



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.06.11

(22) Дата подачи заявки  
2019.03.25

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)  
*A61K 39/23* (2006.01)  
*A61P 31/20* (2006.01)  
*C07K 1/00* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОГЕННОЙ КОМПОЗИЦИИ

(31) 18163918.8

(32) 2018.03.26

(33) EP

(86) PCT/US2019/023932

(87) WO 2019/191005 2019.10.03

(71) Заявитель:  
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ЭНИМАЛ ХЕЛС Ю-ЭС-ЭЙ ИНК.  
(US)**

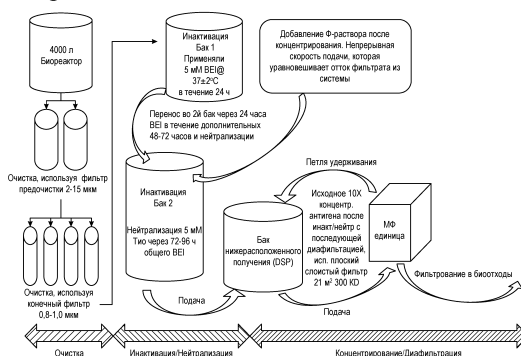
(72) Изобретатель:

Уилмс Ли, Кунс Мэттью, Браун  
Аманда (US), Гассель Михаэль  
Йоханнес, Орвейон Франсуа-Ксавье,  
Тёпфер Катарина Хедвиг (DE),  
Баутиста Элида, Шлезингер Кэти (US)

(74) Представитель:

Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,  
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение в особенности относится к способу получения иммуногенной композиции, проявляющей уменьшенную вирулицидную активность, а также к иммуногенной композиции и их применениям, где способ в особенности включает стадии: (а) обеспечение смеси с первой жидкостью и рекомбинантным белком, (б) концентрирование рекомбинантного белка в смеси путем удаления части первой жидкости из смеси и (в) обработку раствора, полученного на стадии (б), путем непрерывной диафильтрации.



## СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОГЕННОЙ КОМПОЗИЦИИ

### 5 ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к способам получения иммуногенных композиций, а также к таким иммуногенным композициям, проявляющим уменьшенную вирулицидную активность.

### 10 УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Цирковирус свиней 2 типа (PCV2) представляет собой небольшой (17-22 нм в диаметре), изоксаэдральный, безоболочечный ДНК вирус, который содержит одноцепочечный кольцевой геном. PCV2 имеет приблизительно 80% идентичность последовательностей с цирковирусом свиней 1 типа (PCV1). Тем  
15 не менее, в отличие от PCV1, который в целом является невирулентным, свиньи, инфицированные PCV2, проявляют синдром, обычно обозначаемый как мультисистемный синдром истощения после отъема (PMWS). PMWS клинически характеризуется истощением, бледностью кожных покровов, хилостью, нарушением дыхательных функций, диареей, желтушностью и желтухой. У  
20 некоторых пораженных свиней, будет проявляться комбинация всех симптомов, в то время как другие свиньи имеют только один или два из этих симптомов. Во время necropsии, также обнаруживаются микроскопические и макроскопические поражения во множественных тканях и органах, где наибольшее количество участков поражения наблюдается в лимфоидных органах. Наблюдается сильная  
25 корреляция между количеством нуклеиновой кислоты или антигеном PCV2 и тяжестью микроскопических лимфоидных поражений. Коэффициенты смертности для свиней, инфицированных PCV2, могут достигать 80%. Дополнительно к PMWS, PCV2 связан с несколькими другими инфекциями, включая псевдобешенство, репродуктивно-респираторный синдром свиней (PRRS), болезнь Глассера, стрептококковый менингит, сальмонеллёз,  
30 колибактериоз после отъема, диетический гепатоз и гнойную бронхопневмонию.

Доступно несколько вакцин для уменьшения влияния PCV2 инфекций у свиней. В US патенте № 6,703,023 раскрыта вакцина на основе ДНК для защиты свиней от PMWS. В WO 03/049703 описано получение живой химерной вакцины,

включающей непатогенный PCV1 вирус, в котором, однако, ORF2 белок заменен на ORF2 белок патогенного PCV2. В WO 99/18214 и WO 99/29717 раскрыты несколько PCV2 штаммов и процедур для приготовления убитой PCV2 вакцины. Приготовление субъединичных вакцин также было описано в WO 99/18214 и  
5 WO 99/29717. Эффективная субъединичная вакцина на основе ORF2 была описана в WO 06/072065. Другая субъединичная вакцина на основе ORF2 также была описана в WO 07/28823.

Белок PCV2 открытой рамки считывания 2 (ORF2), имеющий приблизительный молекулярный вес 30 кДа при прогоне на SDS-PAGE геле,  
10 ранее использовался в качестве антигенного компонента в вакцинах и иммуногенных композициях для PCV2. Типичные способы получения ORF2 для применения в таких вакцинах и композициях обычно состоят в амплификации ДНК PCV2, кодирующей ORF2, экспрессии ORF2 белка в клетке-хозяине, и выделение ORF2 белка из клетки-хозяина с помощью лизиса клеток. Затем  
15 восстановленный ORF2 клеточный лизат используют в качестве антигенной части иммуногенной композиции или вакцины. В некоторых случаях, клеточный лизат, содержащий ORF2, отделяют от клеточного дебриса.

Иммуногенные композиции против PCV2 и различные иммуногенные композиции против других патогенов часто имеют вирулицидный эффект на  
20 другие антигены. Например, существующие в настоящее время регуляторные стандарты в US (9 CFR 113.35) разрешают некоторую вирулицидную активность в мультивалентных композициях, но эта вирулицидная активность не может приводить к потере более чем 0,7 log/мл живого вируса или менее чем 0,7 log/мл КОЕ живых бактерий при комбинировании с другими компонентами  
25 иммуногенной композиции. Композиции, которые имеют бóльшую вирулицидную активность, чем разрешено, не могут комбинироваться с другими антигенами для создания мультивалентной вакцины.

С этой целью, в WO 11/28888 обеспечены способы уменьшения вирулицидной активности композиции, включающей PCV2 антиген, а также  
30 антигенных препаратов и иммуногенных композиций, включающих PCV2 антиген, где вирулицидная активность была уменьшена. В особенности, WO 11/28888 раскрывает способ получения такой PCV2 антигенной композиции в промышленном масштабе, где способ включает стадии:

I) получение первой жидкости, содержащей в ней PCV2 антиген, включающий вирусоподобные частицы ORF2 белка; и

II) удаление по меньшей мере части первой жидкости из PCV2 антигена, включающего вирусоподобные частицы ORF2 белка

5 с помощью стадии фильтрации, используя фильтр, где фильтр включает полупроницаемую мембрану, имеющую средний размер пор, который меньше, чем PCV-2 антиген, таким образом предотвращая прохождение по меньшей мере 90% PCV2 антигена через поры полупроницаемой мембраны и удерживает PCV2 антиген на фильтре,

10 где часть первой жидкости удаляют из PCV2 антигена путем обмена части первой жидкости на вторую жидкость, где вторая жидкость отличается от первой жидкости,

и где обмен части первой жидкости на вторую жидкость включает стадии:

а) добавление жидкости, включающее добавление второй жидкости к  
15 первой жидкости, которая содержит PCV-2 антиген; и

б) концентрирование PCV-2 антигена от 3X до 50X по сравнению с объемом первой жидкости путем удаления части первой и второй жидкостей.

Тем не менее, указанная стадия добавления жидкости а), включающая добавление второй жидкости предпочтительно в избыточном объеме к первой  
20 жидкости, может приводить к ограничению по отношению к общему масштабу получения, так как полученный объем первой и второй жидкости обычно увеличивается в несколько раз, перед стадией концентрации б), по сравнению с объемом первой жидкости.

Следовательно, необходимы дальнейшие способы для получения  
25 иммуногенных композиций, включающих рекомбинантный белок с уменьшенным вирулицидным эффектом в еще большем масштабе и даже в очень большом промышленном масштабе.

### ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Решение вышеописанных технических проблем достигается с помощью  
30 описания и вариантов осуществления, охарактеризованных в пунктах формулы изобретения.

Следовательно, изобретение в его различных аспектах реализуется в соответствии с формулой изобретения.

Изобретение основано на неожиданном обнаружении о том, что способ получения иммуногенной композиции, включающей рекомбинантный белок, является достаточным для желательных целей, где способ состоит из или включает стадии, предпочтительно в следующем порядке:

- 5 (а) обеспечение смеси, содержащей
- первую жидкость, и
  - рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, включающие множество указанного рекомбинантного белка,

10 (б) концентрирование рекомбинантного белка и/или указанных четвертичных структур в смеси, полученной на стадии (а), путем удаления части первой жидкости из смеси, и

(в) обработку раствора, полученного на стадии (б), путем непрерывной диафильтрации, в особенности путем непрерывной диафильтрации против второй жидкости, где вторая жидкость отличается от первой жидкости.

15 Подразумевается, что термин “первая жидкость”, как используется в настоящей заявке, является эквивалентным термину “исходная жидкость” или “жидкость (1)”, соответственно. Следовательно, термин “первая жидкость” является взаимозаменяемым с термином “жидкость (1)” или с термином “исходная жидкость”.

20 Также подразумевается, что термин “вторая жидкость”, как используется в настоящей заявке, является эквивалентным термину “дополнительная жидкость” или “жидкость (2)”, соответственно. Следовательно, термин “вторая жидкость” является взаимозаменяемым с термином “жидкость (2)” или с термином “дополнительная жидкость”.

25 В одном предпочтительном аспекте, смесь со стадии (а) дополнительно содержит вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный белок, где указанный вектор был инактивирован инактивирующим агентом. В соответствии с другим предпочтительным аспектом, смесь со стадии (а) дополнительно содержит

30 инактивирующий агент, который был нейтрализован нейтрализующим агентом.

В еще другом предпочтительном аспекте, смесь со стадии (а) дополнительно содержит нейтрализующий агент.

Как указано в настоящей заявке, подразумевается, в частности, что термин “смесь со стадии (а)” является синонимичным со “смесью, обеспеченной на

стадии (а)". Термин "обеспеченная на стадии", как используется в настоящей заявке, в особенности, понимается как эквивалентный "обеспеченная с помощью стадии".

Настоящее изобретение также относится к способу, как описано и/или заявлено в настоящей заявке, где смесь со стадии (а) выше, дополнительно содержит

- вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный белок, где указанный вектор был инактивирован инактивирующим агентом, и/или

- инактивирующий агент, который был нейтрализован нейтрализующим агентом, и/или

- нейтрализующий агент,

и где предпочтительно смесь со стадии (а) дополнительно содержит указанный вектор, указанный нейтрализованный инактивирующий агент и указанный нейтрализующий агент.

Более того, на стадии (в) раствор, полученный на стадии (б), предпочтительно обрабатывают путем непрерывной диафильтрации таким образом, что концентрация нейтрализованного инактивирующего агента и/или концентрация нейтрализующего агента снижена в обрабатываемом растворе.

Перед описанием аспектов настоящего изобретения, следует отметить, что, как используется в настоящей заявке и в пунктах приложенной формулы изобретения, формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если из контекста очевидно не следует другое. Таким образом, например, ссылка на "антиген" включает множество антигенов, ссылка на "вирус" представляет собой ссылку на один или больше вирусов и их эквивалентов, известных квалифицированным специалистам в данной области техники, и т.д. Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют такие же значения, как обычно подразумеваются квалифицированным специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, сходные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, могут использоваться при практическом осуществлении или тестировании согласно настоящему изобретению, в данной заявке описаны предпочтительные способы, устройства и материалы. Все публикации,

упомянутые в настоящей заявке, включены в нее путем ссылки для описания и раскрытия клеточных линий, векторов и методологий, как описано в публикациях, которые могут использоваться в связи с изобретением. Ничто из содержащегося в настоящем документе не должно рассматриваться как допущение, что изобретение не имеет права датировать такое раскрытие ранее в силу предсуществующего изобретения.

В одном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способ получения иммуногенной композиции, включающей рекомбинантный белок, где способ состоит из или включает стадии, предпочтительно в следующем порядке:

(a)(I) обеспечение смеси, содержащей

- первую жидкость,

- рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, включающие множество указанного рекомбинантного белка, и

- вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный белок;

(II) инактивацию вектора путем добавления инактивирующего агента к смеси со стадии (I);

(III) нейтрализацию инактивирующего агента путем добавления нейтрализующего агента к смеси, полученной на стадии (II);

(б) концентрирование рекомбинантного белка и/или указанных четвертичных структур в смеси, полученной на стадии (а)(III), путем удаления части первой жидкости из смеси,

(в) и обработку раствора, полученного на стадии (б), путем непрерывной диафильтрации таким образом, что концентрация нейтрализованного инактивирующего агента и/или концентрация нейтрализующего агента снижена в обрабатываемом растворе.

В особенности, непрерывная диафильтрация со стадии (в) представляет собой непрерывную диафильтрацию против второй жидкости, где вторая жидкость отличается от первой жидкости.

В контексте настоящего изобретения подразумевается, в частности, что “(I)”, “(II)” и “(III)” обозначают подстадии на стадии (а) или, соответственно, стадия (а) состоит из или включает подстадии “(I)”, “(II)” и “(III)”, и что, следовательно, “(I)” эквивалентно “(а)(I)”, “(II)” эквивалентно “(а)(II)” и “(III)” эквивалентно “(а)(III)”.

Как указано в настоящей заявке, подразумевается, в частности, что термин “смесь со стадии (I)” и “смесь со стадии (a)(I)”, соответственно, является синонимом “смеси, обеспеченной на стадии (I)” и “смеси, обеспеченной на стадии (a)(I)”, соответственно.

5 Для целей настоящего изобретения, “первая жидкость” относится к жидкости, водной или жидкой среде, типично используемой в комбинации с клетками, антигенами, иммуногенными композициями, вакцинами и т.д. Предпочтительно, первая жидкость включает среду из антигенной композиции; более предпочтительно, первая жидкость включает или предпочтительно состоит  
10 из среды для культивирования клеток, используемой для получения рекомбинантных белков в культивируемых клетках-хозяевах. Указанные культивируемые клетки-хозяева могут представлять собой клетки бактерий, дрожжей, клетки насекомых, клетки животных и клетки млекопитающих, где особенно предпочтительными являются клетки насекомых и клетки  
15 млекопитающих. Следовательно, первая жидкость может включать или состоять из среды для культивирования бактериальных клеток, дрожжей, клеток насекомых, клеток животных или клеток млекопитающих. Предпочтительно, клеточная среда представляет собой бессывороточную клеточную среду, и наиболее предпочтительно культуральная среда представляет собой  
20 бессывороточную среду Excell 420, когда используются клетки насекомых.

В другом аспекте, настоящее изобретение, следовательно, обеспечивает способ, как описано и заявлено в настоящей заявке, где указанная первая жидкость включает часть среды для культивирования клеток или состоит из среды для культивирования клеток, и где среда для культивирования клеток  
25 предпочтительно представляет собой среду для культивирования клеток насекомых.

“Часть”, для целей настоящего изобретения, относится к любому количеству, которое не охватывает все количество. Например, часть жидкости может представлять собой любое количество, менее чем 100% объема жидкости, такое как 90% жидкости, 80% жидкости, 70% жидкости, и все количества в  
30 диапазоне более чем 0% до менее чем 100%.

Термин “рекомбинантный белок”, как используется в настоящей заявке, в особенности относится к белку, который продуцируется с помощью методик рекомбинантных ДНК, где в целом ДНК, кодирующая экспрессируемый белок,

инсерируется в подходящий экспрессионный вектор, который, в свою очередь, используется для трансформации или, в случае вирусного вектора, для инфицирования клетки-хозяина для продуцирования гетерологичного белка. Следовательно, термин "рекомбинантный белок", как используется в настоящей заявке, относится, в частности, к молекуле белка, которая экспрессируется из рекомбинантной молекулы ДНК. "Рекомбинантная ДНК молекула", как используется в настоящей заявке, относится к молекуле ДНК, которая состоит из сегментов ДНК, соединенных вместе с помощью молекулярно-биологических методов. Подходящие системы для получения рекомбинантных белков включают, но не ограничиваясь только ими, клетки насекомых (*например, бакуловир*), прокариотические системы (*например, Escherichia coli*), дрожжи (*например, Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris*), клетки млекопитающих (*например, яичник китайского хомячка, HEK293*), растения (*например, сафлор*), клетки птиц, клетки амфибий, клетки рыб, и бесклеточные системы (*например, лизат ретикулоцитов кролика*).

В контексте настоящего изобретения рекомбинантный белок предпочтительно представляет собой рекомбинантный PCV2 ORF2 белок.

Термин "четвертичная структура", как используется в контексте настоящего изобретения, в особенности, относится к сборке многократно свернутых молекул белков в мульти-субъединичный комплекс, и в особенности относится к вирусоподобной частице.

"Четвертичная структура, включающая множество указанного рекомбинантного белка", для целей настоящего изобретения, относится к трехмерному расположению множества указанного рекомбинантного белка, такой как вирусоподобная частица, включающая множество указанного рекомбинантного белка. В этом отношении, подразумевается, в частности, что термин "множество указанного рекомбинантного белка" эквивалентен термину "множество рекомбинантного белка". В особенности, подразумевается, что указанный термин обозначает вирусоподобную частицу, включающую несколько молекул конкретного рекомбинантного белка, например, рекомбинантного PCV2 ORF2 белка. "Инактивация вектора", в контексте настоящего изобретения, в особенности обозначает, что вектору, в норме способному к репликации, придается неспособность к репликации. "Инактивация" в особенности относится к способу инактивации вектора.

“Инактивирующий агент”, для целей настоящего изобретения, относится к любому агенту, который можно использовать в любом общепринятом способе инактивации. Инактивацию можно осуществлять с помощью химических и/или физических обработок, которые известны квалифицированному специалисту в данной области техники. Предпочтительные инактивирующие агенты включают циклизированный бинарный этиленимин (BEI), включающий раствор гидробромида 2-бромэтиленамина (BEA), который был циклизирован до бинарного этиленимина (BEI). Другие предпочтительные химические инактивирующие агенты включают, но не ограничиваясь только ими, Тритон X-100, Дезоксихолат натрия, бромид цетилтриметиламмония,  $\beta$ -Пропиолактон, Тимеросал, Фенол и Формальдегид (Формалин). Таким образом, термин “инактивирующий агент”, как используется в настоящей заявке, в особенности относится к химическому агенту, способному модифицировать вектор путем химической реакции таким образом, что вектор становится неспособным к репликации.

Предпочтительно, инактивирующий агент представляет собой азиридиновое соединение, в особенности бинарный этиленимин (BEI) и/или инактивирующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к вектору, и в особенности в молярном избытке по отношению к азотистым основаниям пар оснований ДНК вектора, реагирующего с BEI.

“Нейтрализующий агент”, для целей настоящего изобретения, относится к любому агенту, способному нейтрализовать инактивирующие агенты, как описано в настоящей заявке, таким образом, что инактивирующий агент больше не способен инактивировать вектора. Если азиридиновое соединение используется для инактивации, то для нейтрализации предпочтительно использовать нуклеофил, которые открывает трехчленное кольцо. Агент, которые нейтрализует инактивирующий агент, предпочтительно представляет собой тиосульфат натрия, бисульфит натрия и другие.

Является особенно предпочтительным, что нейтрализующий агент представляет собой тиосульфат натрия и/или что нейтрализующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к инактивирующему агенту.

“Нейтрализованный инактивирующий агент”, как описано в настоящей заявке, в особенности относится к продукту или продуктам, полученному (ым) в результате химической реакции инактивирующего агента с нейтрализующим

агентом, например, к продуктам химической реакции BEI с тиосульфатом или другим нуклеофилом.

Любой общепринятый способ химической инактивации можно использовать для инактивации вектора. В предпочтительных формах, для химической обработки, температуру доводят до диапазона приблизительно 32°C - 42°C, более предпочтительно диапазона приблизительно 34°C - 40°C, и наиболее предпочтительно диапазона приблизительно 35°C - 39°C. Предпочтительные способы инактивации включают добавление циклизированного бинарного этиленимина (BEI), предпочтительно в концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 20 mM, предпочтительно от приблизительно 2 до приблизительно 10 mM, еще более предпочтительно от приблизительно 2 до приблизительно 8 mM, еще более предпочтительно от приблизительно 3 до приблизительно 7 mM, наиболее предпочтительно приблизительно 5 mM. Например, инактивация включает добавление раствора гидробромида 2-бромэтиленамина (BEA), предпочтительно приблизительно 0,4 M, который был циклизирован до 0,2 M бинарного этиленимина (BEI) в 0,3 n. NaOH, к жидкостям с получением конечной концентрации приблизительно 5 mM BEI. Предпочтительно, после этого жидкости перемешивают непрерывно в течение 2 - 96 часом. После завершения инактивации, добавляют раствор тиосульфата натрия, предпочтительно в концентрации 1,0 M для нейтрализации любого оставшегося BEI, и инаktivированные / нейтрализованные собранные жидкости можно хранить замороженными при - 40°C или ниже или в диапазоне приблизительно 1°C - 7°C. Предпочтительно, тиосульфат натрия добавляют в эквивалентном количестве по сравнению с BEI, добавленным ранее для инактивации. Например, в случае, если BEI добавляют до конечной концентрации 5 mM, то 1,0 M раствор тиосульфата натрия добавляют для получения конечной минимальной концентрации 5 mM для нейтрализации любого оставшегося BEI.

Таким образом, на стадии (III) нейтрализующий агент предпочтительно добавляют в эквивалентном количестве по сравнению с количеством инаktivирующего агента, добавленным на стадии (II). В контексте диапазонов, как описано в настоящей заявке, подразумевается, в частности, что “у – z” эквивалентно “у-z”, и оба являются эквивалентными “от у до z”, соответственно, таким образом, например, “0,1 - 1,0” эквивалентно “0,1-1,0”.

“Вектор”, а также “вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный белок”, для целей настоящего изобретения, относится к подходящему экспрессионному вектору, предпочтительно бакуловирусному экспрессионному вектору, который, в свою очередь, используется для трансфекции, или в случае бакуловирусного экспрессионного вектора, для инфицирования, клетки-хозяина для продуцирования белка или полипептида, кодируемого ДНК. Векторы и способы для получения и/или использования векторов (или рекомбинантов) для экспрессии, могут быть получены или изготовлены с помощью или аналогично способам, описанным в: патенты US №№ 4,603,112, 4,769,330, 5,174,993, 5,505,941, 5,338,683, 5,494,807, 4,722,848, 5,942,235, 5,364,773, 5,762,938, 5,770,212, 5,942,235, 382,425, PCT публикации WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update, "PNAS USA 93: 11349-11353, октябрь 1996 г.; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," PNAS USA 93: 11341-11348, октябрь 1996 г.; Smith и др., патент US № 4,745,051 (рекомбинантный бакуловирус); Richardson, C. D. (ред.), Methods in Molecular Biology 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith и др., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", Molecular and Cellular Biology, December, 1983, том 3, № 12, сс. 2156-2165; Pennock и др., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector, "Molecular and Cellular Biology March 1984, том 4, №. 3, с. 406; EPA0 370 573; US заявка № 920,197, поданная 16 октября 1986 г.; EP патентная публикация № 265785; патент US № 4,769,331 (рекомбинантный герпесвирус); Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," PNAS USA 93:11307-11312, октябрь 1996 г.; Andreansky и др., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," PNAS USA 93: 11313-11318, октябрь 1996 г.; Robertson и др., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", PNAS USA 93: 11334-11340, октябрь 1996 г.; Frolov и др., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," PNAS USA 93: 11371-11377, октябрь 1996 г.; Kitson и др., J. Virol. 65, 3068-3075, 1991; патенты US №№ 5,591,439, 5,552,143; WO 98/00166; на основании US заявки сер. №№ 08/675,556, и 08/675,566 обе поданные 3 июля

1996 г. (рекомбинантный аденовирус); Grunhaus и др., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," *Seminars in Virology* (том 3) сс. 237-52, 1993; Ballay и др. *EMBO Journal*, том 4, сс. 3861-65, Graham, Tibtech 8, 85-87, April, 1990; Prevec и др., *J. Gen Virol.* 70, 42434; PCT WO 91/11525; Felgner et al. (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561, *Science*, 259: 1745-49, 1993; и McClements и др., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, индуцирует protective иммунитет in animal models of herpes simplex virus-2 disease", *PNAS USA* 93: 11414-11420, октябрь 1996 г.; и патенты US №№ 5,591,639, 5,589,466, и 5,580,859, а также WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; Tang и др., *Nature*, and Furth и др., *Analytical Biochemistry*, relating to DNA expression vectors, в частности. См. также WO 98/33510; Ju и др., *Diabetologia*, 41: 736-739, 1998 (лентивирусная экспрессионная система); Sanford и др., патент US № 4,945,050; Fischbach и др. (Intracel); WO 90/01543; Robinson и др., *Seminars in Immunology* том 9, сс. 271-283 (1997), (ДНК векторные системы); Szoka и др., патент US № 4,394,448 (способ встраивания ДНК в живые клетки); McCormick и др., патент US № 5,677,178 (применение цитопатических вирусов); and патент US № 5,928,913 (векторы для доставки генов); а также в других документах, процитированных в настоящей заявке.

Предпочтительные вирусные векторы включают бакуловирус, такой как BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), в особенности обеспеченный таким образом, что продуцирующие клетки представляют собой клетки насекомых. Несмотря на то, что бакуловирусная экспрессионная система является предпочтительной, для квалифицированных специалистов в данной области техники понятно, что другие экспрессионные системы, включая те, которые описаны выше, будут работать для целей настоящего изобретения, а именно для экспрессии рекомбинантного белка.

Таким образом, в контексте настоящего изобретения, "вектор" предпочтительно представляет собой рекомбинантный вирус, предпочтительно бакуловирус, и/или "последовательность нуклеиновой кислоты" предпочтительно представляет собой ДНК последовательность.

Предпочтительно, на стадии (б) способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, удаление части первой жидкости из указанной смеси состоит из или включает фильтрование указанной смеси с по меньшей мере одним

фильтром, где указанный по меньшей мере один фильтр предпочтительно включает фильтровальную мембрану.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом, на стадии (б) указанное концентрирование включает

- 5           - подачу смеси в фильтрующую систему, содержащую по меньшей мере один фильтр, где по меньшей мере один фильтр включает фильтровальную мембрану, имеющую размер пор мембраны, позволяющий нейтрализованному инактивирующему агенту и/или нейтрализующему агенту проходить через нее, при этом удерживая рекомбинантный белок и/или
- 10          указанные четвертичные структуры в объемном потоке, и
- удаление фильтрата, включающего нейтрализованный инактивирующий агент и/или нейтрализующий агент.

В соответствии с дальнейшим предпочтительным аспектом, на стадии (в) указанная непрерывная диафильтрация включает

- 15           - подачу раствора в фильтрующую систему, содержащую по меньшей мере один фильтр, где по меньшей мере один фильтр включает фильтровальную мембрану, имеющую размер пор мембраны, позволяющий нейтрализованному инактивирующему агенту и/или нейтрализующему агенту проходить через нее, при этом удерживая рекомбинантный белок и/или
- 20          указанные четвертичные структуры в объемном потоке,
- удаление фильтрата, включающего нейтрализованный инактивирующий агент и/или нейтрализующий агент, и
- добавление второй жидкости к объемному потоку со скоростью, равной потоку фильтрата, где вторая жидкость отличается от первой
- 25          жидкости.

“Вторая жидкость”, для целей настоящего изобретения, относится к любой жидкости, которая в норме используется в комбинации с клетками, антигеном, иммуногенными композициями, вакцинами, и др., которая отличается от первой жидкости. Предпочтительно, вторая жидкость представляет собой водный

30          раствор, еще более предпочтительно фармацевтически приемлемый раствор, и еще более предпочтительно буфер, наиболее предпочтительно физиологически приемлемый буфер, такой как солевой раствор или фосфатный буфер и другие, например, Ф-раствор или PBS. Наиболее предпочтительно, вторая жидкость характеризуется тем, что она не является вирулицидной по отношению к любому

живому вирусу или живой бактерии, где живой вирус или живая бактерия культивируется или хранится в такой жидкости.

Предпочтительно, по меньшей мере один фильтр, описанный в настоящей заявке, представляет собой по меньшей мере один плоский слоистый фильтр и/или по меньшей мере один полуволоконный фильтр, где указанный по меньшей мере один фильтр представляет собой наиболее предпочтительно по меньшей мере один плоский слоистый фильтр. По меньшей мере один плоский слоистый фильтр представляет собой предпочтительно по меньшей мере один кассетный фильтр.

В особенности, по меньшей мере один фильтр представляет собой 2-8 фильтров, предпочтительно 5-7 фильтров, и наиболее предпочтительно 6 фильтров и/или каждый из по меньшей мере одного фильтра в особенности имеет общую площадь фильтрующего материала приблизительно 16-26 м<sup>2</sup>, предпочтительно приблизительно 20-22 м<sup>2</sup>, наиболее предпочтительно приблизительно 21 м<sup>2</sup>.

Фильтровальная мембрана, как описано в настоящей заявке, предпочтительно имеет средний размер пор, который меньше, чем рекомбинантный белок и/или меньше, чем указанные четвертичные структуры, и/или фильтровальная мембрана предпочтительно имеет отсечение по молекулярной массе в диапазоне от приблизительно 200 кДа до приблизительно 500 кДа, в особенности приблизительно 300 кДа.

Предпочтительно, фильтровальная мембрана состоит из или включает материал, выбранный из группы, включающей полиэфирсульфон, гидрат целлюлозы, регенерированную целлюлозу, стабилизированную целлюлозу, поперечно сшитую целлюлозу, поперечно сшитый гидрат целлюлозы, ацетат целлюлозы, полиамид, полиуретан, полипропилен, полисульфон, поликарбонат, нейлон, полиимид, и их комбинации,

и/или фильтровальная мембрана предпочтительно состоит из или включает полиэфирсульфон, или фильтровальная мембрана необязательно представляет собой мембрану на основе стабилизированной целлюлозы.

В соответствии с другим предпочтительным аспектом согласно настоящему изобретению, на стадии (б) и на стадии (в) используют одинаковую фильтрующую систему. Таким образом, в соответствии с этим предпочтительным аспектом, только одна фильтрующая система используется

для обеих стадий, а именно концентрирование стадии (б) и непрерывная диафильтрация стадии (в).

Предпочтительно, смесь, оставшаяся после стадии (в), включает концентрацию инактивирующего агента, которая составляет менее чем одна  
5 тысячная концентрации нейтрализующего агента, полученной на стадии (III).

Более того, в контексте настоящего изобретения, было обнаружено, что является особенно предпочтительным, когда

- стадию (III) осуществляют в первом контейнере, и где смесь, полученную при нейтрализации инактивирующего агента, переносят из  
10 первого контейнера во второй контейнер, соединенный с фильтрующей системой, и где после переноса смеси из первого во второй контейнер клапан между первым контейнером и вторым контейнером закрывают, и пустой первый контейнер заполняют второй жидкостью,

- на стадии (б) смесь циркулирует через второй контейнер и  
15 фильтрующую систему до завершения концентрирования, и

- на стадии (в) клапан между первым и вторым контейнером открывают и вторая жидкость непрерывно выходит из первого контейнера во второй контейнер, в то время как смесь циркулирует через фильтрующую систему и второй контейнер.

20 В дальнейшем аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способ, как описано и заявлено в настоящей заявке, где объем смеси, полученной на стадии (а), составляет от 1000 л до 10000 л, предпочтительно от 2000 л до 8000 л, и наиболее предпочтительно от 3000 л до 5000 л.

Как указано в настоящей заявке, подразумевается, что “объем смеси, полученной на стадии (а),” в особенности, эквивалентно “исходный объем смеси на стадии (б) перед указанным концентрированием”. В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способ, как описано и заявлено в  
25 настоящей заявке, где на стадии (б) указанный рекомбинантный белок и/или указанные четвертичные структуры в конечном итоге концентрированы по меньшей мере 5X, предпочтительно по меньшей мере 8X, более  
30 предпочтительно 9X - 11X, и наиболее предпочтительно приблизительно 10X, по сравнению с объемом смеси, полученной на стадии (а).

Стадию концентрирования (б) способов, обеспеченных в настоящей заявке, можно осуществлять таким образом, что рекомбинантный белок или указанные

четвертичные структуры концентрированы от 3X до 50X по сравнению с объемом смеси, полученной на стадии (а), или с объемом смеси, полученной на стадии (III), соответственно. Более предпочтительно, указанная стадия концентрирования может быть осуществлена таким образом, что

5 рекомбинантный белок или указанные четвертичные структуры концентрированы по меньшей мере 5X, например, от 5X до 20X по сравнению с объемом смеси, полученной на стадии (а), или с объемом смеси, полученной на стадии (III), соответственно. Еще более предпочтительно, указанная стадия концентрирования может быть осуществлена таким образом, что

10 рекомбинантный белок или указанные четвертичные структуры концентрированы по меньшей мере 8X, например, от 8X до 14X по сравнению с объемом смеси, полученной на стадии (а), или с объемом смеси, полученной на стадии (III), соответственно. Наиболее предпочтительно, указанную стадию концентрирования осуществляют таким образом, что рекомбинантный белок или

15 указанные четвертичные структуры концентрированы по меньшей мере 10X, например, от 10X до 12X по сравнению с объемом смеси, полученной на стадии (а), или с объемом смеси, полученной на стадии (III), соответственно.

Предпочтительно, на стадии (в) общий объем второй жидкости, добавляемый к объемному потоку, составляет по меньшей мере 5X,

20 предпочтительно по меньшей мере 7X, более предпочтительно по меньшей мере 9X, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 10X, объема раствора, полученного на стадии (б), и/или общий объем второй жидкости, добавляемый к объемному потоку, равен наиболее предпочтительно приблизительно объему смеси, полученной на стадии (а).

25 В дальнейшем аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способ, как описано и заявлено в настоящей заявке, где указанный способ дополнительно включает стадию

(г) смешивание смеси, оставшейся после стадии (в), с

30 дополнительным компонентом, выбранным из группы, включающей фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, разбавители, наполнители, и их комбинации, и где концентрация рекомбинантного белка и/или концентрация указанных четвертичных структур в растворе, полученном из указанного смешивания предпочтительно представляет собой приблизительно или ниже (например, 0,2X-0,5X) концентрации

рекомбинантного белка и/или указанных четвертичных структур в смеси, полученной на стадии (а).

Как указано в настоящей заявке, подразумевается, что “концентрации рекомбинантного белка и/или указанных четвертичных структур в смеси, полученной на стадии (а),” в особенности, эквивалентно “исходной концентрации рекомбинантного белка и/или указанных четвертичных структур в смеси на стадии (б) перед указанным концентрированием”.

Как используется в настоящей заявке, “фармацевтически приемлемый носитель” включает все и любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, стабилизирующие агенты, разбавители, консерванты, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты, агенты, замедляющие абсорбцию, и другие.

“Адьюванты”, как используется в настоящей заявке, могут включать гидроксид алюминия и фосфат алюминия, сапонины, например, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), эмульсию вода-в-масле, эмульсию масло-в-воде, эмульсию вода-в-масле-в-воде. Эмульсия может быть основана, в частности, на легком жидком парафиновом масле (типа Европейской Фармакопеи); изопреноидном масле, таком как сквалан или сквален; масле, полученном при олигомеризации алкенов, в особенности изобутена или децена; сложных эфиров кислот или спиртов, содержащих линейную алкильную группу, более предпочтительно, растительных масел, этилолеат, пропилен гликоль ди-(каприлат/капрат), глицерил три-(каприлат/капрат) или пропиленгликоль диолеат; сложные эфиры разветвленных жирных кислот или спиртов, в особенности сложные эфиры изостеариновой кислоты. Масло используется в комбинации с эмульсификаторами для образования эмульсии. Эмульсификаторы предпочтительно представляют собой неионные поверхностно-активные вещества, в особенности сложные эфиры сорбита, маннида (например, ангидроманнитол олеат), гликоля, полиглицерина, пропиленгликоля и олеиновой, изостеариновой, рицинолевой или гидроксистеариновой кислоты, которые необязательно этоксилированы, и блок-сополимеры полиоксипропилен-полиоксиэтилена, в особенности продукты Pluronic, в частности L121. См., Hunter и др., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (ред. Stewart-Tull, D. E. S.). JohnWiley и Sons, NY, сс. 51-94 (1995) и Todd и др., *Vaccine* 15:564-

570 (1997). Например, представляется возможным использовать SPT эмульсию, описанную на странице 147 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" под ред. М. Powell и М. Newman, Plenum Press, 1995, и эмульсию MF59, описанную на странице 183 данного источника. Дополнительно доступные

5 адъюванты включают, но не ограничиваясь только ими, систему адъювант RIBI (Ribi Inc.), блок со-полимер (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), монофосфорил липид А, Авридин липид-амин адъювант, стабильный при нагревании энтеротоксин из *E. coli* (рекомбинантный или другой), холерный токсин, IMS 1314 или мурамилдипептид и многие другие. Среди сополимеров

10 малеинового ангидрида и алкенильного производного, включены сополимеры ЕМА (Monsanto), которые представляют собой сополимеры малеинового ангидрида и этилена. Растворение этих полимеров в воде приводит к кислому раствору, который может быть нейтрализован, предпочтительно, до физиологического рН, для получения раствора адъюванта, в который будет

15 инкорпорирована иммуногенная, иммунологическая или сама вакцинная композиция.

Другим примером адъюванта является соединение, выбранное из полимеров акриловой или метакриловой кислоты и сополимеров малеинового ангидрида и алкенильного производного. Благоприятными адъювантными

20 соединениями являются полимеры акриловой или метакриловой кислоты, которые перекрестно сшиты, в частности, с полиалкенильными простыми эфирами сахаров или полиспиртов. Эти соединения известны под термином карбомер (Pharmеuгога том 8, № 2, июнь 1996). Квалифицированные специалисты в данной области техники также могут сослаться на патент US № 2,909,462 который

25 описывает такие акриловые полимеры, перекрестно сшитые с полигидроксильным соединением, имеющим по меньшей мере 3 гидроксильные группы, предпочтительно не более чем 8, атомы водорода по меньшей мере трех гидроксильных замены ненасыщенными алифатическими радикалами, имеющими по меньшей мере 2 атома углерода. Предпочтительными

30 радикалами являются те радикалы, которые содержат от 2 до 4 атомов углерода, например, винилы, аллиллы и другие этиленно ненасыщенные группы. Ненасыщенные радикалы сами могут содержать другие заместители, такие как метил. Продукты, продаваемые под названием Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, USA), являются особенно предпочтительными. Они являются перекрестно

сшитыми с аллил сахарозой или с аллил пентаэритролом. Среди этих соединений, могут быть упомянуты Carborol 974P, 934P и 971P. Наиболее предпочтительным является применение Carborol 971P.

5 “Разбавители” могут включать воду, солевой раствор, декстроза, этанол, глицерин и другие.

“Изотонические агенты” могут включать, в частности, хлорид натрия, декстроза, маннит, сорбит и лактозу.

“Стабилизаторы” включают альбумин и щелочные соли этилендиаминтетраоцтовой кислоты, в частности.

10 “Консервант”, как используется в настоящей заявке, относится к антимикробному активному агенту, такому как, например, гентамицин, мертиолат, и другие. В особенности добавление консерванта является наиболее предпочтительным для приготовления многодозовой композиции. Эти антимикробные активные агенты добавляют в концентрациях, которые  
15 эффективны для предотвращения любого микробиологического загрязнения композиции, представляющей интерес, или для ингибирования любого микробиологического роста в композиции, представляющей интерес.

Предпочтительно, на стадии (г) указанный дополнительный компонент представляет собой комбинацию адьюванта, воды и хлорида натрия, в  
20 особенности комбинацию раствора адьюванта и Ф-раствора, где указанный адьювант предпочтительно представляет собой полимер акриловой или метакриловой кислоты, и еще более предпочтительно карбомер.

Термин “Ф-раствор”, как указано в настоящей заявке, в особенности относится к буферному раствору, состоящему из 0,8-0,9% (мас./об.) NaCl, например, 0,85% (мас./об.) NaCl, растворенного в воде, и pH его доведен до 6,8-  
25 7,0.

В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способ, как описано и заявлено в настоящей заявке, где смесь, используемую для стадии (а), получают с помощью процедуры, включающей стадии

30 (1) разрешение инфицирования чувствительных клеток в культуре с вектором, включающим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный белок, где указанный рекомбинантный белок экспрессируется указанным вектором,

(2) после этого, восстановление рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, включающих множество указанного рекомбинантного белка, из клеточной культуры, где предпочтительно клеточный дебрис отделяют от рекомбинантного белка и/или указанных четвертичных структур с помощью стадии разделения, предпочтительно включая микрофльтрацию через по меньшей мере один фильтр, предпочтительно два фильтра, где по меньшей мере один фильтр предпочтительно имеет размер пор больше чем рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, содержащие множество указанного рекомбинантного белка, в особенности имеет размер пор от приблизительно 1 до приблизительно 20 мкм и/или от приблизительно 0,1 до приблизительно 4 мкм.

Предпочтительно, в указанном способе стадия разделения включает или состоит из:

- микрофльтрации через или несколько фильтров, имеющих размер пор от приблизительно 2 мкм до приблизительно 15 мкм, и/или
- микрофльтрации через или несколько фильтров, имеющих размер пор от приблизительно 0,8 мкм до приблизительно 1,0 мкм.

Предпочтительными являются те клетки, которые чувствительны к инфицированию с применением подходящего рекомбинантного вирусного вектора, содержащего ДНК рекомбинантного белка и экспрессирующего рекомбинантный белок. Предпочтительно клетки представляют собой клетки насекомых, и более предпочтительно, они включают клетки насекомых, продаваемые под торговым названием SF+ клетки насекомых (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT). Предпочтительные культуры клеток имеют подсчёт количества клеток в диапазоне приблизительно  $0,3 - 2,0 \times 10^6$  клеток/мл, более предпочтительно приблизительно  $0,35 - 1,9 \times 10^6$  клеток/мл, еще более предпочтительно приблизительно  $0,4 - 1,8 \times 10^6$  клеток/мл, еще более предпочтительно приблизительно  $0,45 - 1,7 \times 10^6$  клеток/мл, и наиболее предпочтительно приблизительно  $0,5 - 1,5 \times 10^6$  клеток/мл.

Вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный белок имеет предпочтительную множественность заражения (MOI) в диапазоне приблизительно 0,03 - 1,5, более предпочтительно от приблизительно 0,05 - 1,3, еще более предпочтительно от

приблизительно 0,09 - 1,1, и наиболее предпочтительно от приблизительно 0,1 - 1,0, при применении для инфицирования чувствительных клеток. Предпочтительно MOI, указанное выше, относится к одному мл клеточной культуральной жидкости. Предпочтительно, способ, описанный в настоящей заявке, включает инфицирование 0,35 -  $1,9 \times 10^6$  клеток/мл, еще более предпочтительно приблизительно 0,4 -  $1,8 \times 10^6$  клеток/мл, еще более предпочтительно приблизительно 0,45 -  $1,7 \times 10^6$  клеток/мл, и наиболее предпочтительно приблизительно 0,5 -  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл с рекомбинантным вирусным вектором, содержащим рекомбинантный белок ДНК и экспрессирующим рекомбинантный белок, имеющий MOI (множественность заражения) в диапазоне приблизительно 0,03 - 1,5, более предпочтительно от приблизительно 0,05 - 1,3, еще более предпочтительно от приблизительно 0,09 - 1,1, и наиболее предпочтительно от приблизительно 0,1 - 1,0.

Подходящая ростовая среда может также быть определена квалифицированными специалистами в данной области техники, где предпочтительная ростовая среда представляет собой бессывороточную среду клеток насекомых, такую как Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) и другие.

В указанном способе является предпочтительным, что клеточную культуру на стадии (1) поддерживают при 22 - 32°C, более предпочтительно приблизительно при 24 - 30°C, еще более предпочтительно приблизительно при 25 - 29°C, еще более предпочтительно от приблизительно 26 - 28°C, и наиболее предпочтительно при 27°C, предпочтительно при этом рекомбинантный белок экспрессируется указанным вектором, и/или что восстановление на стадии (2) происходит в течение 5 - 8 дней, наиболее предпочтительно 8 дней, после инокуляции клеток с вектором и/или если жизнеспособность клеток снижается на менее чем 10%.

В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способ, как описано и заявлено в настоящей заявке, где указанный рекомбинантный белок выбирают из группы, включающей:

- рекомбинантный PCV2 ORF2 белок, предпочтительно включающий или состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере

93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,5%, или 100% идентичность последовательностей с последовательностью из SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

Термин “имеющий 100% идентичность последовательностей”, как используется в настоящей заявке, понимается как эквивалентный термину “является идентичным”.

Процент идентичности последовательностей имеет принятое в данной области значение и существует много способов для определения идентичности между двумя полипептидными или полинуклеотидными последовательностями. См., например, Lesk, ред., *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, ред., *Biocomputing: Informatics And Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, ред., *Computer Analysis Of Sequence Data, Part I*, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, *Sequence Analysis In Molecular Biology*, Academic Press, (1987); и Gribskov & Devereux, ред., *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, New York, (1991). Способы выравнивания полинуклеотидов или полипептидов закодированы в компьютерные программы, включая пакет программного обеспечения GCG (Devereux и др., *Nuc. Acids Res.* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul и др., *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990)), и программу Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711), в которой использован алгоритм локальной гомологии Smith и Waterman (*Adv. App. Math.*, 2:482-489 (1981)). Например, можно использовать компьютерную программу ALIGN, в которой применяется FASTA, с поиском аффинного гэпа со штрафом за открытие гэпа  $-12$  и штрафом за продление гэпа  $-2$ . Для целей настоящего изобретения, белковые/аминокислотные последовательности выравнивают, используя метод Clustal W в программном обеспечении MegAlign версия 1.1.0 (59), 419 от DNASTAR Inc., используя параметры множественного выравнивая по умолчанию, установленные в программе (Gonnet серии матрицы сравнения аминокислот со штрафом за гэп  $=10,0$ , штрафом за длину гэпа  $=0,2$ , и отсрочкой различающихся последовательностей (%)  $= 30\%$ ).

Как используется в настоящей заявке, подразумевается, в частности, что термин “идентичность последовательности с последовательностью из SEQ ID NO:X” является эквивалентным термину “идентичность последовательности с последовательностью из SEQ ID NO:X по длине SEQ ID NO: X” или термину “идентичность последовательности с последовательностью из SEQ ID NO:X по всей длине SEQ ID NO: X”, соответственно. В этом контексте, “X” представляет собой любое целое число, выбранное из 1 – 2, таким образом что “SEQ ID NO: X” представляет собой любую из SEQ ID NO, указанных в настоящей заявке.

Также подразумевается, что термин “рекомбинантный белок, состоящий из последовательности” в особенности также обеспечивает любую сопряженную с трансляцией и/или посттрансляционную модификацию или модификации последовательностей, вызванные клеткой, в которой экспрессируется полипептид. Следовательно, термин “рекомбинантный белок, состоящий из последовательности”, как описано в настоящей заявке, также относится к последовательности, имеющей одну или больше модификаций, обусловленные клеткой, в которой экспрессируется полипептид, в особенности модификаций аминокислотных остатков, задействованных в биосинтез белка и/или процессинг белка, предпочтительно выбранные из группы, включающей гликозилирования, фосфорилирования и ацетилирования.

В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способ, как описано и заявлено в настоящей заявке, где указанные четвертичные структуры, включающие множество указанного рекомбинантного белка, представляют собой вирусоподобные частицы, содержащие множество рекомбинантного PCV2 ORF2 белка.

В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способ, как описано и заявлено в настоящей заявке, где вирулицидная активность смеси, полученной в результате осуществления указанного способа, уменьшена на по меньшей мере 20% по сравнению со смесью, которая не подвергалась концентрированию на стадии (б) и непрерывной диафильтрации на стадии (в) указанного способа, и/или где иммуногенная композиция, полученная с помощью указанного способа, вызывает потерю менее чем 1 log TCID<sub>50</sub> на мл живого вируса, когда живой вирус смешан с иммуногенной композицией в течение четырех или больше часов, в особенности при комнатной температуре. “Комнатная температура”, как указано в настоящей заявке, в особенности

относится к 20 - 25 градусам Цельсия, и более предпочтительно (в среднем) 23°C.

В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способ, как описано и заявлено в настоящей заявке, где живой вирус представляет собой вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способ, как описано и заявлено в настоящей заявке, где способ дополнительно включает стадию комбинирования смеси, оставшейся после стадии (в) и/или стадии (г), с по меньшей мере одним дополнительным антигеном, где по меньшей мере один дополнительный антиген представляет собой предпочтительно вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS). В контексте настоящего изобретения подразумевается, в частности, что термин “оставшаяся после стадии” эквивалентно “полученная на стадии”.

Настоящее изобретение не только обеспечивает способ получения иммуногенной композиции, а также относится к иммуногенной композиции, получаемой с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке.

В другом аспекте, настоящее изобретение также охватывает иммуногенную композицию, получаемую с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке.

В соответствии с особенно предпочтительным аспектом, указанная иммуногенная композиция представляет собой раствор, включающий 1-10 мкМ L-Аргинина и/или 1-10 мкМ L-Лизина, и наиболее предпочтительно указанная иммуногенная композиция представляет собой раствор, включающий 1-10 мкМ L-Аргинина и 1-10 мкМ L-Лизина.

Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает иммуногенную композицию, включающую

- рекомбинантный PCV2 ORF2 белок, предпочтительно состоящий из или включающий последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,5%, или 100% идентичность последовательностей с последовательностью из SEQ ID NO:1 и/или SEQ ID NO:2, и

- 1-10 мкМ L-Аргинина и/или 1-10 мкМ L-Лизина,

и где необязательно иммуногенная композиция по существу не содержит нейтрализованного инактивирующего агента и/или по существу не содержит нейтрализующего агента.

5           Подразумевается, что “1-10 мкМ”, как используется в настоящей заявке, в особенности, эквивалентно “от 1 мкМ вплоть до 10 мкМ”.

В особенности, иммуногенная композиция или смесь, полученная на стадии (г), включает 4-400 мкг рекомбинантного PCV2 ORF2 на мл или предпочтительно 8-200 мкг рекомбинантного PCV2 ORF2 белка на мл.

10           “По существу не содержит нейтрализующего агента”, в особенности подразумевает, что иммуногенная композиция включает менее чем 150 нМ нейтрализующего агента. Следовательно, например, указание, что “иммуногенная композиция по существу не содержит тиосульфата натрия”, в особенности, понимается, как эквивалентно указанию, что “иммуногенная  
15 композиция включает менее чем 150 нМ тиосульфата натрия”.

В соответствии с дальнейшим аспектом, настоящее изобретение также охватывает иммуногенную композицию, получаемую с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, где иммуногенная композиция или смесь, полученная на стадии (г), по существу не содержит тиосульфата натрия  
20 или включает менее чем 150 нМ тиосульфата натрия.

Кроме того, обеспечивается иммуногенная композиция, в особенности иммуногенная композиция, получаемая с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, предпочтительно получаемая с помощью любого такого способа, включающего стадию (г), где иммуногенная композиция  
25 включает

рекомбинантный PCV2 ORF2 белок, предпочтительно включающий или состоящей из последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,5%, или 100% идентичность последовательностей с последовательностью из  
30 SEQ ID NO:1 и/или SEQ ID NO:2, и

0,1-1 мкМ L-Триптофана; и/или

0,1-3 мкМ L-Глутамина; и/или

0,2-4 мкМ L-Метионина; и/или  
 1-10 мкМ L-Аргинина; и/или  
 1-10 мкМ L-Треонина; и/или  
 1-15 мкМ L-Лизина.

5 Предпочтительно, иммуногенная композиция, как описано и заявлено в настоящей заявке, включает

0,1-0,7 мкМ L- Триптофан; и/или  
 0,7-2,4 мкМ L-Глутамина; и/или  
 0,5-3,2 мкМ L-Метионина; и/или  
 1,4-4,7 мкМ L-Аргинина; и/или  
 1,6-8,0 мкМ L-Треонина; и/или  
 4,0-12,2 мкМ L-Лизина.

10

Более предпочтительно, иммуногенная композиция, как описано и заявлено в настоящей заявке, включает

0,2-0,6 мкМ L-Триптофана; и/или  
 0,8-2,2 мкМ L-Глутамина; и/или  
 0,8-2,2 мкМ L-Метионина; и/или  
 1,6-4,3 мкМ L-Аргинина; и/или  
 2,4-6,3 мкМ L-Треонина; и/или  
 4,4-11,2 мкМ L-Лизина.

15

20

В соответствии с особенно предпочтительным аспектом, иммуногенная композиция, как описано и заявлено в настоящей заявке, включает 0,7-2,4 мкМ L-Глутамина и 4,0-12,2 мкМ L-Лизина, или предпочтительно включает 0,8-2,2 мкМ L-Глутамина и 4,4-11,2 мкМ L-Лизина.

25 Предпочтительно, иммуногенная композиция, как описано и заявлено в настоящей заявке, по существу не содержит тиосульфата натрия.

В соответствии с дальнейшим предпочтительным аспектом, обеспечивается иммуногенная композиция, в особенности иммуногенная композиция, получаемая с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, предпочтительно  
 30 получаемая с помощью любого такого способа, включающего стадию (г), где иммуногенная композиция, когда подвергается двухмерной (2 D) сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ) при комнатной температуре, проявляет соотношение площади пика А к площади пика В 0,2-0,4

и/или соотношение площади пика С к площади пика В 0,5-0,9, где 2 D СВЭЖХ включает

хроматографию в первом измерении с объёмом системы 400 мкл, где

- образец, включающий иммуногенную композицию, инъецируют в анионообменную колонну с объёмом колонки 0,1 мл, упакованную с четвертичным амино-функционализированным материалом, подходящим для связывания вирусоподобных частиц, и

- способ многостадийного градиента изначально 100% 50 мМ Трис, pH 8 на отрезке времени 0 минут до 97,5% 50 мМ Трис, pH 8 и 2,5% 50 мМ Трис, 2 М NaCl, pH 8 на отрезке времени 1 минута и в завершение до 10% 50 мМ Трис, pH 8 и 90% 50 мМ Трис, 2М NaCl, pH 8 на отрезке времени 2 минуты осуществляли со скоростью потока 0,6 мл/мин через анионообменную колонку,

и где при времени удерживания 2,67 мин переключали с хроматографии в первом измерении на

хроматографию во втором измерении, где 50 мкл элюата хроматографии в первом измерении осуществляли со скоростью потока 0,3 мл/мин через эксклюзионную колонку с объёмом колонки 1,75 мл с размерами пор 450 Å,

и где хроматограмму записывали путем мониторинга испускания флуоресценции при длине волны 330 нм и длине волны возбуждения 280 нм, и где

площадь пика А представляет собой площадь пика наивысшего пика при времени удерживания 0-1 минут на хроматограмме;

площадь пика В представляет собой площадь пика наивысшего пика при времени удерживания 7-8 минут на хроматограмме;

площадь пика С представляет собой площадь пика наивысшего пика при времени удерживания 8,5-9,5 минут на хроматограмме.

В соответствии с одним предпочтительным аспектом, указанный образец включает иммуногенную композицию, разведенную в 50 мМ Трис, pH 8. Например, в том случае, где указанный образец включает иммуногенную композицию, оставшуюся после стадии (в), то образец предпочтительно включает или состоит из иммуногенной композиции, разведенной 1:10 в 50 мМ Трис, pH 8.

Четвертичный аминок-функционализированный материал, подходящий для связывания вирусоподобных частиц, предпочтительно представляет собой материал с большими порами и/или непористый материал.

В Примере 5 описан такой метод 2 D СВЭЖХ, который можно использовать квалифицированному специалисту в данной области техники. В случае спорных результатов и при любом сомнении, соотношение площадей пиков, как указано в настоящей заявке, относится к тем, которые оценены /могут быть оценены способом, как описано в Примере 5.

Термин “иммуногенная композиция” обозначает, но не ограничиваясь только ими, заявленную композицию, которая включает по меньшей мере один антиген, который вызывает клеточный и/или опосредованный антителом иммунный ответ в хозяине на представляющий интерес антиген. Обычно, “иммунный ответ” включает, но не ограничиваясь только ими, один или несколько следующих эффектов: продукцию или активацию антител, В-клеток, клеток Т-хелперов и клеток Т-супрессоров, и/или цитотоксических Т-клеток и/или гамма-дельта Т клеток, нацеленных специфически на антиген или антигены, включенные в композицию или вакцину, представляющую интерес. Предпочтительно, хозяин будет проявлять либо терапевтический или защитный иммунный ответ таким образом, что резистентность к новой инфекции будет усиливаться и/или клиническая тяжесть заболевания уменьшаться. В таком случае иммуногенная композиция представляет собой “вакцину”. Такая защита будет продемонстрирована либо путем уменьшения или отсутствия симптомов, которые в норме проявляются у инфицированного хозяина, более быстрое время восстановления и/или более низкий вирусный титр у инфицированного хозяина. Хозяин, как описано в настоящей заявке, в особенности представляет собой млекопитающего, предпочтительно свинью.

В дальнейшем аспекте, вирулицидная активность иммуногенной композиции, полученной с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, уменьшена на по меньшей мере 10%, предпочтительно на по меньшей мере 20%, по сравнению с соответствующей иммуногенной композицией, которая не подвергалась концентрированию на стадии (б) и непрерывной диафильтрации на стадии (в) указанного способа. Более предпочтительно, вирулицидная активность иммуногенной композиции уменьшена на по меньшей мере 50% по сравнению с соответствующей

иммуногенной композицией, которая не подвергалась концентрированию на стадии (б) и непрерывной диафильтрации на стадии (в). Еще более предпочтительно, вирулицидная активность иммуногенной композиции уменьшена на по меньшей мере 70% по сравнению с соответствующей иммуногенной композицией, которая не подвергалась концентрированию на стадии (б) и непрерывной диафильтрации на стадии (в). Даже еще более предпочтительно, вирулицидная активность иммуногенной композиции уменьшена на по меньшей мере 90% по сравнению с соответствующей иммуногенной композицией, которая не подвергалась концентрированию на стадии (б) и непрерывной диафильтрации на стадии (в).

Для целей настоящего изобретения, термин “вирулицидная активность” обозначает, что жидкость, текучая среда, раствор, композиция или подобные инактивирует или убивает живые вирусы или живые бактерии до определенной степени, когда указанную жидкость, текучую среду, раствор, композицию или подобные смешивают с такими живыми вирусами или живой бактерией. Таким образом, уменьшение вирулицидной активности жидкости, текучей среды, раствора, композиции или подобных по меньшей мере на 10% обозначает, что коэффициент выживания живых вирусов или живых бактерий является на 90% более высоким в жидкости, текучей среде, растворе, композиции или подобных, которая подвергалась любому из способов получения, описанных в настоящей заявке, по сравнению с жидкостью, текучей средой, раствором, композицией или подобным, которые не подвергались любому из таких способов получения. В контексте настоящей заявки “коэффициент выживания” относится, в частности, к процентному значению вирусов или бактерий, поддерживающих способность реплицироваться в хозяине.

В соответствии с особенно предпочтительным аспектом, иммуногенная композиция, получаемая с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, вызывает потерю менее чем 1 log TCID<sub>50</sub> живого вируса или менее чем 1 log КОЕ на мл живой бактерии, где живой вирус или живую бактерию смешивали с указанной иммуногенной композицией и инкубировали по меньшей мере в течение 4 часов. Более предпочтительно, иммуногенная композиция, получаемая с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, вызывает потерю менее чем 0,9 log TCID<sub>50</sub> на мл живого вируса или менее чем 0,9 log КОЕ на мл живой бактерии, где живой вирус или

живую бактерию смешивали и инкубировали с указанной иммуногенной композицией по меньшей мере в течение 4 часов. Еще более предпочтительно, иммуногенная композиция, получаемая с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, вызывает потерю менее чем  $0,7 \log \text{TCID}_{50}$  на мл живого вируса или менее чем  $0,7 \log \text{КОЕ}$  на мл живой бактерии, где живой вирус или живую бактерию смешивали и инкубировали с указанной иммуногенной композицией по меньшей мере в течение 4 часов. Еще более предпочтительно, иммуногенная композиция, получаемая с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, вызывает потерю менее чем  $0,5 \log \text{TCID}_{50}$  на мл живого вируса или менее чем  $0,5 \log \text{КОЕ}$  на мл живой бактерии, где живой вирус или живую бактерию смешивали и инкубировали с указанной иммуногенной композицией по меньшей мере в течение 4 часов. Еще более предпочтительно, иммуногенная композиция, получаемая с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, вызывает потерю менее чем  $0,3 \log \text{TCID}_{50}$  на мл живого вируса или менее чем  $0,3 \log \text{КОЕ}$  на мл живой бактерии, где живой вирус или живую бактерию смешивали и инкубировали с указанной иммуногенной композицией по меньшей мере в течение 4 часов.

$\text{TCID}_{50}$  на мл может быть определено с помощью анализа стандартного титрования в условиях *in vitro*, который предоставляет возможность оценки количества живого вируса.  $\text{КОЕ}$  на мл также может быть определено с помощью анализа стандартного титрования в условиях *in vitro*, который предоставляет возможность оценки количества живой бактерии. Термин “на мл” предпочтительно относится к 1 мл жидкости.

Более того, было обнаружено, что иммуногенная композиция, получаемая с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, является особенно стабильной.

В соответствии с особенно предпочтительным аспектом, срок годности при хранении иммуногенной композиции, получаемой с помощью способа, как описано и заявлено в настоящей заявке, составляет по меньшей мере 2 года, предпочтительно по меньшей мере 3 года, где термин "срок годности при хранении", как используется в настоящей заявке, обозначает период, в течение которого продукт может храниться без снижения качества ниже определенного минимально приемлемого уровня.

В особенности, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, где иммуногенная композиция индуцирует, предпочтительно у свиньи, защитный иммунный ответ на патоген, из которого имеет происхождение аминокислотная последовательность рекомбинантного белка, где патоген предпочтительно представляет собой PCV2, после введения одной дозы иммуногенной композиции, и где указанное введение предпочтительно представляет собой введение одной дозы иммуногенной композиции свинье.

В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, как описано и заявлено в настоящей заявке, где иммуногенная композиция дополнительно включает аттенуированный живой вирус, предпочтительно аттенуированный вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS), или аттенуированную живую бактерию.

“Живой” вирус или бактерия, для целей настоящего изобретения, относится к вирусу или бактерии, который (ая) способен (а) реплицироваться в хозяине. Предпочтительный живой вирус и предпочтительная живая бактерия согласно настоящему изобретению представляют собой PRRS вирус (PRRSV) и бактерию *Mycoplasma hyopneumonia*, соответственно. Тем не менее, термин живой вирус или живая бактерия не ограничиваются PRRSV и *Mycoplasma hyopneumoniae*, соответственно.

В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, как описано и заявлено в настоящей заявке, где иммуногенная композиция дополнительно включает аттенуированный вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

Термин “аттенуированный” в особенности относится к вирусам или бактериям, которые были культивированы таким образом, чтобы уменьшить их вирулентность и сделать их пригодными для применения в качестве вакцин. Таким образом, более предпочтительно “аттенуированный” относится к вирусу или бактерии, которые являются живыми, но, предпочтительно, вследствие уменьшенной вирулентности или токсичности с помощью такого специального культивирования, больше не способны продуцировать заболевание.

Предпочтительно, указанная иммуногенная композиция индуцирует, в особенности у свиньи, защитный иммунный ответ на PRRS вирус после введения одной дозы иммуногенной композиции, и где указанное введение

предпочтительно представляет собой введение одной дозы иммуногенной композиции свинье.

5 Более предпочтительно, указанная иммуногенная композиция индуцирует, в особенности у свиньи, защитный иммунный ответ на PCV2 и PRRS вирус после введения одной дозы иммуногенной композиции, и где указанное введение предпочтительно представляет собой введение одной дозы иммуногенной композиции свинье.

10 В другом аспекте, настоящее изобретение также обеспечивает набор, где набор включает контейнер, содержащий иммуногенную композицию, как описано и заявлено в настоящей заявке, и где набор предпочтительно дополнительно включает по меньшей мере один дополнительный контейнер, содержащий по меньшей мере один дополнительный антиген, выбранный из группы, включающей аттенуированный живой вирус, предпочтительно аттенуированный PRRS вирус, и аттенуированную живую бактерию.

15 В соответствии с дальнейшим аспектом, обеспечивается набор, включающий контейнер, содержащий иммуногенную композицию, как описано и заявлено в настоящей заявке.

20 Иммуногенная композиция, как описано и заявлено в настоящей заявке, и/или набор, как описано и заявлено в настоящей заявке, может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный антиген, предпочтительно вирусный или бактериальный антиген, и еще более предпочтительно вирусный или бактериальный антиген из по меньшей мере одного другого патогена, вызывающего заболевание у свиней. Дополнительный антиген может представлять собой любой из антигенов, которые описаны в международной патентной заявке WO2007/094893 (содержание и сведения которых таким образом включены в качестве ссылки). Вкратце, дополнительные антигены могут представлять собой антигены любого другого патогена, вызывающего заболевание у свиней. Предпочтительно, “любой другой патоген, вызывающий заболевание у свиней” или по меньшей мере один другой патоген, вызывающий 25 заболевание у свиней выбирают из группы, включающей: *Actinobacillus pleuropneumonia* (1); Аденовирус (2); Альфавирус, такой как вирусы восточного лошадиного энцефаломиелита (3); *Bordetella bronchiseptica* (4); *Brachyspira spp.* (5), предпочтительно *B. hyodysenteriae* (6); *B. piosicoli* (7), *Brucella suis*, предпочтительно биовары 1, 2, и 3 (8); вирус классической чумы свиней (9);

*Clostridium spp.* (10), предпочтительно *Cl. difficile* (11), *Cl. perfringens* типы А, В, и С (12), *Cl. novyi* (13), *Cl. septicum* (14), *Cl. tetani* (15); Коронавирус (16), предпочтительно свиной респираторный коронавирус (17); *Eperythrozoonosis suis* (18); *Erysipelothrix rhusiopathiae* (19) *Escherichia coli* (20); *Haemophilus parasuis*, предпочтительно субтипы 1, 7 и 14 (21) вирус гемагглютинирующего энцефаломиелита (22); вирус японского энцефалита (23); *Lawsonia intracellularis* (24) *Leptospira spp.* (25), предпочтительно *Leptospira australis* (26); *Leptospira canicola* (27); *Leptospira grippotyphosa* (28); *Leptospira icterohaemorrhagicae* (29); и *Leptospira interrogans* (30); *Leptospira pomona* (31); *Leptospira tarassovi* (32); *Mycobacterium spp.* (33) предпочтительно *M. avium* (34), *M. intracellulare* (35) и *M. bovis* (36); *Mycoplasma hyopneumoniae* (37); *Pasteurella multocida* (38); свиной цитомегаловирус (39); свиной парвовирус (40); вирус репродуктивно-респираторного синдрома у свиней (41); вирус псевдобешенства (42); ротавирус (43); *Salmonella spp.* (44), предпочтительно *S. typhimurium* (45) и *S. choleraesuis* (46); *Staph. hyicus* (47); *Staphylococcus spp.* (48) предпочтительно *Streptococcus spp.* (49), предпочтительно *Strep. suis* (50); вирус герпеса свиней (51); вирус свиного гриппа (52); поксвирус свиней (53); поксвирус свиней (54); вирус везикулярного стоматита (55); Вирус везикулярной экзантемы свиней (56); *Leptospira Hardjo* (57); *Mycoplasma hyosynoviae* (58); и/или их комбинации.

Наиболее предпочтительно, иммуногенная композиция, как описано и заявлено в настоящей заявке, и/или набор, как описано и заявлено в настоящей заявке, дополнительно включает один или больше аттенуированных или инактивированных не-PRRSV патогенов или их антигенного материала.

В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, как описано и заявлено в настоящей заявке, и/или набор, как описано и заявлено в настоящей заявке, для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве вакцины.

В дальнейшем аспекте, настоящее изобретение обеспечивает иммуногенную композицию, как описано и заявлено в настоящей заявке, и/или набор, как описано и заявлено в настоящей заявке, для применения в способе

- индуцирования защитного иммунного ответа на по меньшей мере один патоген и/или

- уменьшения одного или нескольких клинических симптомов инфицирования по меньшей мере одним патогеном

у животного, предпочтительно у свиньи.

Настоящее изобретение в дальнейшем обеспечивает способ

- индуцирования защитного иммунного ответа на по меньшей мере один патоген и/или

5           - уменьшения одного или нескольких клинических симптомов инфицирования по меньшей мере одним патогеном

у животного, где иммуногенная композиция, как описано и заявлено в настоящей заявке, вводили животному, в особенности свинье.

10           В соответствии с еще дальнейшим аспектом, настоящее изобретение относится к применению иммуногенной композиции, как описано и заявлено в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для

- индуцирования защитного иммунного ответа на по меньшей мере один патоген и/или

15           - уменьшения одного или нескольких клинических симптомов инфицирования по меньшей мере одним патогеном

у животного, предпочтительно у свиньи.

Предпочтительно, по меньшей мере один патоген выбирают из группы, включающей PCV2, PRRSV, не-PRRSV патогены, и их комбинации.

20           Термин “не-PRRSV патогены”, как используется в настоящей заявке, в особенности относится к патогенам, выбранным из группы, включающей *Mycoplasma hyopneumoniae*, вирус псевдобешенства, вирус свиного гриппа, свиной парвовирус, вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* и *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

25           Термин “уменьшение одного или нескольких клинических симптомов”, как используется в настоящей заявке, в особенности будет обозначать, что любой из таких симптомов уменьшены по частоте или тяжести у животных, получающих введение иммуногенной композиции по сравнению с “контрольной группой”  
30           животных, которые обе были инфицированы или заражены патогеном, из которого име(ют) происхождение иммунологический (е) активный (е) компонент (ы) в иммуногенной композиции и где контрольная группа не получала введения иммуногенной композиции. В этом контексте, термин “уменьшено” обозначает уменьшение по меньшей мере на 10%, предпочтительно

25%, еще более предпочтительно 50%, наиболее предпочтительно 100% в группе, получавшей иммуногенную композицию по сравнению с контрольной группой.

5 Как используется в настоящей заявке, “клинические признаки” будет относиться к признакам инфицирования от патогенов, которые непосредственно наблюдаются у живого животного, такие как симптомы. Типичные примеры будут зависеть от выбранного патогена, но могут включать такие признаки, как выделения из носа, летаргию, кашель, повышенную температуру, уменьшенный прирост веса или потерю веса, дегидратацию, диарею, отечность, прихрамывание и другие.

10 Как используется в настоящей заявке, “защитный иммунный ответ” относится к уменьшенной частоте или уменьшенной тяжести клинических, патологических или гистопатологических признаков или симптомов инфицирования от представляющего интерес патогена вплоть до и включая полное предотвращение таких признаков или симптомов.

### ПРИМЕРЫ

#### ПРИМЕР 1:

##### Продукция PCV2 ORF2 белка – Процессинг накопления

20 PCV2 ORF2 белок продуцируется в инфицированных бакуловирусом SF+ клетках в процессе, соответствующему процессу, описанному в WO 2006/072065 A2, Примеры 1 - 3. Далее, кратко описан этот процесс:

25 PCV2 ORF2 бакуловирус-вектор продуцируют в биореакторах. Среду в биореактор добавляют предварительно стерилизованную или стерилизованную фильтрацией. Среду добавляют с SF+ клетками, имеющими происхождение из распространяющихся культур. Клетки одновременно инокулировали (конкурентное инфицирование) при высевании с PCV2 ORF2 затравкой. При размножении вируса, температура поддерживают при  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  и наблюдают за значением pH. Растворенный кислород (DO) контролируют путем барботирования очищенного сжатого воздуха и кислорода ( $\text{O}_2$ ). Окно сбора происходит в диапазоне 6 - 8 дней после инфицирования вирусом и достигают критерия сбора  $\leq 20\%$  жизнеспособных клеток. При сборе, PCV2 ORF2 антигенные жидкости осветляли, используя два набора фильтров, предварительный фильтр с размерами пор 2,0-15,0 мкм и конечный фильтр с размерами пор 0,8-1,0 мкм. Отфильтрованные собранные жидкости собирали в

### Лабораторный масштаб

Концентрирование и непрерывную диафильтрацию осуществляли в Biosafety Cabinet, или BSC, при комнатной температуре ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ), используя систему фильтрования тангенциальным потоком (TFF), состоящую из следующих компонентов: TFF System Sartoflow Slice 200 Benchtop система, собранная с 1 Sartoslice Ультрафильтр (UF) Кассетный фильтр (PES,  $200\text{ см}^2$  площадь фильтрации, отсечение 300 кДа).

30       Продукт концентрировали путем ультрафильтрации в 10 раз исходного объема антигена на основе объема. Скорость потока через фильтр изменяли в процессе осуществления концентрирования антигена. На мелкосерийном уровне, скорость потока представляла собой диапазон и находилась под контролем обратного фильтрационного давления в системе. Диафильтрацию осуществляли

с 10-ти кратным объемом ультрафильтрационного объема против  $\Phi$ -раствора, где  $\Phi$ -раствор добавляли со скоростью, равной потоку фильтрата. Конечный концентрированный и диафильтрованный антиген хранили при 2-8°C.

Используя метод ВЭЖХ количественного анализа, было установлено, что этот процесс удалял  $\geq 99\%$  любой оставшейся клеточной среды насекомых (ExCell 420 среды), и было уменьшено количество нейтрализованного BEI и оставшегося тиосульфата натрия до необнаруживаемых уровней.

Также, в начальных экспериментах было показано, что в контексте получения иммуногенной композиции, как описано в настоящей заявке, применение плоских слоистых фильтров, по сравнению с полуволоконными фильтрами, для TFF системы имеет благоприятный эффект, поскольку стоимость хранения будет существенно уменьшена, поскольку нужно использовать меньше мешков/бочек для хранения (200 л). Дополнительно, также наблюдалось, что при использовании плоских слоистых фильтров количество занятого персонала значительно уменьшалось, также как и время получения.

#### Рабочий масштаб

Для процессинга в рабочем или промышленном масштабе (ср. Фиг. 1), использовали приблизительно 4000 л продукта, полученного с помощью вышеописанной технологии производства и выделения целевого продукта. Систему создавали таким образом, что раствор, содержащий антиген, в инактивационном баке может быть непосредственно отправлен в бак нижерасположенного получения (DSP) при непрерывной скорости подачи до опорожнения инактивационного бака.

DSP бак является хранилищем для обрабатываемого антигена и презентации конечного антигена. Запрограммированный вес этого бака контролируется всей системой таким образом, что при достижении определенного запрограммированного веса, процесс будет осуществляться вперед. Дополнительно, этот бак представляет собой бак, где собирают конечный антигенный продукт и убирают в бочки для хранения объемом 200 л.

DSP бак соединен с микрофильтрационной единицей (MF). После отправления раствора, содержащего антиген, из DSP бака в MF единицу, антиген концентрируют и концентрат снова отправляют в DSP бак, в то время как фильтрат перемещают в отходы.

Процесс начитают путем определения веса инактивационного бака, содержащего (промежуточный), полученный в результате осуществления процессинга накопления. Рассчитывают 10-ти кратную концентрацию на основе исходного веса бака и программируют в операционную единицу системы для MF

5 единицы. После начала концентрирования, система запускает транспортные линии между инактивационным баком и DSP баком, открывая или закрывая их на основе веса бака. В момент, когда инактивационный бак становится пустым, система запускает бак для закрытия транспортной линии в DSP бак. После опустошения инактивационного бака, отдельная транспортная линия

10 активируется для добавления физиологического раствора в недавно откачанный инактивационный бак. Вес физиологического раствора также мониторят, поскольку желательное количество физиологического раствора для переноса в DSP бак представляет собой исходный вес, рассчитанный и используемый для расчета концентрации. Концентрат заполняют обратно в DSP бак и

15 дополнительно пропускают через MF единицу снова, таким образом дополнительно концентрируют концентрат, до тех пор, пока вес концентрата не снижается до запрограммированного значения, указывающего на желательную концентрацию.

MF единица является уникальной, поскольку она может нести как

20 микрофильтровальные кассеты, так и ультрафильтровальные кассеты. Для этой процедуры, всего 6 ультрафильтровальных sartocubes (при 21 м<sup>2</sup> на куб) запечатывали в MF единицу. Эту площадь поверхности выбирали после тщательных оценок системы. Существует питающая линия в MF единицу из DSP бака, линия, подающая концентрат, обратно в DSP бак и транспортная

25 линия фильтрат-в-отходы. Эта единица запрограммирована для прогона с давлением фильтрата 0 фунт на квадратный дюйм, при этом поддерживая рециркуляцию 20-35 фунтов на квадратный дюйм с целевым трансмембранным давлением 29 фунтов на квадратный дюйм (TMP). Рециркуляционный насос прогоняет при 100% способности до активации режима удерживания. Эти

30 параметры являются целевыми во время процессов концентрирования и диафильтрации. MF единица активируется для начала стадии концентрирования, как только DSP бак имеет установленный вес и будет поддерживать циркуляцию антигена до достижения 10-ти кратной концентрации. Как только достигается 10-ти кратная концентрация, то MF единица переключается в режим удержания

для циркуляции антигена при пониженном давлении и ускоряется, как только инактивационный бак заполняется Ф-раствором. После того, как Ф-раствор достигает желательного объема в инактивационном баке, который представляет собой исходный вес в начале, система будет инициировать процесс

5 диафильтрации путем начала поступления Ф-раствора в DSP бак и MF единица будет восстанавливаться вплоть до целевых диапазонов.

Как только инактивационный бак становится пустым, клапан между инактивационным баком и DSP баком закрывается и антиген дополнительно процессируется через MF единицу до достижения 10-ти кратной диафильтрации.

10 Концентрированный и диафильтрованный антиген находится в DSP баке и закачивается в бочки для сбора антигена для конечного хранения. Эти бочки хранят при  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  до приготовления вакцины.

Затем продукт, полученный в результате вышеописанного процессинга накопления и нижерасположенного получения, а завершение смешивают с

15 раствором карбомера (адьювант) и физиологическим солевым раствором (Ф-раствор). Этот исследуемый ветеринарный продукт далее в настоящей заявке также обозначается как исследуемый ветеринарный продукт (IVP) № 1 или “IVP1”, соответственно.

В завершение, относительно нового процесса, описанного в настоящей

20 заявке, наблюдаемыми конкретными преимуществами являются экономия времени, уменьшение затрат на обработку, и хранение/пространства в холодильной камере.

## ПРИМЕР 2:

### Анализы стабильности во время использования

#### Краткое описание

Используя оптимизированный протокол, создавали исследования для анализа стабильности во время использования исследуемого ветеринарного продукта (лиофилизат), включая модифицированный живой PRRS вирус (указанный исследуемый вакцинный продукт также далее обозначается в

30 настоящей заявке как “IVP2”) после восстановления с исследуемым ветеринарным продуктом (IVP) № 1 (IVP1) из Примера 1.

Обзор используемых исследуемых ветеринарных продуктов (IVP) представлен в Таблице 1.

Оценка включала две партии **IVP1** (одна изготовленная с высокой эффективностью и одна с обычной /стандартной эффективностью высвобождения) и две партии **IVP2**.

5 Все тестируемые исследуемые ветеринарные продукты (IVP) (ср. Таблицу 1) хранили при  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  до применения в исследовании.

В исследовании, каждую партию **IVP2** вакцины восстанавливали с **IVP1**, и титр PRRS вируса тестировали через 0, 2 и 4 часов после восстановления.

10 Для каждой **IVP2** партии, титры PRRS вирусов после восстановления во время 0 были сходными независимо от лиофилизата, восстановленного с WPBS (промывочный забуференный фосфатом физиологический раствор (= забуференный фосфатом физиологический солевой промывочный раствор)) или с **IVP1** и независимо от исследователей. Дополнительно, результаты тестирования через 2 и 4 часа после инкубирования при комнатной температуре, не показывают изменений или только незначительные изменения титров  
15 вирусов.

Результаты исследования поддерживают ассоциированное применение **IVP1** с **IVP2**.

## 1. ВВЕДЕНИЕ

20 Исследование было создано для демонстрации стабильности во время использования **IVP2** после восстановления с **IVP1**. **IVP2** представляет собой лиофилизированную модифицированную живую вакцину (MLV) и **IVP1** получали, как описано выше.

Ниже представлены результаты оценки стабильности во время использования для **IVP2** после восстановления с **IVP1**.

## 25 2. ЗАДАЧИ / ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Задачей этого исследования стабильности во время использования было исследовать стабильность **IVP2** вакцины после восстановления с **IVP1**.

## 3. МАТЕРИАЛЫ

30 Оценивали две партии каждой из двух вакцин и одной партии контрольного разбавителя, используемого в исследовании, где составы тестируемых материалов представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Составы тестируемых материалов

| Материал | Компонент                             | Количество                     |                       |
|----------|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
|          |                                       | Тестируемая партия №1          | Тестируемая партия №2 |
| IVP1     | PCV2 антиген                          | 7%                             | 3,2%                  |
|          | Раствор карбомера (Адьювант)          | 20%                            | 20%                   |
|          | Физиологический солевой раствор       | 73%                            | 76,8%                 |
| IVP2     | PRRS вирус                            | 75%                            | 75%                   |
|          | Сахароза/Желатин (Стабилизатор)       | 25%                            | 25%                   |
|          | Физиологический солевой раствор       | 0%                             | 0%                    |
| WPBS     | Хлорид натрия                         | 8,00 мг/мл                     |                       |
|          | Хлорид калия                          | 0,20 мг/мл                     |                       |
|          | Фосфат калия одноосновный, EP         | 0,2 мг/мл                      |                       |
|          | Двухосновный фосфат натрия, Безводный | 1,15 мг/мл                     |                       |
|          | Вода для инъекций                     | Достаточное количество до 1 мл |                       |

#### 4. СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ

5 Каждую партию **IVP2** вакцины тестировали с каждой партией субъединичной вакцины (**IVP1**), во всех возможных комбинациях. В Таблице 2.1 перечислены все восемь комбинаций вакцин, оцениваемых в этом исследовании.

Таблица 2.1 Перечень оцениваемых комбинаций IVP

| № образца | Идентификация образца* | IVP комбинации          |                         |
|-----------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|           |                        | IVP1 (партия №1 или №2) | IVP2 (партия №1 или №2) |
| 1         | IVP1№1 _ IVP2№1        | №1                      | №1                      |
| 2         | IVP1№2 _ IVP2№1        | №2                      | №1                      |
| 3         | IVP1№1 _ IVP2№2        | №1                      | №2                      |
| 4         | IVP1№2 _ IVP2№2        | №2                      | №2                      |

10 Образцы тестировали для определения титров PRRS вирусов сразу после завершения восстановления и объединения в нулевой момент времени (T0). Объединенные образцы хранили при комнатной температуре в темноте и снова тестировали через 2 часа (T2) и через 4 часа (T4). Образцы приготавливали в тот же самый день, что и тестировали. Каждый образец тестировали в двух различных сессиях и сессии осуществляли в разные дни.

Тестирование осуществлялось двумя исследователями. Исследователь 1 тестировал Образцы № 1 - 4 с **IVP2** партией №1 и Исследователь 2 тестировал Образцы № 5 - 8 с **IVP2** партией №2. Каждый исследователь тестировал два образца и контроль для стабильности во время использования на сессию.

5 Контроль состоял из **IVP2**, восстановленного с помощью стерильного промывочного забуференного фосфатом физиологического раствора (WPBS), используя аналогичные объемы и временные интервалы, как и указанные для соответствующих тестируемых образцов.

## **5. МЕТОДЫ**

### **5.1 МЕТОД ВОССТАНОВЛЕНИЯ**

Для каждого образца (как описано в Таблице 2.1), каждый из трех флаконов **IVP2** восстанавливали с 10 мл **IVP1**. Для каждого контроля, каждый из трех флаконов **IVP2** восстанавливали с 10 мл WPBS. После завершения восстановления, содержимое каждого из трех флаконов, как описано выше, объединяли перед началом тестирования.

### **5.2 МЕТОД ТЕСТИРОВАНИЯ**

#### **ДЕНЬ -3**

Суспензию клеточной культуры АК-МА104 клеток приготавливали в MEM, дополненной 10 % FBS и гентамицин сульфатом. 100 мкл клеточной культуры

20 высевали в каждую лунку микротитровальных планшетов на 96 лунок. Планшеты закрывали крышкой и выдерживали в инкубаторе в течение 3 дней.

#### **ДЕНЬ 0**

#### **Приготовление образца**

Образцы **IVP1** и положительного контроля использовали для

25 ресупендирования лиофилизированных образцов **IVP2**. Три флакона объединяли и пул титровали в трех повторях.

#### **Титрование**

В качестве среды для разведения использовали MEM, дополненную 2 % FBS и гентамицин сульфатом, для разведения образцов.

#### **Инокуляция**

Лунки образцов инокулировали с 100 мкл разведенного образца и лунки отрицательного контроля инокулировали с 100 мкл среды.

#### **Инкубирование**

Их инкубировали в течение 8 дней в инкубаторе.

**ДЕНЬ +8****Анализ и расчет**

Конечный цитопатический эффект (CPE) при анализе планшет получали под инверсионным микроскопом и необработанные данные превращали в дозу титр на 1 мл путем добавления 1,0 log.

Титры рассчитывали в соответствии с методом Reed и Muench (Reed, L. J.; H. Muench, (1938). "A simple method of estimating fifty per cent endpoints." Am. J. Hygiene, 27: 493 – 497) и выражали в виде дозы log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> на 1 мл. Титр каждого образца для каждого тестируемого интервала записывали в виде среднего арифметического титра на дозу независимых титрований двух последовательных значащих тестов с тремя независимыми титрованиями на сессию.

**6. КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ**

Титры вирусов IVP2, полученные в 0 (T0), 2 (T2) и 4 (T4) часа после восстановления с WPBS контрольным разбавителем, были больше, чем или равными заранее определенной /предварительно определенной минимальной иммунизирующей дозе (MID).

**7. Результаты**

Обобщенные результаты средних титров, полученных для тестируемых образцов и соответствующие контроли для каждого времени инкубирования (T0, T2 и T4) и соответствующие отличия титров относительно времени 0 (T0-T0, T2-T0, и T4-T0) представлены в Таблице 3 и Таблице 4, соответственно.

**Таблица 3. Средние титры вирусов**

| Партия образцов | Описание образца         | T0   | T2   | T4   |
|-----------------|--------------------------|------|------|------|
| 1-1             | IVP2№1_WPBS контроль 1-1 | 6,10 | 5,97 | 6,06 |
|                 | IVP1№1_IVP2№1            | 6,13 | 6,01 | 6,10 |
| 1-2             | IVP2№1_WPBS контроль 1-2 | 6,12 | 6,21 | 6,11 |
|                 | IVP1№2_IVP2№1            | 6,06 | 6,09 | 6,07 |
| 2-1             | IVP2№2_WPBS контроль 2-1 | 6,01 | 6,01 | 6,04 |
|                 | IVP1№1_IVP2№2            | 5,93 | 6,02 | 6,04 |
| 2-2             | IVP2№2_WPBS контроль 2-2 | 5,94 | 5,98 | 5,86 |
|                 | IVP1№2_IVP2№2            | 5,94 | 5,87 | 5,85 |

Таблица 4. Отличие среднего титра вируса от T0

| Партия образцов | Описание образца         | T2-T0 | T4-T0 |
|-----------------|--------------------------|-------|-------|
| 1-1             | IVP2№1 WPBS контроль 1-1 | -0,13 | -0,04 |
|                 | IVP1№1 IVP2№1            | -0,12 | -0,03 |
| 1-2             | IVP2№1 WPBS контроль 1-2 | 0,09  | -0,01 |
|                 | IVP1№2 IVP2№1            | 0,03  | 0,01  |
| 2-1             | IVP2№2 WPBS контроль 2-1 | 0,00  | 0,03  |
|                 | IVP1№1 IVP2№2            | 0,09  | 0,11  |
| 2-2             | IVP2№2 WPBS контроль 2-2 | 0,04  | -0,08 |
|                 | IVP1№2 IVP2№2            | -0,07 | -0,09 |

Титры PRRS вирусов выражали в виде дозы  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/1 мл. Каждое значение титра представляет собой среднее значение результатов, полученных в два тестируемых дня с независимым титрованием для каждого тестируемого дня.

## 8. ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, полученные в этом исследовании, свидетельствуют о том, что титры вирусов **IVP2**, регидратированных со стандартным разбавителем (WPBS), все были выше MID и оставались стабильными в течение четырех часов инкубирования при комнатной температуре. Эти результаты согласуются с известными ранее определенными характеристиками продукта **IVP2** и подтверждают обоснованность оценки этой стабильности во время использования модифицированной живой PRRS вирусной вакцины **IVP2** в ассоциированном применении с **IVP1**.

Результаты, полученные для обеих партий **IVP2**, тестируемых с любой из двух партий **IVP1** в T0, продемонстрировали сопоставимые титры вирусов к тем, которые получены с соответствующими контролями. Вариабельность, наблюдаемую между контролями и тестируемыми образцами, находится в пределах вариабельности анализа, наблюдаемой в соответствующем анализе валидационного исследования.

Результаты, полученные для обеих партий **IVP2** после восстановления с любой из двух партий **IVP1** в T2 и T4, продемонстрировали стабильные титры вирусов с отсутствием или минимальным ( $\leq 0,12 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>) снижением титра.

## 9. ВЫВОД

Результаты этого исследования подтверждают ассоциированное применение **IVP1** и **IVP2**, и стабильность во время использования 4 часа для **IVP2** при смешивании с **IVP1**.

### ПРИМЕР 3:

#### А) НАЧАЛО ИММУНИТЕТА НА PRRSV ЗАРАЖЕНИЕ

Задачей этого исследования было изучить, будет ли влияние на начало иммунитета **IVP2** в 3 недели после вакцинации при использовании в ассоциации с **IVP1**. Для этого **IVP2** вакцину восстанавливали до минимальной иммунизирующей дозы (MID) с **IVP1**, приготовленным с высокой эффективностью, где эта комбинация **IVP1** и **IVP2** также называется “**IVP1/IVP2**” далее. В это исследование включали 52 поросят в возрасте три недели, которые получены из коммерческого стада в Германии. Первичным параметром исследования являлось поражения в легких при некропсии, через десять - двенадцать дней после заражения.

При включении ни у одного из животных не было антител или они не были антиген-положительными по PRRSV. Вплоть до заражения с применением PRRSV (в день 21 после вакцинации), ни у одного из животных контрольной группы не обнаруживалось сероконверсии или они не тестировались положительно по PRRSV антигену.

Животные, вакцинированные с применением **IVP1/IVP2**, имели среднюю оценку поражения в легких, уменьшенную на 52,1% по сравнению с животными из контрольной группы. Более того, поскольку **IVP1/IVP2** вакцинированные животные имели статистически достоверное более высокое ADWG 164 грамм в день после заражения по сравнению с контрольной группой, результаты ADWG подтверждают эффективность комбинации **IVP1** и **IVP2**.

У животных, вакцинированных с применением **IVP1/IVP2**, первые PRRSV антитела были обнаружены через 14 дней после вакцинации (D14). В то время как число животных с положительными PRRSV антителами не отличается статистически достоверно между двумя группами через одну неделю после заражения, уровень антител существенно более высокий у вакцинированных группах по сравнению с контрольной группой. Через десять - двенадцать дней после заражения, все животные были положительными по PRRSV антителам и не было статистически достоверного отличия в уровне антител между группами.

В заключение, было показано, что не начало иммунитета **IVP2** на 3 неделе после вакцинации не оказывает отрицательного влияния при использовании в ассоциации с **IVP1**.

#### Б) НАЧАЛО ИММУНИТЕТА НА PCV2 ЗАРАЖЕНИЕ

5       Задачей этого исследования было оценить начало иммунитета для **IVP1** при использовании в ассоциации с **IVP2**. Для этой цели **IVP2** вакцину восстанавливали для достижения минимальной иммунизирующей дозы путем добавления **IVP1**, приготовленного для достижения минимальной эффективности, где эту смесь **IVP1** и **IVP2** также называют “**IVP2/IVP1**” далее в  
10       настоящей заявке.

      Это исследование включало 60 рожденных с помощью кесарева сечения и не получающих молозива (CDGD) поросят, которые были серонегативными по PCV2, из которых 30 вакцинировали с применением **IVP2/IVP1** и 30 (контрольная группа) получали стерильный разбавитель (вода для инъекций) в  
15       возрасте 3 недели (то есть, в день исследования 0 (D0)), с последующим вирулентным заражением PCV2 в D15.

      Вакцинация с применением **IVP2/IVP1** приводила к существенному увеличению свиней, положительных по PCV2 серологии. В течение одной недели после заражения 28 поросят (93%) из **IVP2/IVP1** группы серопревращались в положительные уровни, в то время как 0/30 поросят (0%) из  
20       контрольной группы были положительными. Животные из контрольной группы начинали серопревращаться на положительные уровни на тринадцатый день дней после заражения. В D21, D28, и D35 **IVP2/IVP1** группа имела существенно более высокую пропорцию поросят с положительными PCV2 титрами по  
25       сравнению с контрольной группой. В D42, **IVP2/IVP1** группа была 100% серологически положительной по PCV2, в то время как контрольная группа была 92% положительной.

      При оценке первичных показателей исхода лечения, вакцинация с применением **IVP2/IVP1** существенно уменьшили истощение лимфоидной  
30       ткани, воспаление лимфоидной ткани и PCV2 лимфоидная колонизация по сравнению с контрольной группой. Более того, общий уровень гистологических поражений был более тяжелым в контрольной группе, где 23/30 поросят (76,7%) имели от умеренных до тяжелых оценок по меньшей мере в одной категории оценки лимфоидных поражений, в то время как только 2/30 поросят (6,7%) из

вакцинированных поросят имели умеренную оценку лимфоидных поражений, и ни одного не было с тяжелой.

В заключение, **IVP1**, приготовленный с минимальной эффективностью и используемый в ассоциации с **IVP2**, обеспечивал эффективную активную иммунизацию CDCD поросят в возрасте 3 недели при заражении вирулентным PCV2 в день 15 после вакцинации.

Кроме того, в дальнейшем исследовании вакцинация-PCV2 заражение, моновалентный **IVP1** сравнивали с соответствующим продуктом, который не подвергался нижерасположенному получению в соответствии с Примером 1 (указанный продукт называется „**IVP0**” в настоящей заявке), было показано, что **IVP1** является по меньшей мере таким же эффективным, как и установленный **IVP0**.

#### В) ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ИММУНИТЕТА НА PCV2 ЗАРАЖЕНИЕ

Задачей этого исследования было оценить продолжительность иммунитета для **IVP1** при использовании в ассоциации с **IVP2**. Для этой цели **IVP2** вакцину восстанавливали для достижения минимальной иммунизирующей дозы путем добавления **IVP1**, приготовленного для достижения минимальной эффективности. Как было указано выше (в разделе Б), эту смесь **IVP1** и **IVP2** также называют “**IVP2/IVP1**” в настоящей заявке

Это исследование включало 60 рожденных с помощью кесарева сечения и не получающих молозива (CDCD) поросят, которые были сероотрицательными по PCV2, из которых 30 вакцинировали с применением **IVP2/IVP1** и 30 (контрольная группа) получали стерильный разбавитель (вода для инъекций) в возрасте 3 недели (то есть, в день исследования 0 (D0)), с последующим вирулентным заражением PCV2 в D119 (17 недель продолжительность иммунитета).

В результате этого, животные, вакцинированные с применением **IVP2/IVP1**, имели существенно уменьшенную частоту истощения лимфоидной ткани, лимфоидную колонизацию, и виремию по сравнению с контрольными животными после PCV2 заражения. Дополнительно, животные, вакцинированные с применением **IVP2/IVP1**, имели существенно уменьшенную PCV2 вирусную нагрузку во все дни отбора образцов с отсутствием уровней вируса, рассматриваемых как виремические для вызывания заболевания ((ПЦР с обратной транскрипцией) тест  $\geq 1,0 \times 10^4$  PCV2 геномных эквивалентов) в любой

точке отбора образцов, в то время как контрольные животные были вирусемическими в среднем в течение 28 дней после заражения с применением PCV2.

Вакцинация с применением **IVP2/IVP1** приводила к существенному увеличению поросят, положительных по PCV2 серологии от вакцинации (D0) до D133 (две недели после заражения с применением PCV2), что первоначально является более сильным индикатором эффективности. Большинство контрольной группы (81%) не были положительными по PCV2 серологии до D140 (3 недели после заражения с применением PCV2).

Эти результаты свидетельствуют о том, что на продолжительность иммунитета **IVP1** через 17 недель после вакцинации не оказывает отрицательного влияния использование в ассоциации с **IVP2**.

#### Г) ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ИММУНИТЕТА НА PRRSV ЗАРАЖЕНИЕ

Задачей этого исследования было изучение, будет ли оказывать влияние продолжительность иммунитета **IVP2** через 6 месяцев после вакцинации при использовании в ассоциации с **IVP1**. Для этой цели, **IVP2** вакцину восстанавливали до минимальной иммунизирующей дозы (MID) с применением **IVP1**, приготовленного с высокой эффективностью. Как указано выше (в разделе А), эту комбинацию **IVP1** и **IVP2** также называют "**IVP1/IVP2**". Исследование включало 70 поросят в возрасте три недели, которые были получены из коммерческого стада в Германии, где при включении ни одно из животных не имело антител или не было антигенположительным по PRRSV. Заражение осуществляли 182 дней после вакцинации (продолжительность иммунитета шесть месяцев). Первичным параметром исследования являлись поражения в легких при некропсии, через десять - двенадцать дней после заражения.

В результате исследования, животные, вакцинированные с применением **IVP1/IVP2**, имели уменьшенные поражения в легких по сравнению с животными из контрольной группы после PRRSV заражения, что указывает на то, что на продолжительность иммунитета **IVP2** через 6 месяцев после вакцинации не оказывает отрицательного влияния использование в ассоциации с **IVP1**.

## ПРИМЕР 4:

Анализ концентрации тиосульфат

## КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ

5 Как описано в Примере 1, бинарный этиленмин (BEI) использовали в качестве инактивирующего агента для получения бакуловирусной рекомбинантной вакцины. После инаktivации с применением BEI, тиосульфат натрия добавляют для нейтрализации оставшегося BEI.

10 После инаktivации PCV2 антигенные жидкости с 5 мМ BEI, небольшие концентрации (типично порядке 0,3 мМ) BEI оставались обнаруживаемыми. В Европейской Фармакопее описано, что BEI не должно оставаться в антигене после инаktivации. Европейская Фармакопея позволяет, что оставшийся тиосульфат натрия после инаktivации приемлемый для гарантирования того, что токсичные уровни BEI не остаются на антигене. Следовательно, 5 мМ тиосульфата применяли для нейтрализации BEI на активационных стадиях, 15 поскольку 5 мМ BEI изначально добавляли в начале стадии инаktivации. Поскольку значительное количество BEI потребляется в реакциях с нуклеиновыми кислотами во время инаktivации, и поскольку тиосульфат и BEI реагируют в 1:1 стехиометрии, избыток оставшегося тиосульфата остается после нейтрализации.

20 Тестирование тиосульфата осуществляли, как описано ниже, на антигенных жидкостях, полученных в соответствии с Примером 1.

Данные из этого эксперимента указывают на то, что способ, как описано в Примере 1, неожиданно уменьшает уровни тиосульфата ниже пределов обнаружения для метода уже в 10-тикратно концентрированных и 25 диафильтрованных антигенных жидкостях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Количественное определение тиосульфата натрия в антигенных жидкостях с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД)**

30 А. Реагенты и материалы

1. Тиосульфат натрия пентагидрат, чистый для анализа с известной чистотой

2. Очищенная вода - использовали удельное сопротивление 18 МОм·см или больше

3. Ацетонитрил (ACN), степень чистоты «для ВЭЖХ»
4. Ледяная уксусная кислота, степень чистоты «для ВЭЖХ»
5. Тетрабутиламмония гидроксид (ТБА), чистый для анализа
6. ВЭЖХ колонка/картридж – Thermo Scientific, ODS-2 Hypersil, 150 x

4,6 мм, 5 микрон с подходящим картриджем, ODS-2 Hypersil-2, 10 x 4,6 мм, 5 микрон, или эквивалент.

#### Б. Растворы

1. 20% Раствор уксусной кислоты

Объединяли 10 мл ледяной уксусной кислоты и 40 мл очищенной воды, и тщательно смешивали.

2. Элюент

Объединяли 750 мл очищенной воды и 20 мл ТБА, и тщательно смешивали. Значение pH этого раствора доводили до 4,5 – 5,0 путем добавления 20 мл 20% раствора уксусной кислоты, и затем объединяли с 250 мл ацетонитрила. Тщательно смешивали и фильтровали через нейлонный фильтр 0,2 мкм перед использованием.

3. Разбавитель

Объединяли 800 мл очищенной воды и 200 мл ацетонитрила; тщательно смешивали и хранили в условиях окружающей среды.

#### В. Сравнительные стандартные растворы тиосульфата

1. Маточный раствор тиосульфата натрия (5 mM)

Взвешивали 1,2 г сравнительного материала пентагидрат тиосульфата натрия и переносили в мерную колбу объемом 1000 мл Класс А с очищенной водой; тщательно смешивали путем инверсии.

2. 100% Рабочий Стандартный раствор (100 % WS)

Переносили 2 мл *маточного раствора тиосульфата натрия* в мерную колбу объемом 50 мл Класс А. Разводили до объема *Разбавителем* и тщательно смешивали путем инверсии.

3. Стандартный раствор с 50 % Линейностью (50 % LS)

Переносили 1 мл *маточного раствора тиосульфата натрия* в мерную колбу объемом 50 мл Класс А. Разводили до объема *Разбавителем* и тщательно смешивали путем инверсии.

4. Стандартный раствор с 150 % Линейностью (150 % LS)

Переносили 3 мл *маточного раствора тиосульфата натрия* в мерную колбу объемом 50 мл Класс А. Разводили до объема *Разбавителем* и тщательно смешивали путем инверсии.

5. Предел количественного определения раствора (LOQ)

5 Переносили 1 мл 50% *LS* в мерную колбу объемом 20 мл Класс А. Разводили до объема *Разбавителем* и тщательно смешивали путем инверсии.

Г. Раствор тестируемой жидкости PCV2 инактивированного антигена

10 Переносили 500 мкл жидкости инактивированного антигена в мерную колбу объемом 10 мл Класс А. Разводили до объема *Разбавителем* и тщательно смешивали путем инверсии. Образец фильтровали через 0,2 мкм нейлонный шприцевой фильтр, в ВЭЖХ флакон, истощение сначала 2 до 3 мл. Это представляет собой 20-ти кратное разведение антигенной жидкости.

Д. Хроматографическое оборудование для ВЭЖХ и условия

1. Скорость потока: 1,2 мл/мин
- 15 2. Вводимый объем: 10 мкл
3. Колонка: Thermo Scientific, ODS-2 Hypersil, 150 x 4,6 мм, 5 микрон с подходящим картриджем, ODS-2 Hypersil-2, 10 x 4,6 мм, 5 микрон.
4. Температуры: 20 ± 2 °C температура тарелки с образцом  
25 ± 2 °C температура колоночного термостата
- 20 5. Обнаружение: 230 нм
6. Порядок типичного анализа
  - Разбавитель для отходов
  - Разбавитель; 1 введение
  - Холостое; 1 введение (мониторинг исходного уровня, без введения)
  - 25 • Стандарты калибровки; 6 введения 100 % WS
  - Стандарты линейности; 2 введения каждое 50, 100 и 150 % растворов
  - LOQ Стандарт; 2 введения
  - Тестируемые растворы и эталонные стандарты; 2 введения на каждый тестируемый раствор и два введения 100%WS в качестве эталонных стандартов
  - 30 между максимально введением 16 образцов и после окончания анализа
7. Время удерживания тиосульфата: приблизительно 7 минут.
- Е. Расчет содержания тиосульфата натрия – Содержание тиосульфата, в виде mM, рассчитывали, используя следующее уравнение:

$$\text{Тиосульфат (мМ)} = \text{TS} / \text{WS} \times \text{C} \times 20$$

Где: TS – Средние площади пиков тиосульфата двух введений препаратов тестируемых растворов.

WS – Средние площади ответов тиосульфата шести введений 100%WS.

5 C - концентрация рабочего стандартного раствора в мМ (0,2 мМ).

20 – Фактор разведения тестируемого раствора

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализировали несколько антигенных жидкостей, полученных, как описано в Примере 1, где отбирали пары образцов

10 (I) после BEI нейтрализации с применением тиосульфата натрия, но перед нижерасположенным получением и

(II) после нижерасположенного получения (то есть, 10-ти кратное концентрирование и непрерывная диафильтрация), но перед смешиванием с адьювантом и Ф-раствором,

15 и определяли концентрацию тиосульфата натрия.

Было обнаружено, что образцы (I), отобранные после BEI нейтрализации, но перед нижерасположенным получением, все еще имели концентрацию тиосульфата натрия в миллимолярном диапазоне, в то время как **не было обнаружено** тиосульфата **в или выше** предела обнаружения (**3 мкМ**) в образцах  
20 (II), отобранных после нижерасположенного получения, но перед смешиванием с адьювантом и Ф-раствором.

## ПРИМЕР 5:

### Анализ антигенных жидкостей путем 2 двухмерной СВЭЖХ

Метод 2 двухмерной СВЭЖХ, основанный на разделении с помощью  
25 анионообменной и эксклюзионной хроматографии по размеру, использовали для анализа антигенных жидкостей, содержащих вирусоподобные частицы (VLP), полученные в результате обработки, как описано в Примере 1.

В 1-ой фазе хроматографии использовали анионообменную хроматографию, и отрицательно заряженные виды связывались с колонкой (0 –  
30 2,67 минут на хроматограмме) и затем элюировались путем возрастающих концентраций хлорида натрия в градиенте.

Во 2-ой фазе хроматографии использовали разделение по размеру (2,67 – 15 минут на хроматограмме), где переключали клапан и введение из 1-ого

измерения анионообменной осуществляли на эксклюзионную колонку. Эксклюзионная колонка элюирует смесь анионообменных элюентов.

#### Материалы и методы

##### А. Реагенты и материалы

- 5           1. 1 М Трис, pH 7,4 в воде, чистота для молекулярной биологии
2. 5 М NaCl в воде, чистота для молекулярной биологии
3. Очищенная вода – 1 использовали удельное сопротивление 8 М МОм·см или больше
- 10          4. Анионообменная колонка – объем колонки 0,1 мл с четвертичными аминными функциональными группами, подходящими для связывания VLP (материал с большими порами или непористый материал)
5. Эксклюзионная колонка – объем колонки 1,75 мл с размерами пор 450 Å
- 15          6. 10 н. NaOH, Чистый для анализа

##### Б. Растворы

1. 50 mM Трис, pH 8: Объединяли 50 мл 1 М Трис, pH 7,4 с 900 мл воды. Значение pH доводили до 8 с помощью 10 н. NaOH, разводили до 1000 мл, и фильтровали через фильтр 0,22 мкм.
- 20          2. 50 mM Трис, 2M NaCl, pH 8: Объединяли 50 мл 1 М Трис, pH 7,4 и 400 мл 5 М NaCl с 300 мл воды. Значение pH доводили до 8 с помощью 10 н. NaOH, разводили до 1000 мл, и фильтровали через фильтр 0,22 мкм.

##### В. PCV2 в процессе сравнительного раствора

- 25          1. Фильтровали антигенную жидкость, полученную перед инактивацией, через PES фильтр 0,22 мкм.

##### Г. PCV2 с предварительной инактивацией, или инактивированный антигенный жидкий тестируемый раствор

1. Фильтровали антигенную жидкость через PES фильтр 0,22 мкм.

##### 30          Д. 2D – Хроматографическое оборудование для СВЭЖХ и условия

1. Хроматография в первом измерении
  - а) Скорость потока: 0,6 мл/мин
  - б) Вводимый объем: 20 мкл
  - в) Объем системы: 400 мкл

- г) Колонка: 0,1 мл объем колонки четвертичная аминная колонка
- д) Температура: Комнатная температура
- е) Обнаружение: Испускание флуоресценции (Возбуждение 280 нм и эмиссия 330 нм)
- ж) Градиент: Способ многостадийного градиента изначально 100% 50 мМ Трис, pH 8 на отрезке времени 0 минут до 97,5% 50 мМ Трис, pH 8 и 2,5% 50 мМ Трис, 2 М NaCl, pH 8 на отрезке времени 1 минута и в завершение до 10% 50 мМ Трис, pH 8 и 90% 50 мМ Трис, 2М NaCl, pH 8 на отрезке времени 2 минуты осуществляли со скоростью потока 0,6 мл/мин через анионообменную колонку.
2. Хроматография во втором измерении
- а) Скорость потока: 0,3 мл/мин
- б) Введение из первого измерения: 50 мкл
- в) Колонка: Эксклюзионная колонка с объемом колонки 1,75 мл с размерами пор 450 Å
- г) Обнаружение: Испускание флуоресценции (Возбуждение 280 нм и эмиссия 330 нм)
- д) Изократический Градиент: 95% 50 мМ Трис, pH 8: 5% 50 мМ Трис, pH 8, 2М NaCl
3. Порядок типичного анализа
- а) Введение 5 2-кратных серийных разведений PCV2 эталонного раствора
- б) Введение 1 – 15 образцы
- в) Введение 5 2-кратных серийных разведений PCV2 эталонного раствора
4. Переключение с времени 1-ого измерения на время 2-го измерения: 2,67 минут (это время переключения зависит от объема системы, который в данном случае составляет 400 мкл)
5. Соотношения пиков, перечисленных ниже, рассчитывали путем интеграции площадей пика и учитывая соотношения указанных площадей пиков.

Используя такую 2-двухмерную СВЭЖХ для анализа VLP (ORF2) продуктов, полученных из бакуловирусных экспрессионных систем, наблюдали различные отчетливые пики на полученной хроматограмме:

- 5           - пик в 0-1 минут на хроматограмме, также называемый “Пик А”  
          далее в настоящей заявке, представляющий компоненты, которые не  
          связываются с анионообменными колонками при pH 8 (то есть  
          нейтральные или катионные компоненты при pH8, например,  
          положительно заражённые белки и/или компоненты клеточных  
          культур)
- 10          - пик в 7-8 минут на хроматограмме, также называемый “Пик В”  
          далее в настоящей заявке, представляющий VLP (ORF2) антиген,  
          представляющий интерес
- пик в 8,5-9,5 минут на хроматограмме, также называемый “Пик С”  
          далее в настоящей заявке, представляющий компоненты в  
15          диапазоне размера от IgG (150 кДа) до Урацила (0,1 кДа).

Было обнаружено, что 10-ти кратные разведения образцов, отобранные после  
нижерасположенного получения, как описано в Примере 1 (то есть, 10-ти  
кратное концентрирование и непрерывная диафильтрация) проявляют 99,2%  
снижение в пике А и 42% снижение в пике С, в среднем, по сравнению с  
20 образцами процессинга накопления. Кроме того, в то время как было  
обнаружено снижение пиков А и С, наблюдали повышение пика В.

Неожиданно, было обнаружено, что соотношения пиков (пик А/В и пик С/В)  
образцов, отобранных после нижерасположенного получения, как описано в  
Примере 1, составляют только 0,3 для Пика А/В (со станд. отклонением, для 3  
25 повторов, 0,1) и 0,7 для Пика С/В (со станд. отклонением, для 3 повторов, 0,2).

Кроме того, было обнаружено, что в образцах, отобранных после  
нижерасположенного получения, как описано в Примере 1 (то есть, 10-ти  
кратное концентрирование и непрерывная диафильтрация) не было повышения  
агрегации или присутствия видов большего размера в растворе. Это наблюдение  
30 является неожиданным, так как специалист будет предполагать, вследствие  
зависимости агрегации от концентрации, наблюдать при эксклюзионной  
хроматографии по размеру (SEC), существенное увеличение более крупных  
разновидностей в концентрированных образцах.

## ПРИМЕР 6:

Количественное определение свободных аминокислот

Применяли общепринятый способ для количественного определения свободных аминокислот в среде для культивирования клеток насекомых и истощённых питательных средах для определения концентрации аминокислот в антигенных жидкостях, полученных, как описано в Примере 1.

Вкратце, белок в образцах осаждали с трихлоруксусной кислотой (ТСА) и осаждали с центрифугированием. Супернатант из ТСА преципитации нейтрализовали с гидроксидом натрия и добавляли норвалин в качестве внутреннего стандарта. После этого образцы дериватизировали с офталдигидом (ОРА) и меркаптопропионовой кислотой (МРА) в петлевом дозаторе UHPLC, затем инъецировали на колонку с обращенной фазой для количественного определения с помощью УФ поглощения при 338 нм. На основе хроматограмм для стандартного сравнительного образца (наружный стандарт) определяли концентрацию 20 стандартных аминокислот (то есть 20 генетически кодируемых аминокислот), включенных в антигенные жидкости

Измеряя концентрации аминокислот нескольких образцов, осуществленные после процессинга по ходу транскрипции (то есть, 10-кратное концентрирование и непрерывная диафильтрация), как описано в Примере 1, и принимая во внимание последующее разбавление указанных образцов путем добавления адьюванта и Ф-раствора, были обнаружены /определены характерные концентрации конкретных аминокислот в конечном продукте (вакцине), находящиеся в следующем диапазоне:

Триптофан: 0,1-0,7 мкМ;

Глутамин: 0,7-2,4 мкМ;

Метионин: 0,5-3,2 мкМ;

Аргинин: 1,4-4,7 мкМ;

Треонин: 1,6-8,0 мкМ;

Лизин: 4,0-12,2 мкМ.

В этом отношении, также была определена типичная средняя концентрация указанных аминокислот в конечном продукте (вакцине), находящаяся в следующем диапазоне:

Триптофан: 0,2-0,6 мкМ;

Глутамин: 0,8-2,2 мкМ;

Метионин: 0,8-2,2 мкМ;

Аргинин: 1,6-4,3 мкМ;

Треонин: 2,4-6,3 мкМ;

Лизин: 4,4-11,2 мкМ.

- 5 В заключение следует отметить, что результаты, полученные на основании анализов, как описано в Примерах 4-6, показывают, что способ, как описано в Примере 1, обеспечивает продукт, который имеет специфические присущие свойства, где каждое из которых может способствовать благоприятному исходу тестов и исследований, как описано в Примерах 2 и 3.

## 10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Последующие фигуры составляют часть настоящего описания и включены для дальнейшей демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение может лучше пониматься со ссылкой на одну или более из этих фигур в комбинации с подробным описанием специфических вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке.

15 Фиг. 1 обеспечивает схематический обзор иллюстративного способа в соответствии с изобретением.

## В ПЕРЕЧНЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ:

SEQ ID NO: 1 соответствует последовательности PCV2a ORF2 белка, и

- 20 SEQ ID NO: 2 соответствует последовательности PCV2b ORF2 белка; “PCV2b ORF2 белок”, как указано в настоящей заявке, в частности, относится к ORF2 белку так называемого “мутанта PCV2b”, который также рассматривается как принадлежащий к генотипу d.

Настоящее раскрытие включает, в частности, следующие воплощения:

- 25 1. Способ получения иммуногенной композиции, включающей рекомбинантный белок, где способ включает стадии:
- (a) обеспечение смеси, содержащей
- первую жидкость, и
  - рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, включающие
- 30 множество указанного рекомбинантного белка,
- (б) концентрирование рекомбинантного белка и/или указанных четвертичных структур в смеси, полученной на стадии (a), путем удаления части первой жидкости из смеси, и

(в) обработку раствора, полученного на стадии (б), путем непрерывной диафильтрации.

2. Способ по пункту 1, где указанная непрерывная диафильтрация представляет собой непрерывную диафильтрацию против второй жидкости, где вторая жидкость отличается от первой жидкости.

3. Способ согласно воплощению 1 или 2, где смесь со стадии (а) дополнительно содержит или дополнительно включает

- вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный белок, где указанный вектор был инактивирован инактивирующим агентом, и/или
- инактивирующий агент, который был нейтрализован нейтрализующим агентом, и/или
- нейтрализующий агент.

4. Способ согласно воплощению 3, где на стадии (в) раствор, полученный на стадии (б), обрабатывают путем непрерывной диафильтрации таким образом, что концентрация нейтрализованного инактивирующего агента и/или концентрация нейтрализующего агента снижена в обрабатываемом растворе.

5. Способ получения иммуногенной композиции, включающей рекомбинантный белок, в особенности способ согласно одному из воплощений 1 - 4, где способ включает стадии:

(а)(I) обеспечение смеси, содержащей

- первую жидкость,
- рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, включающие множество указанного рекомбинантного белка, и

- вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный белок;

(II) инактивирование вектора путем добавления инактивирующего агента к смеси со стадии (I);

(III) нейтрализацию инактивирующего агента путем добавления нейтрализующего агента к смеси, полученной на стадии (II);

(б) концентрирование рекомбинантного белка и/или указанных четвертичных структур в смеси, полученной на стадии (а)(III), путем удаления части первой жидкости из смеси, и

(в) обработку раствора, полученного на стадии (б), путем непрерывной диафильтрации таким образом, что

концентрация нейтрализованного инактивирующего агента и/или  
 концентрация нейтрализующего агента снижена в обрабатываемом  
 5 растворе.

6. Способ согласно одному из воплощений 1 - 5, где на стадии (б) удаление  
 части первой жидкости из указанной смеси состоит из или включает  
 фильтрование указанной смеси с по меньшей мере одним фильтром, где  
 указанный по меньшей мере один фильтр предпочтительно включает  
 10 фильтровальную мембрану.

7. Способ согласно одному из воплощений 3 - 6, где на стадии (б) указанное  
 концентрирование включает

- подачу смеси в фильтрующую систему, содержащую по меньшей мере  
 один фильтр, где по меньшей мере один фильтр включает  
 15 фильтровальную мембрану, имеющую размер пор мембраны,  
 позволяющий нейтрализованному инактивирующему агенту и/или  
 нейтрализующему агенту проходить через нее, при этом удерживая  
 рекомбинантный белок и/или указанные четвертичные структуры в  
 объемном потоке,

20 - удаление фильтрата, включающего нейтрализованный инактивирующий  
 агент и/или нейтрализующий агент.

8. Способ согласно одному из воплощений 3 - 7, где на стадии (в) указанная  
 непрерывная диафильтрация включает

- подачу раствора в фильтрующую систему, содержащую по меньшей мере  
 25 один фильтр, где по меньшей мере один фильтр включает  
 фильтровальную мембрану, имеющую размер пор мембраны,  
 позволяющий нейтрализованному инактивирующему агенту и/или  
 нейтрализующему агенту проходить через нее, при этом удерживая  
 рекомбинантный белок и/или указанные четвертичные структуры в  
 30 объемном потоке,

- удаление фильтрата, включающего нейтрализованный инактивирующий  
 агент и/или нейтрализующий агент,

- добавление второй жидкости к объемному потоку со скоростью, равной  
 потоку фильтрата, где вторая жидкость отличается от первой жидкости.

9. Способ согласно одному из воплощений 6 - 8, где по меньшей мере один фильтр представляет собой по меньшей мере один плоский слоистый фильтр и/или по меньшей мере один полуволоконный фильтр, и где по меньшей мере один плоский слоистый фильтр представляет собой предпочтительно по меньшей мере один кассетный фильтр.
10. Способ согласно одному из воплощений 6 - 9, где по меньшей мере один фильтр представляет собой 2-8 фильтров, предпочтительно 5-7 фильтров, и/или где каждый из по меньшей мере одного фильтра имеет общую площадь фильтрующего материала приблизительно 16-26 м<sup>2</sup>, предпочтительно приблизительно 20-22 м<sup>2</sup>.
11. Способ согласно одному из воплощений 6 - 10, где фильтровальная мембрана имеет средний размер пор, который меньше, чем рекомбинантный белок и/или указанные четвертичные структуры, и/или где фильтровальная мембрана имеет отсечение по молекулярной массе в диапазоне от приблизительно 200 кДа до приблизительно 500 кДа.
12. Способ согласно одному из воплощений 6 - 11, где фильтровальная мембрана состоит из или включает материал, выбранный из группы, включающей полиэфирсульфон, гидрат целлюлозы, регенерированную целлюлозу, стабилизированную целлюлозу, поперечно сшитую целлюлозу, поперечно сшитый гидрат целлюлозы, ацетат целлюлозы, полиамид, полиуретан, полипропилен, полисульфон, поликарбонат, нейлон, полиимид, и их комбинации, и/или где фильтровальная мембрана предпочтительно состоит из или включает полиэфирсульфон, или где фильтровальная мембрана необязательно представляет собой мембрану на основе стабилизированной целлюлозы.
13. Способ согласно одному из воплощений 7 - 12, где на стадии (б) и на стадии (в) используют одинаковую фильтрующую систему.
14. Способ согласно одному из воплощений 5 - 13, где
  - стадию (III) осуществляют в первом контейнере, и где смесь, полученную при нейтрализации инактивирующего агента, переносят из первого контейнера во второй контейнер, соединенный с фильтрующей системой, и где после переноса смеси из первого во второй контейнер клапан между

первым контейнером и вторым контейнером закрывают, и пустой первый контейнер заполняют второй жидкостью,

- на стадии (б) смесь циркулирует через второй контейнер и фильтрующую систему до завершения концентрирования, и

5       - на стадии (в) клапан между первым и вторым контейнером открывают и вторая жидкость непрерывно выходит из первого контейнера во второй контейнер, в то время как смесь циркулирует через фильтрующую систему и второй контейнер.

10       15. Способ согласно одному из воплощений 1 - 14, где указанная первая жидкость включает часть среды для культивирования клеток или состоит из среды для культивирования клеток, и где среда для культивирования клеток предпочтительно представляет собой среду для культивирования клеток насекомых.

15       16. Способ согласно одному из воплощений 1 - 15, где объем смеси, полученной на стадии (а), составляет от 1000 л до 10000 л, предпочтительно от 2000 л до 8000 л, и наиболее предпочтительно от 3000 л до 5000 л.

20       17. Способ согласно одному из воплощений 1 - 15, где на стадии (б) указанный рекомбинантный белок и/или указанные четвертичные структуры в конечном итоге концентрированы по меньшей мере 5X, предпочтительно по меньшей мере 8X, более предпочтительно 9X - 11X, по сравнению с объемом смеси, полученной на стадии (а).

18. Способ согласно одному из воплощений 2 - 17, где вторая жидкость представляет собой буферный раствор, предпочтительно Ф-раствор или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

25       19. Способ согласно одному из воплощений 8 - 18, где на стадии (в) общий объем второй жидкости, добавляемый к объемному потоку, составляет по меньшей мере 5X, предпочтительно по меньшей мере 7X, более предпочтительно по меньшей мере 9X, объема раствора, полученного на стадии (б), и/или где общий объем второй жидкости, добавляемый к  
30       объемному потоку, составляет наиболее предпочтительно приблизительно объем смеси, полученной на стадии (а).

20. Способ согласно одному из воплощений 1 - 19, где указанный способ дополнительно включает стадию

(г) смешивание смеси, оставшейся после стадии (в), с дополнительным компонентом, выбранным из группы, включающей фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, разбавители, наполнители, и их комбинации, и где концентрация рекомбинантного белка и/или концентрация указанных четвертичных структур в растворе, полученном из указанного смешивания, предпочтительно составляет приблизительно концентрацию рекомбинантного белка и/или указанные четвертичные структуры в смеси, полученной на стадии (а).

21. Способ согласно одному из воплощений 1 - 20, где смесь, используемую для стадии (а), получают с помощью процедуры, включающей стадии

(1) разрешение инфицирования чувствительных клеток в культуре с вектором, включающим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный белок, где указанный рекомбинантный белок экспрессируется указанным вектором,

(2) после этого, восстановление рекомбинантного белка и/или четвертичных структур, включающих множество указанного рекомбинантного белка, из клеточной культуры, где предпочтительно клеточный дебрис отделяют от рекомбинантного белка и/или указанных четвертичных структур с помощью стадии разделения, предпочтительно включая микрофильтрацию через по меньшей мере один фильтр, предпочтительно два фильтра, где по меньшей мере один фильтр предпочтительно имеет размер пор больше чем рекомбинантный белок и/или четвертичные структуры, содержащие множество указанного рекомбинантного белка, в особенности имеет размер пор от приблизительно 1 до приблизительно 20 мкм и/или от приблизительно 0,1 до приблизительно 4 мкм.

22. Способ согласно воплощению 21, где стадия разделения включает или состоит из:

- микрофильтрации через или несколько фильтров, имеющих размер пор от приблизительно 2 мкм до приблизительно 15 мкм, и/или
- микрофильтрации через или несколько фильтров, имеющих размер пор от приблизительно 0,8 мкм до приблизительно 1,0 мкм.

23. Способ согласно воплощению 21 или 22, где клеточную культуру на стадии (1) поддерживают при 22–32°C, предпочтительно в то время как рекомбинантный белок экспрессируется указанным вектором, и/или где

восстановление на стадии (2) происходит в течение 5 - 8 дней, предпочтительно 8 дней, после инокуляции клеток с вектором.

24. Способ согласно одному из воплощений 1 - 23, где указанный рекомбинантный белок представляет собой PCV2 ORF2 белок, предпочтительно включающий или состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,5%, или 100% идентичность последовательностей с последовательностью из SEQ ID NO:1 и/или SEQ ID NO:2.
25. Способ согласно одному из воплощений 1 - 24, где четвертичные структуры представляют собой вирусоподобные частицы.
26. Способ согласно одному из воплощений 3 - 25, где вектор представляет собой рекомбинантный вирус, предпочтительно бакуловирус, и/или где последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК последовательность.
27. Способ согласно одному из воплощений 3 - 26, где инактивирующий агент представляет собой азиридиновое соединение, предпочтительно бинарный этиленимин (BEI), и/или где инактивирующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к вектору.
28. Способ согласно одному из воплощений 3 - 27, где нейтрализующий агент представляет собой тиосульфат натрия и/или где нейтрализующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к инактивирующему агенту.
29. Способ согласно одному из воплощений 5 - 28, где на стадии (III) нейтрализующий агент добавляют в эквивалентном количестве по сравнению с количеством инактивирующего агента, добавленного на стадии (II).
30. Способ согласно одному из воплощений 5 - 29, где смесь, оставшаяся после стадии (в), включает концентрацию инактивирующего агента, которая составляет менее чем одна тысячная концентрации нейтрализующего агента, полученной на стадии (III).
31. Способ по одному из пунктов 1 - 30, где вирулицидная активность иммуногенной композиции, полученной в результате осуществления указанного способа, уменьшена на по меньшей мере 20% по сравнению со

смесью иммуногенной композиции, которая не подвергалась концентрированию на стадии (б) и непрерывной диафильтрации на стадии (в) указанного способа, и/или где иммуногенная композиция, полученная с помощью указанного способа, вызывает потерю менее чем 1 log TCID<sub>50</sub> на 5 мл живого вируса, предпочтительно менее чем 0,7 log TCID<sub>50</sub> на мл живого вируса, когда живой вирус смешан с иммуногенной композицией в течение четырех или больше часов, в особенности при комнатной температуре.

32. Способ по одному из пунктов 1 - 31, где способ дополнительно включает стадию комбинирования смеси, оставшейся после стадии (в) и/или стадии (г), с по меньшей мере одним дополнительным антигеном.

33. Способ в соответствии с воплощением 31 или 32, где живой вирус или по меньшей мере один дополнительный антиген представляет собой вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

34. Иммуногенная композиция, получаемая способом по одному из пунктов 1 - 33.

35. Иммуногенная композиция по пункту 34, где иммуногенную композицию получают с помощью способа по одному из пунктов 28 - 33, и где смесь, оставшаяся после стадии (в), включает менее чем 3 мкМ тиосульфат натрия.

36. Иммуногенная композиция по пункту 34, где иммуногенную композицию получают с помощью способа по одному из пунктов 28 - 33, и где иммуногенная композиция полученной на стадии (г) по существу не содержит тиосульфата натрия.

37. Иммуногенная композиция, в особенности иммуногенная композиция согласно одному из воплощений 34 - 36, включающий

- рекомбинантный PCV2 ORF2 белок, предпочтительно включающий или состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,5%, или 100% идентичность последовательностей с последовательностью из SEQ ID NO:1 и/или SEQ ID NO:2, и
- 1-10 мкМ L-Аргинина и/или 1-10 мкМ L-Лизина,

и где предпочтительно иммуногенная композиция по существу не содержит нейтрализованного инактивирующего агента и/или по существу не содержит нейтрализующего агента.

38. Иммуногенная композиция, в особенности иммуногенная композиция согласно одному из воплощений 34 - 37, предпочтительно получаемая с помощью любого такого способа, включающего стадию (г), где иммуногенная композиция включает

рекомбинантный PCV2 ORF2 белок, предпочтительно включающий или состоящей из последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,5%, или 100% идентичность последовательностей с последовательностью из SEQ ID NO:1 и/или SEQ ID NO:2,

и

0,1-1 мкМ L-Триптофана; и/или

0,1-3 мкМ L-Глутамин; и/или

0,2-4 мкМ L-Метионина; и/или

1-10 мкМ L-Аргинина; и/или

1-10 мкМ L-Треонина; и/или

1-15 мкМ L-Лизина.

39. Иммуногенная композиция согласно одному из воплощений 34 - 38, где указанная иммуногенная композиция включает

0,1-0,7 мкМ L- Триптофан; и/или

0,7-2,4 мкМ L-Глутамин; и/или

0,5-3,2 мкМ L-Метионина; и/или

1,4-4,7 мкМ L-Аргинина; и/или

1,6-8,0 мкМ L-Треонина; и/или

4,0-12,2 мкМ L-Лизина.

40. Иммуногенная композиция согласно воплощению 39, где указанная иммуногенная композиция включает

0,2-0,6 мкМ L-Триптофана; и/или

0,8-2,2 мкМ L-Глутамин; и/или

0,8-2,2 мкМ L-Метионина; и/или  
 1,6-4,3 мкМ L-Аргинина; и/или  
 2,4-6,3 мкМ L-Треонина; и/или  
 4,4-11,2 мкМ L-Лизина.

- 5 41. Иммуногенная композиция согласно одному из воплощений 34 - 40, где  
 указанная композиция включает  
 0,7-2,4 мкМ L-Глутамина и 4,0-12,2 мкМ L-Лизина.
42. Иммуногенная композиция согласно одному из воплощений 34 - 41, где  
 указанная композиция включает  
 10 0,8-2,2 мкМ L-Глутамина и 4,4-11,2 мкМ L-Лизина.
43. Иммуногенная композиция, в особенности иммуногенная композиция  
 согласно одному из воплощений 34 - 42, предпочтительно получаемая с  
 помощью любого такого способа, включающего стадию (г), где  
 иммуногенная композиция, когда подвергается двухмерной (2 D)  
 15 сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ) при  
 комнатной температуре проявляет соотношение площади пика А к площади  
 пика В 0,2-0,4 и/или соотношение площади пика С к площади пика В 0,5-0,9,  
 где 2 D СВЭЖХ включает  
 хроматографию в первом измерении с объемом системы 400 мкл, где  
 20 - образец, включающий иммуногенную композицию, инъецируют в  
 анионообменную колонну с объемом колонки 0,1 мл, упакованную с  
 четвертичным аминок-функционализированным материалом,  
 подходящим для связывания вирусоподобных частиц, и  
 - способ многостадийного градиента изначально 100% 50 мМ Трис, рН  
 25 8 на отрезке времени 0 минут до 97,5% 50 мМ Трис, рН 8 и 2,5% 50  
 мМ Трис, 2 М NaCl, рН 8 на отрезке времени 1 минута и в завершение  
 до 10% 50 мМ Трис, рН 8 и 90% 50 мМ Трис, 2М NaCl, рН 8 на отрезке  
 времени 2 минуты осуществляли со скоростью потока 0,6 мл/мин  
 через анионообменную колонку,  
 30 и где при времени удерживания 2,67 мин переключали с хроматографии в  
 первом измерении на  
 хроматографию во втором измерении, где 50 мкл элюата хроматографии в  
 первом измерении осуществляли со скоростью потока 0,3 мл/мин через  
 эксклюзионную колонку с объемом колонки 1,75 мл с размерами пор 450 Å,

и где хроматограмму записывали путем мониторинга испускания флуоресценции при длине волны 330 нм и длине волны возбуждения 280 нм, и где

- 5           площадь пика А представляет собой площадь пика наивысшего пика при времени удерживания 0-1 минут на хроматограмме;
- площадь пика В представляет собой площадь пика наивысшего пика при времени удерживания 7-8 минут на хроматограмме;
- площадь пика С представляет собой площадь пика наивысшего пика при времени удерживания 8,5-9,5 минут на хроматограмме.
- 10   44. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 34 - 43, где указанная иммуногенная композиция по существу не содержит нейтрализующего агента, предпочтительно по существу не содержит тиосульфата натрия.
45. Иммуногенная композиция в соответствии с одним из воплощений 34 - 44, где иммуногенная композиция дополнительно включает аттенуированный
- 15   живой вирус, предпочтительно аттенуированный вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS), или аттенуированную живую бактерию.
46. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 34 - 45, где иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ на патоген, из которого
- 20   имеет происхождение аминокислотная последовательность рекомбинантного белка, предпочтительно на PCV2, после введения одной дозы иммуногенной композиции.
47. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 45 или 46, где иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ на PRRS
- 25   вирус после введения одной дозы иммуногенной композиции.
48. Набор, включающий контейнер, содержащий иммуногенную композицию по одному из пунктов 34 - 47.
49. Набор, включающий контейнер, содержащий иммуногенную композицию, получаемую с помощью способа в соответствии с одним из пунктов 1 - 33.
- 30   50. Набор в соответствии с воплощением 48 или 49, который дополнительно включает по меньшей мере один дополнительный контейнер, содержащий по меньшей мере один дополнительный антиген, выбранный из группы, включающей аттенуированный живой вирус, предпочтительно аттенуированный PRRS вирус, и аттенуированную живую бактерию.

51. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 34 - 50 и/или набор по одному из пунктов 48 - 50, которая (ый) дополнительно включает один или несколько аттенуированных или инактивированных не-PRRSV патогенов или их антигенный материал.
- 5 52. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 34 - 47 и 51 и/или набор по одному из пунктов 48 - 50 для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве вакцины.
53. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 34 - 47 и 51 - 52 и/или набор по одному из пунктов 48 - 52, для применения в способе
- 10 - индуцирования защитного иммунного ответа на по меньшей мере один патоген и/или
- уменьшения одного или нескольких клинических симптомов инфицирования по меньшей мере одним патогеном
- у животного, где по меньшей мере один патоген предпочтительно выбирают
- 15 из группы, включающей PCV2, PRRSV, не-PRRSV патогены, и их комбинации.
54. Иммуногенная композиция и/или набор в соответствии с воплощением 51, в особенности для применения в соответствии с воплощением 52 или 53, где указанные не-PRRSV патогены выбираю из группы, включающей
- 20 *Mycoplasma hyopneumoniae*, вирус псевдобешенства, вирус свиного гриппа, свиной парвовирус, вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* и *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
- 25 55. Способ получения иммуногенной композиции, включающей рекомбинантный белок, где способ включает стадии:
- (а) обеспечение смеси, содержащей
- первую жидкость, и
- рекомбинантный PCV2 ORF2 белок и/или вирусоподобные частицы,
- 30 содержащие множество рекомбинантного PCV2 ORF2 белка,
- (б) образование раствора объемного потока путем концентрирования рекомбинантного PCV2 ORF2 белка и/или указанных вирусоподобных частиц в смеси, полученной на стадии (а), путем удаления части первой жидкости из смеси, и

(в) образование рабочего раствора путем обработки раствора объемного потока, полученного на стадии (б), путем непрерывной диафильтрации.

56. Способ согласно воплощению 55, где смесь со стадии (а) дополнительно содержит или дополнительно включает

5 - вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный PCV2 ORF2 белок, где указанный вектор был инактивирован инактивирующим агентом, и/или

- инактивирующий агент, который был нейтрализован нейтрализующим агентом, и/или

10 - нейтрализующий агент,

и/или где на стадии (в) раствор объемного потока, полученный на стадии (б), обрабатывают путем непрерывной диафильтрации таким образом, что концентрация нейтрализованного инактивирующего агента и/или концентрация нейтрализующего агента снижена в обрабатываемом растворе.

15 57. Способ согласно воплощению 55 или 56, где способ включает стадии:

(а)(I) обеспечение смеси, содержащей

- первую жидкость,

- рекомбинантный PCV2 ORF2 белок и/или вирусоподобные частицы, содержащие множество рекомбинантного PCV2 ORF2 белка, и

20 - вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный белок;

(II) инактивирование вектора путем добавления инактивирующего агента к смеси со стадии (I);

25 (III) нейтрализацию инактивирующего агента путем добавления нейтрализующего агента к смеси, полученной на стадии (II);

(б) образование раствора объемного потока путем концентрирования рекомбинантного PCV2 ORF2 белка и/или указанных вирусоподобных частиц в смеси, полученной на стадии (а)(III), путем удаления части первой жидкости из смеси, и

30 (в) образование рабочего раствора путем обработки раствора объемного потока, полученного на стадии (б), путем непрерывной диафильтрации таким образом, что

концентрация нейтрализованного инактивирующего агента и/или  
концентрация нейтрализующего агента снижена в обрабатываемом  
растворе.

58. Способ согласно одному из воплощений 55 - 57, где на стадии (б) удаление  
5 части первой жидкости из указанной смеси состоит из или включает  
фильтрование указанной смеси с по меньшей мере одним фильтром, где  
указанный по меньшей мере один фильтр предпочтительно включает  
фильтровальную мембрану.

59. Способ согласно одному из воплощений 55 - 58, где смесь со стадии (а)  
10 концентрируют путем:

- образование фильтрата путем подачи смеси в фильтрующую систему,  
содержащую по меньшей мере один фильтр, где по меньшей мере один  
фильтр включает фильтровальную мембрану, имеющую размер пор  
мембраны, позволяющий нейтрализованному инактивирующему агенту  
15 и/или нейтрализующему агенту проходить через нее, при этом удерживая  
рекомбинантный PCV2 ORF2 белок и/или указанные вирусоподобные  
частицы в растворе объемного потока,
- где фильтрат, включающий нейтрализованный инактивирующий агент  
и/или нейтрализующий агент,

20 - удаление фильтрата,  
и/или где указанная непрерывная диафильтрация со стадии (в) включает:

- образование фильтрата путем подачи раствора объемного потока со  
стадии (б) в фильтрующую систему, содержащую по меньшей мере один  
фильтр, где по меньшей мере один фильтр включает фильтровальную  
25 мембрану, имеющую размер пор мембраны, позволяющий  
нейтрализованному инактивирующему агенту и/или нейтрализующему  
агенту проходить через нее, при этом удерживая рекомбинантный PCV2  
ORF2 белок и/или указанные вирусоподобные частицы в растворе  
объемного потока,
- где фильтрат, включающий нейтрализованный инактивирующий агент  
и/или нейтрализующий агент,
- удаление фильтрата, и
- добавление второй жидкости к раствору объемного потока со скоростью,  
равной скорости удаления фильтрата,

где вторая жидкость отличается от первой жидкости.

60. Способ согласно воплощению 58 или 59, где по меньшей мере один фильтр представляет собой по меньшей мере один плоский слоистый фильтр и/или по меньшей мере один волоконный фильтр, и где по меньшей мере один плоский слоистый фильтр представляет собой предпочтительно по меньшей мере один кассетный фильтр,

и/или где по меньшей мере один фильтр представляет собой 2-8 фильтров, предпочтительно 5-7 фильтров,

и/или где каждый из по меньшей мере одного фильтра имеет общую площадь фильтрующего материала приблизительно 16-26 м<sup>2</sup>, предпочтительно приблизительно 20-22 м<sup>2</sup>,

и/или где фильтровальная мембрана имеет средний размер пор, который меньше, чем рекомбинантный PCV2 ORF2 белок и/или указанные вирусоподобные частицы, и/или где фильтровальная мембрана имеет отсечение по молекулярной массе в диапазоне от приблизительно 200 кДа до приблизительно 500 кДа,

и/или где фильтровальная мембрана состоит из или включает материал, выбранный из группы, включающей полиэфирсульфон, гидрат целлюлозы, регенерированную целлюлозу, стабилизированную целлюлозу, поперечно сшитую целлюлозу, поперечно сшитый гидрат целлюлозы, ацетат целлюлозы, полиамид, полиуретан, полипропилен, полисульфон, поликарбонат, нейлон, полиимид, и их комбинации,

и/или где фильтровальная мембрана предпочтительно состоит из или включает полиэфирсульфон, или где фильтровальная мембрана необязательно представляет собой мембрану на основе стабилизированной целлюлозы.

61. Способ согласно воплощению 59 или 60, где используют одинаковую фильтрующую систему на стадии (б) и на стадии (в).

62. Способ согласно одному из воплощений 57 - 61, где

- стадию (III) осуществляют в первом контейнере, и где смесь со стадии (а), полученную при нейтрализации инактивирующего агента, переносят из первого контейнера во второй контейнер, соединенный с фильтрующей системой, и где после переноса смеси со стадии (а) из первого во второй

контейнер, клапан между первым контейнером и вторым контейнером закрывают, и пустой первый контейнер заполняют второй жидкостью,

- на стадии (б) смесь со стадии (а) циркулирует через второй контейнер и фильтрующую систему до тех пор, пока концентрируют смесь со стадии (а), образуя, таким образом, раствор объемного потока со стадии (б); и
- на стадии (в) клапан между первым и вторым контейнером открывают и вторая жидкость непрерывно выходит из первого контейнера во второй контейнер, в то время как раствор объемного потока циркулирует через фильтрующую систему и второй контейнер до тех пор, пока не образуется рабочий раствор.

63. Способ согласно одному из воплощений 55 - 62, где указанная первая жидкость включает часть среды для культивирования клеток или состоит из среды для культивирования клеток, и где среда для культивирования клеток предпочтительно представляет собой среду для культивирования клеток насекомых,

и/или где смесь полученной на стадии (а) имеет объем, где объем смеси составляет от 1000 л до 10000 л, предпочтительно от 2000 л до 8000 л, и наиболее предпочтительно от 3000 л до 5000 л,

и/или где на стадии (б) смесь со стадии (а) концентрируют в раствор объемного потока, до тех пор, пока рекомбинантный PCV2 ORF2 белок и/или вирусоподобные частицы раствор объемного потока не составляют по меньшей мере 5X, предпочтительно по меньшей мере 8X, более предпочтительно 9X - 11X концентрированными, по сравнению с концентрацией рекомбинантного PCV2 ORF2 белка и/или вирусоподобные частицы в объеме смеси, полученной на стадии (а).

64. Способ согласно одному из воплощений 59 - 63, где вторая жидкость представляет собой буферный раствор, предпочтительно Ф-раствор или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS),

и/или где на стадии (в) общий объем второй жидкости, добавленной к раствору объемного потока, составляет по меньшей мере 5X, предпочтительно по меньшей мере 7X, более предпочтительно по меньшей мере 9X, объема раствора объемного потока полученной на стадии (б), и/или где общий объем второй жидкости, добавленной к раствору объемного

потока, составляет наиболее предпочтительно приблизительно объем смеси, полученной на стадии (а), которую концентрировали.

65. Способ согласно одному из воплощений 55 - 64, где указанный способ дополнительно включает стадию

5 (г) образование раствора D путем смешивания рабочего раствора, оставшегося после стадии (в), с дополнительным компонентом, выбранным из группы, включающей фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, разбавители, наполнители, и их комбинации, и где  
10 концентрация рекомбинантного PCV2 ORF2 белка и/или концентрация указанных вирусоподобных частиц в растворе D, полученном в результате указанного смешивания, предпочтительно составляет приблизительно концентрацию PCV2 ORF2 рекомбинантного белка и/или указанных вирусоподобных частиц в смеси, полученной на стадии (а).

15 66. Способ согласно одному из воплощений 55 - 65, где указанный рекомбинантный PCV2 ORF2 белок включает или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по  
20 меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,5%, или 100% идентичность последовательностей с последовательностью из SEQ ID NO:1 и/или SEQ ID NO:2.

25 67. Способ согласно одному из воплощений 56 - 66, где вектор представляет собой рекомбинантный вирус, предпочтительно бакуловирус, и/или где последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК последовательность,  
и/или где инактивирующий агент представляет собой азиридиновое соединение, предпочтительно бинарный этиленимин (BEI), и/или где  
30 инактивирующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к вектору,  
и/или где нейтрализующий агент представляет собой тиосульфат натрия и/или где нейтрализующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к инактивирующему агенту.

68. Способ по одному из пунктов 55 - 67, где иммуногенная композиция в растворе D имеет вирулицидную активность, и вирулицидная активность иммуногенной композиции, полученной в результате осуществления указанного способа, уменьшена на по меньшей мере 20% по сравнению с иммуногенной композицией, не получаемой путем концентрирования со стадии (б) и непрерывной диафильтрации со стадии (в) указанного способа, и/или где иммуногенная композиция, полученная с помощью указанного способа, вызывает потерю менее чем 1 log TCID<sub>50</sub> на мл живого вируса, предпочтительно менее чем 0,7 log TCID<sub>50</sub> на мл живого вируса, когда живой вирус смешан с иммуногенной композицией в течение четырех или больше часов.
69. Способ согласно воплощению 68, где живой вирус смешивают с иммуногенной композицией в течение четырех или больше часов при комнатной температуре.
70. Способ по одному из пунктов 55 - 69, где способ дополнительно включает стадию комбинирование обрабатываемого раствора, оставшегося после стадии (в), и/или раствора D, оставшегося после стадии (г), с по меньшей мере одним дополнительным антигеном, и/или где по меньшей мере один дополнительный антиген представляет собой предпочтительно вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).
71. Иммуногенная композиция, получаемая с помощью способа по одному из пунктов 55 - 70.
72. Иммуногенная композиция согласно воплощению 71, включающий
- рекомбинантный PCV2 ORF2 белок, предпочтительно включающий или состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,5%, или 100% идентичность последовательностей с последовательностью из SEQ ID NO:1 и/или SEQ ID NO:2, и
  - 1-10 мкМ L-Аргинина и/или 1-10 мкМ L-Лизина

и где предпочтительно иммуногенная композиция по существу не содержит нейтрализованного инактивирующего агента и/или по существу не содержит нейтрализующего агента.

5 73. Иммуногенная композиция в соответствии с воплощением 71 или 72, где иммуногенная композиция дополнительно включает аттенуированный живой вирус, предпочтительно аттенуированный вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS), или аттенуированную живую бактерию, и/или где иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ на PCV2, после введения одной дозы иммуногенной композиции,  
10 и/или где иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ на PRRS вирус после введения одной дозы иммуногенной композиции.

74. Набор, включающий контейнер, содержащий иммуногенную композицию по одному из пунктов 71 - 73, и где набор предпочтительно  
15 включает по меньшей мере один дополнительный контейнер, содержащий по меньшей мере один дополнительный антиген, выбранный из группы, включающей аттенуированный живой вирус, предпочтительно аттенуированный PRRS вирус, и аттенуированную живую бактерию.

75. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 71 - 73 и/или набор в соответствии с воплощением 74 для применения в качестве лекарственного  
20 средства, предпочтительно в качестве вакцины.

76. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 71 - 73 и 75 и/или набор в соответствии с воплощением 74 или 75, для применения в способе  
- индуцирования защитного иммунного ответа на по меньшей мере один патоген и/или  
25 - уменьшения одного или нескольких клинических симптомов инфицирования по меньшей мере одним патогеном у животного, где по меньшей мере один патоген предпочтительно выбирают из группы, включающей PCV2, PRRSV, не-PRRSV патогены, и их комбинации.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения иммуногенной композиции, включающей рекомбинантный белок, где способ включает стадии:
- 5 (а) обеспечение смеси, содержащей
- первую жидкость, и
  - рекомбинантный PCV2 ORF2 белок и/или вирусоподобные частицы, содержащие множество рекомбинантного PCV2 ORF2 белка,
- 10 (б) концентрирование рекомбинантного PCV2 ORF2 белка и/или указанных вирусоподобных частиц в смеси, полученной на стадии (а), путем удаления части первой жидкости из смеси, и
- (в) обработку раствора, полученного на стадии (б), путем непрерывной диафильтрации.
- 15 2. Способ по пункту 1, где смесь со стадии (а) дополнительно содержит или дополнительно включает
- вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный PCV2 ORF2 белок, где указанный вектор был инактивирован инактивирующим агентом, и/или
- 20 - инактивирующий агент, который был нейтрализован нейтрализующим агентом, и/или
- нейтрализующий агент,
- и/или где на стадии (в) раствор, полученный на стадии (б), обрабатывают путем непрерывной диафильтрации таким образом, что концентрация
- 25 нейтрализованного инактивирующего агента и/или концентрация нейтрализующего агента снижена в обрабатываемом растворе.
3. Способ получения иммуногенной композиции, включающей рекомбинантный PCV2 ORF2 белок, в особенности способ по пункту 2, где
- 30 способ включает стадии:
- (а)(I) обеспечение смеси, содержащей
- первую жидкость,
  - рекомбинантный PCV2 ORF2 белок и/или вирусоподобные частицы, содержащие множество рекомбинантного PCV2 ORF2 белка, и

- вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный рекомбинантный белок;

(II) инаktivирование вектора путем добавления инаktivирующего агента к смеси со стадии (I);

5 (III) нейтрализацию инаktivирующего агента путем добавления нейтрализующего агента к смеси, полученной на стадии (II);

(б) концентрирование рекомбинантного PCV2 ORF2 белка и/или указанных вирусоподобных частиц в смеси, полученной на стадии (а)(III), путем удаления части первой жидкости из смеси, и

10 (в) обработку раствора, полученного на стадии (б), путем непрерывной диафильтрации таким образом, что концентрация нейтрализованного инаktivирующего агента и/или концентрация нейтрализующего агента снижена в обрабатываемом растворе.

15 4. Способ по одному из пунктов 1 - 3, где на стадии (б) удаление части первой жидкости из указанной смеси состоит из или включает фильтрование указанной смеси с по меньшей мере одним фильтром, где указанный по меньшей мере один фильтр предпочтительно включает фильтровальную мембрану.

20 5. Способ по одному из пунктов 2 - 4, где на стадии (б) указанное концентрирование включает

- подачу смеси в фильтрующую систему, содержащую по меньшей мере один фильтр, где по меньшей мере один фильтр включает  
25 фильтровальную мембрану, имеющую размер пор мембраны, позволяющий нейтрализованному инаktivирующему агенту и/или нейтрализующему агенту проходить через нее, при этом удерживая рекомбинантный PCV2 ORF2 белок и/или указанные вирусоподобные частицы в объемном потоке,

30 - удаление фильтрата, включающего нейтрализованный инаktivирующий агент и/или нейтрализующий агент,

и/или где на стадии (в) указанная непрерывная диафильтрация включает

- подачу раствора в фильтрующую систему, содержащую по меньшей мере один фильтр, где по меньшей мере один фильтр включает

фильтровальную мембрану, имеющую размер пор мембраны, позволяющий нейтрализованному инактивирующему агенту и/или нейтрализующему агенту проходить через нее, при этом удерживая рекомбинантный PCV2 ORF2 белок и/или указанные вирусоподобные частицы в объемном потоке,

- удаление фильтрата, включающего нейтрализованный инактивирующий агент и/или нейтрализующий агент,
- добавление второй жидкости к объемному потоку со скоростью, равной потоку фильтрата, где вторая жидкость отличается от первой жидкости.

6. Способ по пункту 4 или 5, где по меньшей мере один фильтр представляет собой по меньшей мере один плоский слоистый фильтр и/или по меньшей мере один половолоконный фильтр, и где по меньшей мере один плоский слоистый фильтр представляет собой предпочтительно по меньшей мере один кассетный фильтр,

и/или где по меньшей мере один фильтр представляет собой 2-8 фильтров, предпочтительно 5-7 фильтров,

и/или где каждый из по меньшей мере одного фильтра имеет общую площадь фильтрующего материала приблизительно 16-26 м<sup>2</sup>, предпочтительно приблизительно 20-22 м<sup>2</sup>,

и/или где фильтровальная мембрана имеет средний размер пор, который меньше, чем рекомбинантный PCV2 ORF2 белок и/или указанные вирусоподобные частицы, и/или где фильтровальная мембрана имеет отсечение по молекулярной массе в диапазоне от приблизительно 200 кДа до приблизительно 500 кДа,

и/или где фильтровальная мембрана состоит из или включает материал, выбранный из группы, включающей полиэфирсульфон, гидрат целлюлозы, регенерированную целлюлозу, стабилизированную целлюлозу, поперечно сшитую целлюлозу, поперечно сшитый гидрат целлюлозы, ацетат целлюлозы, полиамид, полиуретан, полипропилен, полисульфон, поликарбонат, нейлон, полиимид, и их комбинации,

и/или где фильтровальная мембрана предпочтительно состоит из или включает полиэфирсульфон, или где фильтровальная мембрана

необязательно представляет собой мембрану на основе стабилизированной целлюлозы.

7. Способ по пункту 5 или 6, где на стадии (б) и на стадии (в) используют  
5 одинаковую фильтрующую систему.

8. Способ по одному из пунктов 3 - 7, где

- стадию (III) осуществляют в первом контейнере, и где смесь, полученную  
при нейтрализации инактивирующего агента, переносят из первого  
10 контейнера во второй контейнер, соединенный с фильтрующей системой,  
и где после переноса смеси из первого во второй контейнер клапан между  
первым контейнером и вторым контейнером закрывают, и пустой первый  
контейнер заполняют второй жидкостью,

- на стадии (б) смесь циркулирует через второй контейнер и фильтрующую  
15 систему до завершения концентрирования, и

- на стадии (в) клапан между первым и вторым контейнером открывают и  
вторая жидкость непрерывно выходит из первого контейнера во второй  
контейнер, в то время как смесь циркулирует через фильтрующую систему  
и второй контейнер.

9. Способ по одному из пунктов 1 - 8, где указанная первая жидкость включает  
часть среды для культивирования клеток или состоит из среды для  
культивирования клеток, и где среда для культивирования клеток  
предпочтительно представляет собой среду для культивирования клеток  
насекомых,  
25

и/или где объем смеси, полученной на стадии (а), составляет от 1000 л до  
10000 л, предпочтительно от 2000 л до 8000 л, и наиболее предпочтительно  
от 3000 л до 5000 л,

и/или где на стадии (б) указанный рекомбинантный PCV2 ORF2 белок и/или  
указанные вирусоподобные частицы в конечном итоге концентрированы по  
30 меньшей мере 5X, предпочтительно по меньшей мере 8X, более  
предпочтительно 9X - 11X, по сравнению с объемом смеси, полученной на  
стадии (а).

10. Способ по одному из пунктов 5 - 9, где вторая жидкость представляет собой буферный раствор, предпочтительно Ф-раствор или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS),

и/или где на стадии (в) общий объем второй жидкости, добавляемый к  
5 объемному потоку, составляет по меньшей мере 5X, предпочтительно по меньшей мере 7X, более предпочтительно по меньшей мере 9X, объема раствора, полученного на стадии (б), и/или где общий объем второй жидкости, добавляемый к объемному потоку, составляет наиболее предпочтительно приблизительно объем смеси, полученной на стадии (а).

10

11. Способ по одному из пунктов 1 - 10, где указанный способ дополнительно включает стадию

(г) смешивание смеси, оставшейся после стадии (в), с дополнительным компонентом, выбранным из группы, включающей фармацевтически  
15 приемлемые носители, адъюванты, разбавители, наполнители, и их комбинации, и где концентрация рекомбинантного PCV2 ORF2 белка и/или концентрация указанных вирусоподобных частиц в растворе, полученном из указанного смешивания, предпочтительно составляет приблизительно концентрацию PCV2 ORF2 рекомбинантного белка  
20 и/или указанных вирусоподобных частиц в смеси, полученной на стадии (а).

20

12. Способ по одному из пунктов 1 - 11, где указанный рекомбинантный PCV2 ORF2 белок включает или состоит из последовательности, имеющей по  
25 меньшей мере по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,5%, или 100% идентичность последовательностей с последовательностью из SEQ ID NO:1 и/или SEQ ID NO:2.

30

13. Способ по одному из пунктов 2 - 12, где вектор представляет собой рекомбинантный вирус, предпочтительно бакуловир, и/или где

последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК последовательность,

и/или где инактивирующий агент представляет собой азиридиновое соединение, предпочтительно бинарный этиленимин (BEI), и/или где

5 инактивирующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к вектору,

и/или где нейтрализующий агент представляет собой тиосульфат натрия

и/или где нейтрализующий агент добавляют в молярном избытке по отношению к инактивирующему агенту.

10

14. Способ по одному из пунктов 1 - 13, где вирулицидная активность иммуногенной композиции, полученной в результате осуществления указанного способа, уменьшена на по меньшей мере 20% по сравнению со смесью иммуногенной композиции, которая не подвергалась  
15 концентрированию на стадии (б) и непрерывной диафильтрации на стадии (в) указанного способа, и/или где иммуногенная композиция, полученная с помощью указанного способа, вызывает потерю менее чем 1 log TCID<sub>50</sub> на мл живого вируса, предпочтительно менее чем 0,7 log TCID<sub>50</sub> на мл живого вируса, когда живой вирус смешан с иммуногенной композицией в течение  
20 четырех или больше часов, в особенности при комнатной температуре.

15. Способ по одному из пунктов 1 - 14, где способ дополнительно включает стадию комбинирования смеси, оставшейся после стадии (в) и/или стадии (г), с по меньшей мере одним дополнительным антигеном,

25 и/или где по меньшей мере один дополнительный антиген представляет собой предпочтительно вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS).

16. Иммуногенная композиция, получаемая способом по одному из пунктов 1 -  
30 15.

17. Иммуногенная композиция, в особенности иммуногенная композиция по пункту 16, включающая

- рекомбинантный PCV2 ORF2 белок, предпочтительно включающий или состоящей из последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,1%, по меньшей мере 99,5%, или 100% идентичность последовательностей с последовательностью из SEQ ID NO:1 и/или SEQ ID NO:2, и
- 1-10 мкМ L-Аргинина и/или 1-10 мкМ L-Лизина

и где предпочтительно иммуногенная композиция по существу не содержит нейтрализованного инактивирующего агента и/или по существу не содержит нейтрализующего агента.

18. Иммуногенная композиция по пункту 16 или 17, где иммуногенная композиция дополнительно включает аттенуированный живой вирус, предпочтительно аттенуированный вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRS), или аттенуированную живую бактерию, и/или где иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ на PCV2, после введения одной дозы иммуногенной композиции,
- и/или где иммуногенная композиция индуцирует защитный иммунный ответ на PRRS вирус после введения одной дозы иммуногенной композиции.

19. Набор, включающий контейнер, содержащий иммуногенную композицию по одному из пунктов 16 - 18, и где набор предпочтительно включает по меньшей мере один дополнительный контейнер, содержащий по меньшей мере один дополнительный антиген, выбранный из группы, включающей аттенуированный живой вирус, предпочтительно аттенуированный PRRS вирус, и аттенуированную живую бактерию.

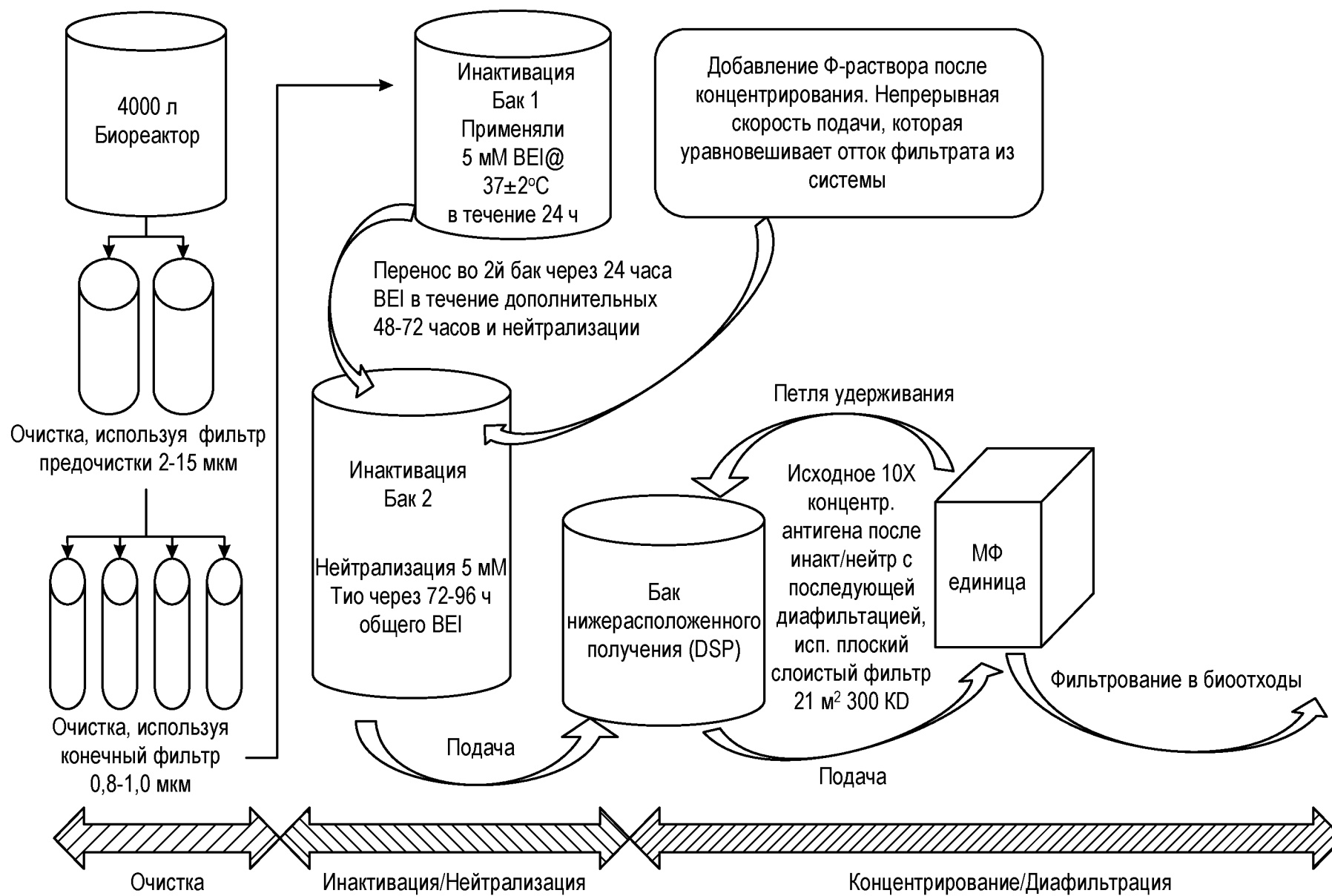
20. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 16 - 18 и/или набор по пункту 19 для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве вакцины.

21. Иммуногенная композиция по одному из пунктов 16 - 18 и 20 и/или набор по пункту 19 или 20, для применения в способе

- индуцирования защитного иммунного ответа на по меньшей мере один патоген и/или

5 - уменьшения одного или нескольких клинических симптомов инфицирования по меньшей мере одним патогеном

у животного, где по меньшей мере один патоген предпочтительно выбирают из группы, включающей PCV2, PRRSV, не-PRRSV патогены, и их комбинации.



Фиг. 1