для получения ВРРСС.

Очистка ВРРСС.

ВРРСС очищают в соответствии со следующей процедурой. Собранный супернатант культуры центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин для удаления клеточного дебриса и супернатант соби-

рают. Супернатант центрифугируют при 100000 об/мин в течение 60 мин для осаждения ВРРСС. Осадок ВРРСС ресуспендируют в соответствующем объеме забуференного физиологического раствора (PBS) до титра 1×10^9 БОЕ/мл. Аликвоты по 100 мкл концентрированного ВРРСС хранят при -80°C .

ВРРСС титровали для определения инфекционности *in vitro*, применяя следующую процедуру. Используя клеточную культуру и описанные выше процедуры преобразования, клетки Marc-145 суспендируют в DMEM, содержащей 10% ФБС до конечной плотности $1,5 \times 10^5$ клеток/мл. В каждую лунку 6-луночной плашки добавляют 2 мл суспензии клеток Marc-145 и плашки инкубируют в течение ночи при 37°C с 5% CO_2 . Вирусные образцы оттаивают на водяной бане с температурой 37°C с последующим центрифугированием при $500 \times g$ в течение 10 мин при 4°C . Получают серию разведений 1/10 вирусов и хранят при 4°C до применения, используя EMEM в качестве буфера для разведения.

Когда клетки Marc-145 сливаются по меньшей мере на 90%, среду удаляют и в каждую лунку добавляют 0,5 мл буфера для разведения и 0,5 мл разведения вируса. Для отрицательного контроля применяют 1,0 мл буфера для разведения. Плашки осторожно встряхивают сразу же после добавления каждого разведения. Плашки инкубируют в течение 60-90 мин при 37°C в 5% CO_2 и качают каждые 15 мин. Каждую лунку каждой 6-луночной плашки затем покрывают 3 мл смеси 1:4 2,5% агарозы с низкой температурой плавления в растворе PBS и буфером для разведения при 37°C . Плашки инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин, чтобы позволить покрывающей смеси затвердеть, затем плашки инкубируют при 37°C с 5% CO_2 в течение 96 ч.

Бляшки визуализируют, применяя следующую процедуру. После того, как бляшки полностью сформируются (96 ч после инфицирования), добавляют 1 мл 4% параформальдегида и плашки инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч. Растворенную агарозу отбрасывают и к каждой лунке добавляют 0,5 мл 0,5% кристаллического фиолетового. Количество бляшек подсчитывают после 15 мин инкубации с кристаллическим фиолетовым, и переводят в титр исходя из коэффициентов разбавления.

Размножение ВРРСС *in vitro*.

Титр ВРРСС больше чем 1×10^7 БОЕ/мл является предпочтительным для анализа белка и холестерина. Размножение штамма RESP-ВРРСС в клетках Marc-145 дает концентрированный образец вируса, имеющий титр $>1 \times 10^8$ БОЕ/мл.

Делипидирование ВРРСС.

Обработки растворителем и ложную обработку проводят в соответствии со следующей процедурой. Аликвоты по 100 мкл концентрированного стока ВРРСС с около 1×10^9 БОЕ/мл разводят в 900 мкл PBS в пробирках "Eppendorf" до достижения конечного титра $1,0\text{--}5,0 \times 10^8$ БОЕ/мл. МБЦД в PBS добавляют до желаемой концентрации для обработки растворителем или добавляют равный объем PBS для ложной обработки. Пробирки "Eppendorf" затем закрывают и герметизируют парафильмом. Все образцы закрепляют в орбитальном встряхивателе с воздушной баней с постоянной температурой SHZ-82 (Changzhou Guohua Appliance Co., Китай), предварительно нагретой до 37°C . Образцы, обработанные растворителем, и ложно обработанные образцы вращают с орбитальной скоростью вращения 220 об/мин при 37°C в течение желаемого времени. Соответствующие образцы вращают в микроцентрифуге в течение 1 мин, а супернатанты, содержащие IFV, переносят в ультрацентрифужные пробирки. Пробирки центрифугируют при $100000 \times g$ (центрифуга OPTIMA™ L-100XP; Beckman Coulter, Inc., Индианаполис IN) в течение 30 мин, чтобы осадить ВРРСС, и супернатанты отбрасывают. Осадки ВРРСС ресуспендируют в 200 мкл PBS и хранят при -80°C до дополнительных анализов.

Характеристика делипидированного ВРРСС.

Содержание белка в делипидированном и ложно обработанном ВРРСС определяют, применяя анализ BCA (набор для белкового анализа PIERCE™ BCA) в соответствии с инструкциями производителя. Содержание холестерина также определяют, применяя количественный анализ на холестерин (набор анализа холестерина AMPLEX® Red, Life Technologies, Остров Гранд, Нью-Йорк), выполняемый в соответствии с инструкцией производителя. Инфекционность *in vitro* измеряют, применяя те же процедуры, что указаны выше.

Концентрационная зависимость МБЦД.

В первом эксперименте по делипидированию, ВРРСС делипидируют с помощью 5, 10, 20, 30 и 50 мМ МБЦД в течение 60 мин при 37°C . После ультрацентрифугирования ложно обработанные и делипидированные образцы тестируют на инфекционность *in vitro* в клетках Marc-145, а содержание белка и холестерина определяют, применяя процедуры, изложенные выше. Инфекционность, содержание белка и содержание холестерина в делипидированном ВРРСС показаны в табл. 4.

Таблица 4

Обработка	Инфекционность <i>in vitro</i> (БОЕ/мл)	Содержание белка (мг/мл)	Содержание холестерина (мкг/мл)
Ложная обработка	$1,6 \times 10^7$	4,46	11,64
5 мМ МБЦД	$1,4 \times 10^7$	3,94 (88%) ^a	9,82 (84%) ^a
10 мМ МБЦД	$7,0 \times 10^6$	4,00 (89%) ^a	4,66 (40%) ^a
20 мМ МБЦД	$2,8 \times 10^6$	4,05 (90%) ^a	4,46 (38%) ^a
30 мМ МБЦД	$1,2 \times 10^5$	4,36 (97%) ^a	4,00 (34%) ^a
50 мМ МБЦД	$4,2 \times 10^4$	4,40 (98%) ^a	3,29 (28%) ^a

Примечание: ^a процент по сравнению с ложной обработкой.

Титр исходного стока RESP-BPPCC составляет $1,0 \times 10^8$ БОЕ/мл, из которых 0,1 мл смешивают с 0,9 мл PBS вместе с соответствующим количеством МБЦД. После орбитального встряхивания при 220 об/мин в течение 60 мин при 37°C образцы вируса осаждают путем ультрацентрифугирования и суспендируют в конечном объеме 0,2 мл PBS. Титр ложно обработанного образца составляет $1,6 \times 10^7$ БОЕ/мл (табл. 4), что указывает на то, что после ложной обработки восстанавливается больше чем 30% вирусной активности. Обработка МБЦД снижает инфекционность и содержание холестерина в значительной степени зависимым от концентрации образом, в то время как 88-98% общего содержания белка восстанавливается при всех концентрациях МБЦД (см. табл. 4). После обработки 50 мМ МБЦД делипидированный BPPCC сохраняет около 28% исходного количества холестерина по сравнению с ложно обработанным образцом, а инфекционная активность BPPCC снижается примерно в 380 раз, но опять же не аннулируется полностью.

Анализ слепым пассажем делипидированного образца BPPCC.

Титр одного из делипидированных образцов BPPCC (100 мМ МБЦД в течение 90 мин) находится на пределе обнаружения. Возникает вопрос, есть ли в образце какие-либо инфекционные частицы вируса. Чтобы ответить на вопрос о наличии таких инфекционных вирусных частиц, новый образец делипидируют с помощью 100 мМ МБЦД в течение 90 мин и подвергают анализу слепым пассажем, описанному ниже. В то время как контрольный образец RESP-BPPCC имеет титр $1,6 \times 10^6$ БОЕ/мл, бляшки не обнаруживаются с помощью анализа слепым пассажем для образца BPPCC, делипидированного 100 мМ МБЦД в течение 90 мин. Делипидирование 100 мМ МБЦД в течение 90 мин, вероятно, полностью инактивирует RESP-BPPCC.

Анализ слепым пассажем проводят в соответствии со следующей процедурой. 100 мкл делипидированного образца BPPCC переносят в каждую лунку 6-луночной плашки, содержащей клетки Marc-145, полученные по вышеуказанной методике. Плашки инкубируют в течение 4 дней при 37°C в 5% CO₂. Выполняют три последовательных цикла замораживания-оттаивания для лизиса клеток, а супернатанты, содержащие BPPCC, собирают и центрифугируют при 800 об/мин в течение 5 мин при 4°C. 400 мкл супернатанта переносят в колбу с клетками Marc-145. Колбы инкубируют в течение 4 дней при 37°C и 5% CO₂. Циклы замораживания-оттаивания повторяют и супернатанты снова собирают, центрифугируют и переносят в колбу с клетками Marc-145, как и раньше. Циклы замораживания-оттаивания повторяют еще раз, супернатанты снова собирают и центрифугируют, а супернатанты, содержащие BPPCC, замораживают при -80°C до дальнейшего применения. Титр BPPCC конечных, собранных образцов определяют, применяя клетки Marc-145, как указано выше.

Пример 3.

Целью данного исследования было определение временной зависимости для инактивации штамма ND 99-14 BPPCC с помощью метода делипидирования, в котором применяют метил-β-циклодекстрин (МБЦД). МБЦД был приобретен в виде порошка в STD, Inc. (Алачуа, Флорида). Стоковый 300 мМ раствор готовили добавлением 1000 мл воды к 280 г МБЦД для получения стокового раствора.

Делипидирование вируса.

Эксперименты по кинетике инактивации проводили, применяя штамм ND99-14 BPPCC, описанные в совместно рассматриваемой заявке на патент США № 62/296658, поданной 18 февраля 2016 г. В целом, как правило, способ включает добавление МБЦД в конечной концентрации 40 мМ и суммарно 72 ч инкубации при комнатной температуре с постоянным перемешиванием. Добавление МБЦД происходит в 2 стадии, 20 мМ, чтобы начать процесс инактивации, дополнительные 20 мМ МБЦД добавляют через 24 ч и инкубируют еще 48 ч при комнатной температуре с постоянным перемешиванием. Комнатная температура составляет от около 20 до около 25°C и оптимально составляет от около 22 до около 24°C.

300 мМ сток раствора МБЦД сначала добавляли к вирусу до конечной концентрации 20 мМ, добавляя 567 мл раствора МБЦД к 8,5 л вирусного стока. Вирус инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре с перемешиванием со скоростью 50 об/мин. 30 мл вируса собирали через 0 ч, 15 мин, 4, 8, 12, 16, 20 и 24 ч после добавления МБЦД. Аликвоты для каждой временной точки хранили при 4 и -70°C до дальнейшего применения.

После сбора 24-часового образца вирус переносили в новую емкость. Добавляли дополнительно

20 мМ МБЦД (650 мл МБЦД добавляли к 9,75 л вирусного стока), чтобы достичь конечной концентрации 40 мМ. Вирус инкубировали еще 48 ч при комнатной температуре. 30 мл вируса собирали через 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84 и 96 ч после первого добавления МБЦД. Аликвоты для каждой временной точки хранили при 4 и -70°C до дальнейшего применения.

Измерение количества вируса.

Десятикратные серийные разведения (10^{-1} - 10^{-9}) ложно инактивированного и инактивированного вируса добавляли к клеткам MARC145, которые культивировали в 96-луночных планках. Планки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 96 ч, чтобы живой вирус мог заражать клетки. Репликацию вируса определяли наблюдением цитопатического эффекта (ЦПЭ) вследствие вирусной инфекции клеток Marc-145. Оценивали каждую лунку, содержащую разведение вируса, как позитивную или как отрицательную по отношению к ЦПЭ, и полученное число позитивных или отрицательных лунок для каждого разведения применяли для определения TCID₅₀/мл, применяя вычисление Reid-Muench TCID₅₀. Ложно инактивированный вирус обрабатывали в той же среде и температурных условиях, что и инактивированный вирус, без добавления инактивирующего агента.

Три последовательных слепых пассажа ложно инактивированного и инактивированного вируса, а также контроля только с культуральной средой выполняли, применяя клетки Marc-145, культивируемые в колбах T-225. Инактивированные и контрольные образцы добавляли к 2-дневной культуре клеток Marc-145 и инкубировали в течение 7 дней при 37°C и 5% CO₂ (3 мл образца в 27 мл среды). Колбы визуально проверяли на наличие ЦПЭ. Каждую колбу оценивали как позитивную (+) или отрицательную (-) по отношению к ЦПЭ и результаты записывали. Супернатанты из колб собирали и добавляли в новую серию колб T-225, содержащих 2-дневные культуры клеток Marc-145 и инкубировали в течение 7 дней при 37°C и 5% CO₂. Вышеупомянутый процесс повторяли дважды, чтобы получить результаты ЦПЭ для трех последовательных пассажей вируса.

Титры вируса РРСС определяли для всех временных точек, собранных в течение 96-часового периода инкубации, применяя образцы, хранящиеся при двух разных температурах, как показано. 0 указывает на то, что титр был не обнаруживаемым или не определяемым с помощью анализа определения Live VirusTCID₅₀ РРСС. Результаты, представленные в табл. 5, показали, что 40 мМ, добавляемые в двухстадийном способе, способны инактивировать вирус РРСС с титром не меньше чем 8 log₁₀ TCID₅₀/МЛ. Более высокие титры продемонстрировали неполную инактивацию с помощью 20 мМ МБЦД, но вирус не обнаруживался после второго добавления МБЦД, с целью довести концентрацию до 40 мМ. Результаты также показали, что время было менее важным фактором для инактивации. Более длительное время инкубации при заданной концентрации МБЦД не увеличивало уровень инактивации. Концентрация МБЦД в 20 мМ уменьшала количество живого вируса примерно на 2,5 log после 15 мин инкубации, и уровень обнаруженного живого вируса оставался постоянным в течение 24 ч. Второе добавление 20 мМ МБЦД в течение 24 ч инкубации инактивировало вирус до не обнаруживаемых уровней до следующей точки времени сбора образцов (30 ч). Различия в жизнеспособности наблюдались также в присутствии 40 мМ МБЦД при различных температурах хранения. Образцы временных точек с детектируемым живым вирусом имели по меньшей мере в 100 раз меньше вируса при хранении при -70°C по сравнению с 4°C.

Таблица 5

Час	Образцы, хранящиеся при температуре 4 °C	Образцы, хранящиеся при температуре -70 °C
0,25	5,8 ^a	3,3
4	5,8	н.д.
8	5,9	2,8
12	5,6	3,2
16	5,6	3,2
20	5,6	3,4
24	5,6	3,6
30	0	0
36	0	0
42	0	0
48	0	0
56	0	0
64	0	0
72	0	0
84	0	0
96	0	0

^a log₁₀ TCID₅₀/мл.

Пример 4.

Целью данного исследования было оценить безопасность и эффективность экспериментальных

инактивированных вакцин BPPCC в исследовании, посвященном вакцинации. Вакцины оценивали по их способности уменьшать поражение легких и уровни вирусемии. Важнейшие характеристики вакцины включают температуру хранения, количество доз (1 по сравнению с 2) и добавление адъюванта. Исследование проводилось в учреждениях BSL-2 в Veterinary Resources, Inc., Кембридж, Айова. Лабораторные анализы проводили в Ветеринарной диагностической лаборатории Государственного университета штата Айова, Аймс, Айова, и в Ветеринарной диагностической лаборатории Государственного университета штата Южная Дакота, Брукингс, Южная Дакота. 60 клинически здоровых поросят-отъемышей в возрасте 3 недель, которые были серонегативными по BPPCC, были включены в исследование. Поросят ранжировали по уменьшению массы тела и формировали 10 блоков по 6 животных. Поросята были рандомизированы в одну из шести групп лечения (10 свиней в группе). Группы лечения включали невакцинированную контрольную группу (T01) и пять групп, вакцинированных с помощью экспериментальных вакцин инактивированного BPPCC. Вакцины были инактивированы путем делипидирования с применением метил-бета-циклодекстрина (МБЦД). Вакцины групп T02 и T03 не содержали адъюванта и хранились при 2-8°C (T02) или -20°C (T03). Вакцины групп T04 и T05 содержали адъювант MONTANIDE™ Gel 01 (Seppic), и их вводили один раз (T04) или дважды (T05). Вакцина группы T06 содержала адъювант MONTANIDE™ IMS 1313 VG N PR (Seppic), и ее вводили дважды.

Поросят кормили стандартными коммерческими медикаментозными (CTC/DENAGARD®) стартерными диетами (NRC, 2012) *ad libitum* через кормушки с полной загрузкой. У поросят был доступ к чистой питьевой воде *ad libitum* через nipple-поилку. Всех исследуемых поросят лечили с помощью EXCEDE спустя 10 дней после вакцинации (ДПВ). Кроме того, всех поросят лечили одной дозой VITAL E®-500 и еще одной обработкой EXCEDE® 21 ДПВ. Все лекарства вводили в соответствии с указаниями на этикетках.

Вакцины.

Штамм SD 11-21 BPPCC (количество пассажей 84) применяли в качестве антигена в текущем исследовании. SD11-21 представляет собой полевой штамм, который был адаптирован для роста в культуре клеток посредством 84 пассажей через клеточную линию Marc-145, а также трех раундов очистки и центрифугирование в градиенте сахарозы бляшек, как описано в совместно рассматриваемой заявке на патент США № 62/296658, поданной 18 февраля 2016 г. Пассаж 85 (p85) был получен в 5 л одноразовом биореакторе BioBLU (Eppendorf, Гамбург, Германия), который инокулировали Marc-145, прикрепленными к микроносителям HILLEX II (Pall Corporation, Порт-Вашингтон, Нью-Йорк) в среде OPTI-MEM (Life Technologies, Остров Гранд, Нью-Йорк), дополненной 2% фетальной бычьей сывороткой (Sigma, Сент-Луис, Миссури) и 50 мкг/мл гентамицина (Life Technologies, Остров Гранд, Нью-Йорк). Титр собранного стока вируса p85 составлял 7,3 log₁₀ TCID₅₀, как определено с помощью анализа титрования вируса, описанного в Примере 3.

В 1-литровый флакон к 300 мл стока вируса SD11-21 добавляли 19,7 мл 300 мМ стокового раствора МБЦД (Sigma, Сент-Луис, Миссури). Смесь инкубировали при комнатной температуре с постоянным перемешиванием при 50 об/мин в течение 24 ч. После 24-часовой инкубации добавляли еще 9,8 мл стокового раствора МБЦД и смесь инкубировали при комнатной температуре с постоянным перемешиванием при 50 об/мин в течение дополнительных 24 ч. Конечная концентрация МБЦД составляла 30 мМ, с суммарными 48 ч инкубации при комнатной температуре. Также был приготовлен сток ложно инактивированного вируса путем добавления эквивалентного количества воды вместо МБЦД, время инкубирования и время смешивания были идентичны таковым инактивированного вируса. Ложно инактивированный вирус применяли в качестве контроля для анализа измерений вируса. После обработки ложно инактивированный вирус присутствовал в 6,5 log₁₀ TCID₅₀/мл, тогда как живой вирус не был обнаружен в растворе, инактивированном МБЦД. Вирусные стоки хранили при 4°C до дальнейшего использования.

Вакцины были составлены так, чтобы включать стабилизатор и консервант. Применяли среду с уменьшенным содержанием сыворотки OPTI-MEM® I в качестве разбавителя для приготовления смесей. Адъюванты включали в себя коммерческие составы MONTANIDE™ Gel 01 (Seppic) и MONTANIDE™ 1313 VG N PR (Seppic). Контрольным продуктом был коммерческий препарат (Corning Cellgro, Mediatech Inc.), забуференный фосфатом физиологического раствора (PBS). Вакцины без адъюванта содержали делипидированный вирус, 25% стабилизатор В, 25 мкг/мл гентамицин в качестве консерванта и разбавитель для приготовления смесей. Вакцины с адъювантом содержали 20% указанного адъюванта. Стабилизатор В содержал 2,5% D-маннитола (Sigma), 1,2% желатина типа А (Fisher, Питтсбург, Пенсильвания), 1% NZ амин казеин гидросиликата (Sigma), 5% сахарозы (Sigma) и 6,2% трегалозы (Fisher) в ультраточной воде (Life Technologies) при pH 7,0-7,2.

Вакцинация и заражение.

Каждый из 60 поросят, включенных в исследование, был вакцинирован в день -35 до заражения. Поросятам в T01-T05 вводили назначенное лечение в виде 1,0 мл внутримышечной дозы в правую часть шеи. Поросятам в T06 вводили 1,5 мл. Поросята в T01-T03, и T05 и T06 снова были вакцинированы 14 дней спустя (-21 день до заражения) таким же способом. В ДДЗ (дней до заражения) 0 материал для заражения готовили путем оттаивания замороженных аликвот штамма NADC-20 сразу же перед заражением.

ем. Было определено, что титр составлял $1,26 \times 10^{5,0}$ TCID₅₀/мл после разбавления в минимальной питательной среде Игла с солями Игла и L-глутамином (MEM) от Mediatech, Inc. Каждого поросенка ограничивали в движениях для заражения, при этом голова была направлена вверх. Применяли 3 мл шприц без люэровского замка для доставки 2 мл дозы интраназально, примерно 1 мл в каждую ноздрю.

Результаты.

На 14 день после заражения животные подвергались процедурам гуманной эвтаназии, каждое отдельно. Легкие вырезались и оценивались исследователем эксперимента, который не был осведомлен о группах лечения. Каждая из семи легочных долек была исследована как визуально, так и пальпацией для обнаружения крупных характерных поражений, связанных с ВРСС. Количество поражений/уплотнений в каждой легочной дольке оценивали как фактическое значение между 0 и 100% дольки. Оценка для каждой дольки была введена во взвешенную формулу для расчета процента легкого с поражением. Процент совокупного количества легких с поражениями рассчитывали в соответствии со следующей формулой:

$$\text{Процент совокупного количества легких с поражениями} = \{(0,10 \times \text{левая апикальная}) + (0,10 \times \text{левая сердечная}) + (0,25 \times \text{левая диафрагмальная}) + (0,10 \times \text{правая апикальная}) + (0,10 \times \text{правая сердечная}) + (0,25 \times \text{правая диафрагмальная}) + (0,10 \times \text{промежуточная})\}.$$

Кроме того, проценты совокупного количества легких с поражениями преобразовывали, применяя квадратный корень арксинуса перед дальнейшим анализом. Преобразованные данные анализировали смешанной линейной моделью, которая включала в себя фиксированный эффект лечения (процедура MIXED в SAS) и случайный эффект блока.

Результаты статистического анализа оценок поражения легких резюмированы в табл. 6. Основной эффект лечения был статистически значимым ($P=0,0003$). Сравнение с контрольной группой (T01) показало значимо меньший ($P<0,05$) процент поражения легких в группах, обработанных адьювантом Gel 01 (T04 и T05). Кроме того, неадьювантная вакцина, вводимая дважды и хранившаяся при 2-8°C (T02), приводила к значимо более низким ($P<0,05$) оценкам поражения, в сравнении с аналогичной группой, обработанной вакциной, хранившейся при -20°C (T03).

Таблица 6

Средняя оценка поражения легких - преобразованный арксинусом
процент поражения легких (основной эффект лечения: $P=0,0003$)

Группа обработки	Оценка ¹	Среднеквадратичная ошибка	Среднее ²
T01 (Плацебо)	0,4760	0,1085	20,99
T02 (без адьюванта, 2 дозы)	0,2761	0,1105	7,43
T03 (инактивированный РССС хранили при -70 °C)	0,6338	0,1085	35,07
T04 (адьювант Gel 01, одиночная доза)	0,1678	0,1085	2,79*
T05 (адьювант Gel 01, 2 дозы)	0,2128	0,1141	4,46*
T06 (адьювант 1313, 2 дозы)	0,3418	0,1085	11,24
T02 по сравнению с T03	Р-значение =		0,0013
T04 по сравнению с T05	Р-значение =		0,6692
T02 по сравнению с T05	Р-значение =		0,5594

*T01 по сравнению с T04 и T05 значимо отличается при $P<0,05$.

¹Непреобразованные средние.

²Обратно преобразованные средние.

Образцы крови для определения уровней вирусемии собирали в день -35 и -21 перед заражением. Кроме того, образцы крови для определения уровней вирусемии собирали на 0, 3, 7, 10 и 14 день после заражения. Образцы исследовали на присутствие вируса нуклеиновых кислот РССС, применяя методы qRT-PCR.

Данные серологии и вирусемии были преобразованы в log₁₀ единицы перед анализами, с учетом ненормального распределения. Преобразованные значения анализировали, применяя смешанную модель повторных измерений (процедура MIXED). Статистическая модель включала в себя лечение, время и зависимость эффекта лечения от времени в качестве фиксированных эффектов. Блок был включен в модель как случайный эффект. Если зависимость эффекта лечения от времени была значимой ($P<0,05$), то оценивали эффекты в пределах времени лечения. Если эффект лечения в зависимости от времени не был значимым, был оценен основной эффект лечения. Представлены средние значения, полученные методом наименьших квадратов (обратно преобразованные), и среднеквадратические ошибки.

Анализ уровней вирусемии резюмирован в табл. 7. Вирусемия не наблюдалась у какого-либо поро-

сенка до заражения ВРСС, что подтверждает то, что вирус вакцины был инаktivирован. Из статистического анализа были исключены моменты времени, предшествующие заражению. После заражения эффект зависимости лечения от дня не был значимым ($P=0,0974$), поэтому был оценен основной эффект лечения. Эффект лечения был значимым ($P=0,0107$). Сравнение с контрольной группой (T01) показало значимо более низкие уровни ($P<0,05$) во всех вакцинированных группах, которым был введен адъювант (T04, T05 и T06). Ни одно из заранее запланированных сравнений не было статистически значимым.

Таблица 7

Вирусемия - Геометрические средние геномных копий ВРСС/мл
на 3, 7, 10 и 14 день после заражения ($\log_{10}$ преобразованные)
(основной эффект лечения: $P=0,011$; эффект лечения
в зависимости от дня: $P=0,097$)

Обработка	Оценка ¹	Среднеквадратичная ошибка	Геометрическое среднее ²
T01 (Плацебо)	6,2508	0,1149	1781506
T02 (без адъюванта, 2 дозы)	5,9855	0,1211	967187
T03 (инаktivированный РСС, который хранили при -70 °C)	6,2907	0,1149	1953141
T04 (адъювант Gel 01, одиночная доза)	5,8753	0,1149	750379*
T05 (адъювант Gel 01, 2 дозы)	5,7720	0,1211	591543*
T06 (адъювант 1313, 2 дозы)	5,8878	0,1149	772251*
T02 по сравнению с T03	Р-значение =		0,0733
T04 по сравнению с T05	Р-значение =		0,5389
T02 по сравнению с T05	Р-значение =		0,2182

*T01 по сравнению с T04, T05, T06, значимо отличается при $P<0,05$.

¹Непреобразованные средние $\log_{10}$.

²Обратно преобразованные средние.

Выводы.

Вакцинация поросят одной или двумя дозами вакцины, инаktivированной МБЦД, дополненной адъювантом Gel 01, была эффективной для значительного уменьшения как легочных поражений, так и уровней вирусемии по сравнению с контрольной группой. Поражения легких были численно уменьшены у поросят, вакцинированных другими, инаktivированными МБЦД, вакцинами (T02 и T06), хранящимися при 2-8°C. Из-за вариаций в оценках поражения легких эти различия не были значимыми на уровне $P<0,05$. Все вакцины МБЦД, содержащие адъювант (MONTANIDE™ Gel 01 или 1313), значительно уменьшали вирусемию. В будущих исследованиях может потребоваться больший размер выборки, когда применяется штамм NADC-20 в качестве материала для исследования, чтобы обнаружить значимые биологические различия как для легочных поражений, так и вирусемии.

Температура хранения, по-видимому, влияет на эффективность вакцины. Хранение вакцины при -20°C отрицательно повлияло на эффективность вакцины по сравнению с вакциной, хранящейся при 2-8°C.

Добавление дополнительной вакцинации через 14 дней после первой не улучшило эффективность вакцины у поросят, вакцинированных инаktivированной МБЦД вакциной, дополненной адъювантом Gel 01.

Включение адъюванта Gel 01 в инаktivированную МБЦД вакцину не влияло на эффективность вакцины.

Инаktivированные МБЦД вакцины были безопасны для растущих поросят, о чем свидетельствуют отсутствие системных реакций после вакцинации, отсутствие очагов поражения в местах инъекций, и наблюдали только временный (1 или 2 дня) лихорадочный ответ в группах адъюванта Serris MONTANIDE™ Gel 01 после второй вакцинации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ приготовления инаktivированного оболочечного вируса, включающий смешивание раствора, содержащего оболочечный вирус, с первым раствором метил-β-циклодекстрина (МБЦД) для получения первой смеси;
инкубирование первой смеси в течение первого периода времени;
смешивание оболочечного вируса из первой смеси со вторым раствором МБЦД для получения второй смеси;
инкубирование указанной второй смеси в течение второго периода времени.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что концентрация МБЦД в первой смеси составляет по меньшей мере от 5 до около 100 мМ.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что концентрация МБЦД в первой смеси составляет от около

20 до около 40 мМ.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что концентрация МБЦД во второй смеси составляет от около 10 до около 100 мМ.

5. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что концентрация МБЦД во второй смеси составляет от около 30 до около 50 мМ.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что первый период времени составляет от около 15 мин до около 24 ч.

7. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что первый период времени составляет от около 4 до около 24 ч.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что второй период времени составляет от около 4 до около 48 ч.

9. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что второй период времени составляет около 24, около 36 или около 48 ч.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что температура по меньшей мере одного из первого периода времени и второго периода времени составляет от около 20 до около 25°C.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что температура составляет от около 22 до около 24°C.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что оболочечный вирус выделяют из первой смеси перед стадией получения второй смеси.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что оболочечный вирус представляет собой вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС).

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что по меньшей мере один из первого периода времени и второго периода времени дополнительно включает перемешивание первой смеси и/или второй смеси.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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