

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11)

014062

(13)

B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: **2010.08.30**

(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

(21) Номер заявки: **200801221**

(22) Дата подачи: **2006.11.01**

**(54) ВИРУСНЫЕ ВАКЦИНЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ КЛЕТОК С НИЗКИМИ УРОВНЯМИ ОС-
ТАТОЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ДНК**

(31) **60/732,786**

(32) **2005.11.01**

(33) **US**

(43) **2008.10.30**

(86) **PCT/IB2006/003880**

(87) **WO 2007/052163 2007.05.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**НОВАРТИС ВЭКСИНС ЭНД ДИАГНО-
СТИКС ГМБХ & КО КГ (DE)**

(72) Изобретатель:

Грегерсен Йенс-Петер, Кост Хольгер (DE)

(74) Представитель:

Квашнин В.П., Сапельников Д.А. (RU)

(56) MORGEAUX S. ET AL.: "Beta-
propiolactone treatment impairs the biological
activity of residual DNA from BHK-21 cells
infected with rabies viru", VACCINE 1993, vol.
11, no. 1, 1993, pages 82-90, XP009083360, ISSN:
0264-410X, abstract, pages 88-90

EP-A1-0870508

FRAZZATTI-GALLINA N. M. ET AL.:
"Vero-cell rabies vaccine produced using serum-
free medium", VACCINE, BUTTERWORTH
SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 23, no. 4, 9
December 2004 (2004-12-09), pages 511-517,
XP004629187, ISSN: 0264-410X, abstract, pg. 515
WO-A-03/023025

WO-A-97/37000

WO-A-2006/027698

KALBFUSS BERND ET AL.: "Harvesting
and concentration of human influenza A virus
produced in serum-free mammalian cell culture for
the production of vaccines." BIOTECHNOLOGY
AND BIOENGINEERING, 1 MAY 2007, vol. 97,
no. 1, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 73-85,
XP009083376, ISSN: 0006-3592, publishd online,
18 August 2006, page 84; figure 1

PERRIN P. ET AL.: "Inactivation of DNA by
beta-propiolactone", BIOLOGICALS : JOURNAL
OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF
BIOLOGICAL STANDARDIZATION SEP 1995,
vol. 23, no. 3, September 1995 (1995-09), pages
207-211, XP009083359, ISSN: 1045-1056, the
whole document

LALOSEVIC D. ET AL.: "Immunogenicity
of BHK-rabies vaccine in human volunteers",
MEDICINSKI PREGLED, 1998, vol. 51 Suppl 1,
1998, pages 17-19, XP009083366, ISSN: 0025-
8105, the whole document

WEZEL VAN A. L. ET AL.: "DETECTION
AND ELIMINATION OF CELLULAR NUCLEIC
ACIDS IN BIOLOGICALS PRODUCED ON
CONTINUOUS CELL LINES", DEVE-
LOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDAR-
DIZATION, KARGER, BASEL, CH, vol. 50,
1981, pages 59-69, XP001105736, ISSN: 0301-
5149, abstract

WO-A-02/28422

(57) Настоящее изобретение относится к вакцинам для лечения или предотвращения вирусных ин-
фекций. Кроме того, предложены способы снижения количества загрязняющих веществ, связан-
ных с получением вакцин клеточных культур. Остаточную функциональную ДНК клеточных
культур разрушают обработкой ДНК-алкилирующим агентом, таким как β -пропиолактон (БПЛ),
тем самым способствуя получению вакцины, включающей иммуногенные белки, полученные из
вируса, размноженного на клеточной культуре, по существу, свободной от остаточной функцио-
нальной ДНК клеточной культуры.

014062

B1

B1

014062

Все документы и информация в режиме онлайн, указанные здесь, полностью приведены в качестве ссылки.

Область техники изобретения

Изобретение обеспечивает улучшенные продукты клеточной культуры и способы с пониженным выходом посторонних примесей. В частности, изобретение обеспечивает улучшенный способ разрушения любой остаточной функциональной ДНК клеточной культуры, остающейся связанной с образованным продуктом клеточной культуры. Согласно изобретению, функциональная ДНК клеточной культуры разлагается обработкой ДНК-алкилирующим агентом, таким как β -пропиолактон (БПЛ). Этот способ может быть использован для обработки ряда продуктов клеточных культур, включая вакцины и рекомбинантные белки.

Предпосылки создания изобретения

Промышленное производство вирусных вакцин обычно требует больших количеств вируса в качестве источника антигена. Промышленные количества вируса для производства вакцин могут быть достигнуты с помощью культивирования и репликации исходного вируса в системе клеточной культуры. Системы клеточной культуры, подходящие для вирусной репликации, включают клетки млекопитающих, птиц или насекомых, но системы культур клеток млекопитающих являются особенно предпочтительными для вирусных вакцин для обеспечения правильного гликозилирования и сворачивания белков вирусных антигенов. По тем же причинам, системы культур клеток млекопитающих являются также предпочтительными для экспрессии рекомбинантных белков.

Если клеточные культуры немодифицированы и сохранены их естественные свойства, то они обладают ограниченной способностью воспроизведения и, следовательно, являются непрактичными и неэффективными для получения количества материала, необходимого для промышленной вакцины или рекомбинантного белка. Следовательно, для производственных целей, является предпочтительным, чтобы клетки были модифицированными и представляли собой "непрерывные" или "бессмертные" клеточные линии для увеличения числа делений. Многие из этих модификаций включают механизмы, сходные с механизмами, которые связаны с онкогенными клетками. Собственно, существует задача, чтобы любые остаточные материалы способа в клеточной культуре, такие как ДНК клетки-хозяина, были удалены из конечного состава вакцины или продукта рекомбинантного белка, полученного в этих системах.

Стандартным способом удаления остаточной ДНК клетки-хозяина является обработка ДНКазой. Подходящий способ этого типа раскрыт в европейском патенте 0870508 и патенте США 5948410, включающий двухстадийную обработку, сначала с использованием ДНКазы (например, бензоназы) и затем катионного детергента (например, ЦТАБ).

Современные попытки снизить этот риск были сосредоточены на уменьшении общей концентрации остаточной ДНК клетки-хозяина. Целью настоящего изобретения является уменьшение риска в дальнейшем путем удаления функциональности любой остающейся ДНК клетки-хозяина.

Сущность изобретения

Изобретение представляет собой улучшенные продукты клеточной культуры и способы с пониженным выходом посторонних примесей. В частности, изобретение представляет собой улучшенный способ разрушения любой остаточной функциональной ДНК клеточной культуры, остающейся связанной с полученным продуктом клеточной культуры. Согласно изобретению функциональная ДНК клеточной культуры разлагается обработкой ДНК-алкилирующим агентом, таким как β -пропиолактон (БПЛ). Этот процесс может быть использован для обработки ряда продуктов клеточных культур, включая вакцины и рекомбинантные белки.

Изобретение включает вакцину, содержащую иммуногенные белки, полученные из вируса, размноженного на клеточной культуре, по существу свободной от остаточной функциональной ДНК клеточной культуры. Кроме того, изобретение относится к рекомбинантным белкам, экспрессирующимся в клеточной культуре, где конечный состав из рекомбинантных белков по существу свободен от остаточной функциональной ДНК клеточной культуры.

Проявление функциональных характеристик любой остаточной ДНК клетки-хозяина может быть удалено с помощью обработки ДНК алкилирующим агентом, который расщепляет ДНК на части, достаточно малые для того, чтобы кодировать функциональный белок, и переноситься в хромосому человека-реципиента, или иначе распознаваться механизмом репликации ДНК реципиента. Предпочтительно, длина разрушаемой остаточной ДНК клеточной культуры составляет менее 500 пар оснований. Более предпочтительно, длина разрушаемой остаточной ДНК клеточной культуры составляет менее 200 пар оснований.

Подробное описание изобретения

Изобретение представляет собой улучшенные продукты клеточной культуры и способы с пониженным выходом посторонних примесей. В частности, изобретение представляет собой улучшенный способ разрушения любой остаточной функциональной ДНК клеточной культуры, остающейся связанной с полученным продуктом клеточной культуры. Согласно изобретению, функциональная ДНК клеточной культуры разлагается обработкой ДНК-алкилирующим агентом, таким как β -пропиолактон (БПЛ). Этот

процесс может быть использован для обработки ряда продуктов клеточных культур, включая вакцины и рекомбинантные белки.

Изобретение включает вакцину, содержащую иммуногенные белки, полученные из вируса, размноженного на клеточной культуре, по существу, свободной от остаточной функциональной ДНК клеточной культуры. Кроме того, изобретение относится к рекомбинантным белкам, экспрессирующимся в клеточной культуре, где конечный состав из рекомбинантных белков по существу свободен от остаточной функциональной ДНК клеточной культуры.

Проявление функциональных характеристик любой остаточной ДНК клетки-хозяина может быть удалена с помощью обработки ДНК алкилирующим агентом, который расщепляет ДНК на части, достаточно малые для того, чтобы кодировать функциональный белок, и переноситься в хромосому человека-реципиента, или иначе распознаваться механизмом репликации ДНК реципиента. Длина разрушаемой (нефункциональной) остаточной ДНК клеточной культуры составляет предпочтительно менее чем 1000 пар оснований (например, менее чем 1000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 или 50 пар оснований). Предпочтительно длина разрушаемой остаточной ДНК клеточной культуры составляет менее чем 500 пар оснований. Более предпочтительно, длина разрушаемой остаточной ДНК клеточной культуры составляет менее чем 200 пар оснований.

Как используется здесь, ссылка на "функциональную ДНК" или "функциональную РНК" показывает нуклеотидную последовательность, которая может быть переведена в функциональный белок или перемещена в хромосому млекопитающего. В общем, для нуклеотидных последовательностей, которые могут быть переведены в функциональный белок, требуются промотерные области, иницирующие кодоны, стоп-кодона и внутренние кодирующие последовательности для функциональных белков. Когда происходит повреждение ДНК, как в случае добавления алкилирующего агента, многие из этих областей изменяются или разрушаются, так что трансляция может продолжаться далее или продолжается только для образования субъединицы олигопептида предполагаемого белка.

"Разрушаемая остаточная функциональная ДНК клеточной культуры" относится к функциональной ДНК, которая не может быть транслирована в функциональный белок или перемещена в хромосому млекопитающего. Предпочтительно "разрушаемая остаточная функциональная ДНК" имеет длину менее, чем 1000 пар оснований, более предпочтительно менее чем 500 пар оснований, и даже более предпочтительно менее чем 250 пар оснований, и наиболее предпочтительно менее чем 100 пар оснований. Длина разрушаемой остаточной функциональной ДНК может быть определена стандартными методами, включая гель-электрофорез.

Изобретение представляет собой композиции вакцин и смеси рекомбинантных белков, которые по существу свободны от остаточной функциональной ДНК клеточной культуры. Как используется здесь, понятие, по существу, свободные от остаточной функциональной ДНК клеточной культуры - относится к композиции или смеси, где фрагменты остаточной ДНК длиной менее чем 200 пар оснований, и определяется при менее чем 10 нг на 0.5 мл. Размер любой остаточной ДНК клеточной культуры может быть измерен стандартными методами, включая капиллярный гель-электрофорез и технологию амплификации нуклеиновых кислот.

Использование алкилирующего агента, такого как БПЛ, в изобретении обеспечивает дополнительное преимущество в уменьшении агрегации и загрязнений. Составы вакцин с пониженными агрегатами также могут улучшить иммуногенность. Иммуногенность вакцины зависит от специфичности антител к определенным вирусным эпитомам. Если поверхность белка связана или покрыта нежелательными молекулами или спрятана в процессе агрегации в большие макромолекулы, эпитопы могут стать менее распознаваемыми и, таким образом, менее эффективными в вакцине. Вдобавок, составы вакцин с уменьшенными агрегатами могут иметь дополнительные преимущества в способах. Способы очищения зависят от выделения предполагаемого белка, например, гемагглютинаина и нейраминидазы в вакцине против гриппа. Если белок структурно модифицирован присутствием агрегатов или является поперечносшитым, то он может быть не распознан и, следовательно, удален в процессе колоночной хроматографии, фильтрации или центрифугирования.

Алкилирующие агенты

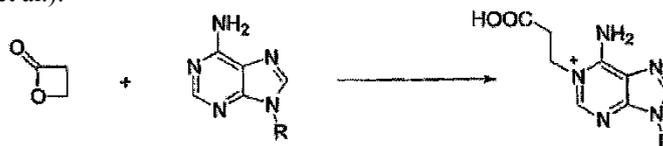
Алкилирующие агенты для использования в настоящем изобретении включают вещества, которые вводят алкильный радикал в соединение. Предпочтительно, алкилирующий агент является моноалкилирующим агентом, таким как БПЛ. БПЛ представляет собой моноалкилирующий агент, широко используемый для инактивации вирусов при получении многих вакцин. БПЛ реагирует с различными биологическими молекулами, включая нуклеиновые кислоты, где он производит структурную модификацию путем алкилирования и депуринизации. БПЛ в общем виде представлен следующей структурой:



In vitro, БПЛ в общем реагирует с нуклеофилами, присутствующими в высоких концентрациях, в условиях, благоприятных для реакций нуклеофильного замещения - как при высокой температуре, высоких БПЛ концентрациях, и апротонных полярных растворителях - с образованием функционализирован-

ных пропионовых кислот, таких как 7-(2-карбоксиитил)гуанин или 1-(2-карбоксиитил)дезоксаденозин (Схема 1). Boutwell et al. *Annals New York Academy of Sciences*, 751-764; Perrin et al. *Biologicals*, 23 (1995) 207-211; Chen et al. *Carcinogenesis*, 2(2) (1981) 73-80.

Схема 1 (из Chen et al.):



БПЛ Дезоксиаденозин 1-(2-карбоксиитил)дезоксаденозин

Такое связывание или алкилирование ДНК-оснований вызывает мутагенность с помощью ряда механизмов, включающих замещения пар оснований, особенно депуринизацию, делеции и поперечное сшивание нуклеозидов. Высокая степень мутагенности и реакционной способности БПЛ соответствует быстрому уничтожению вируса и последующему разрушению ДНК до неканцерогенных побочных продуктов.

Любая остаточная функциональная ДНК клеточной культуры разрушается путем обработки менее чем 1% БПЛ (например, менее чем 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,2, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025, 0,01 или 0,005%). Предпочтительно остаточная функциональная ДНК клеточной культуры разрушается путем обработки БПЛ с содержанием между 0,1 и 0,01%.

Алкилирующий агент предпочтительно добавляется в буферный раствор и pH раствора предпочтительно поддерживается между 5 и 10. Более предпочтительно pH раствора поддерживается между 6 и 9. Даже более предпочтительно pH раствора поддерживается между 7 и 8.

В некоторых методах алкилирующий агент добавляется более чем один раз. Например, может быть проведена первичная обработка БПЛ, а затем может быть выполнена вторичная обработка. Между первой и второй обработкой может присутствовать стадия удаления алкилирующего агента, но алкилирующий агент может быть добавлен для вторичной обработки без удаления какого-либо алкилирующего агента, остающегося после первичной обработки.

Предпочтительно алкилирующий агент также используется в качестве инактивирующего агента по отношению к вирусу в вакцине. Алкилирующие агенты данного изобретения являются предпочтительными по сравнению с традиционными инактивирующими агентами, такими как формальдегид, который может поперечно сшивать белки с другим материалом, включая ДНК клетки-хозяина. Такое поперечное сшивание может приводить к образованию агрегатов (таких как конгломераты белок-белок, комбинации нуклеотидов, и комбинации белок-нуклеотид). Так как алкилирующие агенты, такие как БПЛ, не связаны с такими механизмами поперечного сшивания для вирусной инактивации, использование таких алкилирующих агентов для вирусной инактивации снижает образование агрегатов и других примесей в получаемой вакцине. Такие агрегаты могут включать белки, ионно или ковалентно связанные с другими белками, белки, ионно или ковалентно связанные с другими нуклеотидами и/или нуклеотиды, ионно или ковалентно связанные с другими нуклеотидами.

Как используется здесь, ссылка на "агрегацию" или "агрегат" показывает скопление или группу индивидуальных единиц или частиц, связанных вместе для создания больших групп или частиц. Агрегация может быть, в общем, определена количественными измерениями желаемых компонентов до и после возможной стадии агрегации, или до и после применения метода разрушения агрегатов (например, с помощью обработки детергентом), гель-электрофореза (такого как система Лэммли), хроматографии, мутности раствора или изучений седиментации и других методов, хорошо известных из уровня техники.

Обработка алкилирующим агентом, особенно БПЛ, может включать фазы с различными температурами. Например, может присутствовать первая фаза при низкой температуре (например, между 2-8°C, как около 4°C) и вторая фаза при более высокой температуре, обычно по крайней мере на 10°C выше, чем первая фаза (например, между 25-50°C, как около 37°C). Этот двухфазный способ в особенности используется, когда алкилирующий агент используется как для инактивации, так и для разрушения ДНК. По обычной схеме вирусная инактивация происходит в течение фазы с более низкой температурой, а разрушение ДНК происходит в ходе фазы с более высокой температурой. Как более подробно описано ниже, повышенная температура может также облегчать удаление термочувствительного алкилирующего реагента.

Иммуногенные белки

Иммуногенные белки, подходящие для использования в настоящем изобретении, могут происходить от любого вируса, который является мишенью вакцины. Иммуногенные белки могут быть созданы как составы инактивированных (или убитых) вирусов, аттенуированных вирусов, сплит-вирусов, составы очищенных субъединиц, вирусных белков, которые выделены, очищены или происходят от вируса, и вирусоподобных частиц (VLPs).

Иммуногенные белки данного изобретения являются вирусными антигенами, которые предпочтительно включают эпитопы, которые представлены на поверхности вируса в течение по крайней мере одной стадии его жизненного цикла. Вирусные антигены предпочтительно сохраняются в многочисленных

серотипах или изолятах. Вирусные антигены включают антигены, которые происходят от одного или более вирусов, описанных ниже, также как и специфические примеры антигенов, указанные ниже. Вирусы могут быть без оболочки или, предпочтительно, с оболочкой. Вирусы предпочтительно являются РНК вирусами, и более предпочтительно вирусами одноцепочечной РНК. Они могут иметь смысловой или, предпочтительно, антисмысловый геном. Их геномы могут быть несегментированы или предпочтительно сегментированы.

Ортомиксовирус: Вирусные антигены могут иметь происхождение от Ортомиксовируса, такого как Грипп А, В и С. Ортомиксовирусные антигены могут быть выбраны из одного или более вирусных белков, включая гемагглютинин (HA), нейраминидазу (NA), нуклеопротеин (NP), матриксный белок (M1), мембранный белок (M2), один или более компонентов транскриптазы (PB1, PB2 и PA). Предпочтительные антигены включают HA и NA. Антигены вируса гриппа могут происходить от межпандемических (ежегодных) штаммов гриппа. В качестве альтернативы, антигены вируса гриппа могут происходить от штаммов со способностью вызывать вспышки пандемии (т.е., штаммы гриппа с новым гемагглютинином по сравнению с гемагглютинином в штаммах, циркулирующих в настоящее время, или штаммы гриппа, которые являются патогенетическими в организме птиц и могут быть переданы горизонтально человеческой популяции, или штаммы гриппа, которые являются патогенетическими для человека). В зависимости от конкретной причины и от природы антигена, включенного в вакцину, антигены гриппа могут происходить от одного или более следующих подтипов гемагглютинина: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 или H16. Антигены гриппа данного изобретения могут происходить от штамма вируса гриппа птиц, в частности, от высоко патогенетического штамма вируса гриппа птиц (HPAI). Alexander, *Avian Dis* (2003) 47(3 Suppl): 976-81.

Дальнейшие детали антигенов вируса гриппа приведены ниже.

Парамиксовирусы: Вирусные антигены могут происходить от парамиксовирусов, таких как пневмовирусы (RSV), парамиксовирусы (PIV) и морбилливирусы (корь).

Пневмовирус: Вирусные антигены могут происходить от пневмовируса, такого как респираторно-синцитиальный вирус (RSV), респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота, вирус пневмонии мышей, и вирус ринотрахеита индеек. Предпочтительно, пневмовирус является RSV. Антигены пневмовируса могут быть выбраны из одного или более следующих белков, включая поверхностные белки слияния (F), гликопротеин (G) и маленький гидрофобный белок (SH), матриксные белки M и M2, белки нуклеокапсида N, P и L и неструктурные белки NS1 и NS2. Предпочтительные антигены пневмовируса включают F, G и M. См., например, *J. Gen Virol.* 2004 Nov; 85(Pt 11): 3229. Антигены пневмовируса также могут быть созданы или происходить от химерных вирусных. Например, химерные RSV/PIV вирусы могут включать компоненты как RSV, так и PIV.

Парамиксовирус: Вирусные антигены могут происходить от парамиксовируса, такого как вирус парагриппа типов 1-4 (PIV), паротиты, Сендай вирусы, обезьяний вирус 5, бычий вирус парагриппа и вирус псевдочумы птиц. Предпочтительно, парамиксовирус является PIV или паротитом. Антигены парамиксовируса могут быть выбраны из одного или более следующих белков: гемагглютинин - нейраминидаза (HN), белки слияния F1 и F2, нуклеопротеин (NP), фосфопротеин (P), большой белок (L) и матриксный белок (M). Предпочтительные белки парамиксовируса включают HN, F1 и F2. Антигены парамиксовируса также могут быть созданы или происходить от химерных вирусных. Например, химерные RSV/PIV вирусы могут включать компоненты как RSV, так и PIV. Промышленно доступные вакцины против паротита включают живой аттенуированный вирус паротита, или в моновалентной форме или в комбинации с вакцинами против кори и краснухи (MMR).

Морбилливирус: Вирусные антигены могут происходить от Морбилливируса, такого как корь. Антигены Морбилливируса могут быть выбраны из одного или более следующих белков: гемагглютинин (H), гликопротеин (G), фактор слияния (F), большой белок (L), нуклеопротеин (NP), фосфопротеин полимеразы (P) и матриксный (M). Промышленно доступные вакцины против кори включают живой аттенуированный вирус кори, обычно в комбинации с паротитом и краснухой (MMR).

Пикорнавирус: Вирусные антигены могут происходить от пикорнавирусов, таких как энтеровирусы, риновирусы, гепарнавирус, кардиовирусы и афтовирусы. Антигены, произошедшие от энтеровирусов, такого как вирус полиомиелита, являются предпочтительными.

Энтеровирус: Вирусные антигены могут происходить от энтеровируса, такого как вирус полиомиелита типов 1, 2 или 3, вирус коксаки А типов от 1 до 22 и 24, вирус коксаки В типов от 1 до 6, эховирус (ECHO) типов от 1 до 9, от 11 до 27 и от 29 до 34 и энтеровирус от 68 до 71. Предпочтительно, энтеровирус представляет собой вирус полиомиелита. Антигены энтеровируса предпочтительно выбраны из одного или более следующих белков капсида: VP1, VP2, VP3 и VP4. Промышленно доступные вакцины против полиомиелита включают противополиомиелитную инактивированную вакцину (IPV) и пероральную противополиомиелитную вакцину (OPV).

Гепарнавирус: Вирусные антигены могут происходить от гепарнавируса, такого как вирус гепатита А (HAV). Промышленно доступные вакцины против HAV включают инактивированную HAV вакцину.

Тогавирус: Вирусные антигены могут происходить от тогавируса, такого как рубивирус, альфавирус или артеивирус. Антигены, произошедшие от рубивируса, такого как краснуха, являются предпоч-

тительными. Антигены тогавируса предпочтительно выбраны из E1, E2, E3, С, NSP-1, NSPO-2, NSP-3 или NSP-4. Антигены тогавируса предпочтительно выбраны из E1, E2 или E3. Промышленно доступные вакцины против краснухи включают живой адаптированный к холоду вирус, обычно в комбинации с вакцинами против паротита и кори (MMR).

Флавивирус: Вирусные антигены могут происходить от флавивируса, такого как клещевой энцефалит (TBE), лихорадка денге (типы 1, 2, 3 или 4), желтая лихорадка, японский энцефалит, энцефалит Западного Нила, энцефалит Сент-Луис, Русский весенне-летний энцефалит, энцефалит, вызванный вирусом Повассан. Антигены флавивируса могут быть выбраны из PrM, М, С, Е, NS-1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b и NS5. Антигены флавивируса предпочтительно выбраны из PrM, М и Е. Промышленно доступные вакцины против TBE включают инактивированные вирусные вакцины.

Пестивирус: Вирусные антигены могут происходить от пестивируса, такого как вирус диареи крупного рогатого скота (BVDV), классическая чума свиней (CSFV) или пограничная болезнь овец (BDV).

Гепаднавирус: Вирусные антигены могут происходить от гепаднавируса, такого как вирус гепатита В. Антигены гепаднавируса могут быть выбраны из поверхностных антигенов (L, М и S), ядерных антигенов (НВс, НВе). Промышленно доступные вакцины против вируса гепатита В включают субъединичные вакцины, включающие белок поверхностного антигена S.

Вирус гепатита С: Вирусные антигены могут происходить от вируса гепатита С (HCV). HCV антигены могут быть выбраны из одного или более E1, E2, E1/E2, NS345 полипротеина, NS 345-ядерного полипротеина, ядра и/или пептидов из неструктурных областей (Houghton et al., *Hepatology* (1991) 14:381).

Рабдовирус: Вирусные антигены могут происходить от рабдовируса, такого как лиссавирус (вирус бешенства) и везикуловирус (VSV). Рабдовирусные антигены могут быть выбраны из гликопротеина (G), нуклеопротеина (N), большого белка (L), неструктурных белков (NS). Промышленно доступные вакцины против вируса бешенства включают убитый вирус, выращенный на диплоидных клетках человека или на эмбриональных клетках легких макак-резусов.

Калицивирус: Вирусные антигены могут происходить от Калицивируса, такого как вирус Норуолка, и Норуолк-подобных вирусов, таких как гавайский вирус и вирус снежных гор.

Коронавирус: Вирусные антигены могут происходить от коронавируса, атипичной пневмонии, респираторного коронавируса человека, инфекционного бронхита птиц (IBV), вируса гепатита мышей (MHV) и вируса инфекционного гастроэнтерита свиней (TGEV). Антигены коронавируса могут быть выбраны из шипа (S), оболочки (E), матрикса (M), нуклеокапсида (N), и гликопротеина гемагглютини-эстеразы (HE). Предпочтительно, антиген коронавируса происходит от вируса атипичной пневмонии (SARS). Вирусные антигены атипичной пневмонии (SARS) описаны в заявке на патент WO 04/92360.

Ретровирус: Вирусные антигены могут происходить от ретровируса, такого как онковирус, лентивирус или спумавирус. Антигены онковируса могут происходить от HTLV-1, HTLV-2 или HTLV-5. Антигены лентивируса могут происходить от HIV-1 или HIV-2. Антигены ретровируса могут быть выбраны из gag, pol, env, tax, tat, rex, rev, nef, vif, vpr и vpr. HIV антигены могут быть выбраны из gag (p24gag и p55gag), env (gp160 и gp41), pol, tat, nef, rev, vpr, минибелков, (предпочтительно, p55 gag и gp140v делеция). HIV антигены могут быть выбраны из одного или более следующих линий: HIV_{IIIb}, HIV_{SF2}, HIV_{LAV}, HIV_{LAI}, HIV_{MN}, HIV-1_{CM235}, HIV-1_{US4}.

Реовирус: Вирусные антигены могут происходить от реовируса, такого как ортореовирус, ротавирус, орбивирус или колтивирус. Антигены реовируса могут быть выбраны из структурных белков $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\mu 1$, $\mu 2$, $\sigma 1$, $\sigma 2$ или $\sigma 3$, или неструктурных белков σNS , μNS или $\sigma 1s$. Предпочтительные антигены реовируса могут происходить от ротавируса. Антигены ротавируса могут быть выбраны из VP1, VP2, VP3, VP4 (или расщепленного продукта VP5 и VP8), NSP 1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4 или NSP5. Предпочтительные антигены ротавируса включают VP4 (или расщепленный продукт VP5 и VP8), и VP7.

Парвовирус: Вирусные антигены могут происходить от парвовируса, такого как парвовирус B19. Антигены парвовируса могут быть выбраны из VP-1, VP-2, VP-3, NS-1 и NS-2. Предпочтительно антигеном парвовируса является белок капсида VP-2.

Вирус гепатита дельта (HDV): Вирусные антигены могут происходить от HDV, в частности, δ -антигена из HDV (см., например, патент США 5378814).

Вирус гепатита Е (HEV): Вирусные антигены могут происходить от HEV. Вирус гепатита G (HGV): Вирусные антигены могут происходить от HGV.

Вирус герпеса человека: Вирусные антигены могут происходить от вируса герпеса человека, таких как вирусы простого герпеса (HSV), вируса ветряной оспы (VZV), вируса Эпштейна-Барра (EBV), цитомегаловируса (CMV), вируса герпеса 6 человека (HHV6), вируса герпеса 7 человека (HHV7), и вируса герпеса 8 человека (HHV8). Антигены вируса герпеса человека могут быть выбраны из предранних белков (α), ранних белков (β) и поздних белков (γ). Антигены HSV могут происходить от HSV-1 или HSV-2 линий. Антигены HSV могут быть выбраны из гликопротеинов gB, gC, gD и gH, белка слияния (gB), от белков ускользания от иммунологического надзора (gC, gE или gI). Антигены VZV могут быть выбраны из белков ядра, нуклеокапсида, наружного покрова или оболочки. Живая аттенюированная VZV вакцина является промышленно доступной. EBV антигены могут быть выбраны из ранних белков антигенов

(EA), антигена вирусного капсида (VCA) и гликопротеинов мембранного антигена (MA). CMV антигены могут быть выбраны из белков капсида, гликопротеинов оболочки (таких как gB и gH), и белков наружного покрова.

Папавирусы: Антигены могут происходить от папавирусов, таких как папилломавирусы и полиомавирусы. Папилломавирусы включают HPV серотипов 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 и 65. Предпочтительно, HPV антигены происходят от серотипов 6, 11, 16 или 18. HPV антигены могут быть выбраны из белков капсида (L1) и (L2), или E1-E7, или их слияний. HPV антигены предпочтительно преобразуются в вирусоподобные частицы (VLPs). Полиомавирусы включают ВК вирус и ЖК вирус. Антигены полиомавируса могут быть выбраны из VP1, VP2 или VP3.

Далее описываются вирусные антигены в Vaccines, 4th Edition (Plotkin and Orenstein ed. 2004); Medical Microbiology 4th Edition (Murray et al. ed. 2002); Virology, 3rd Edition (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2nd Edition (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. 1991), которые рассматриваются в отношении композиций настоящего изобретения.

Иммуногенные белки, пригодные для использования в настоящем изобретении, могут происходить от вируса, который вызывает респираторное заболевание. Примеры таких респираторных антигенов включают белки, происходящие от респираторного вируса, такого как ортомиксовирусы (грипп), пневмовируса (RSV), парамиксовируса (PIV), морбилливируса (корь), тогавируса (краснуха), VZV, и коронавируса (SARS). Иммуногенные белки, происходящие от вируса гриппа, являются особенно предпочтительными.

Композиции настоящего изобретения могут включать один или более иммуногенных белков, пригодных для использования субъектами детского возраста. Субъекты детского возраста обычно младше 2 лет или младше 1 года. Антигены для детей могут быть введены множество раз в течение курса длительностью 6 месяцев, 1, 2 или 3 года. Антигены для детей могут происходить от вируса, который может распространяться на детей и/или вируса, к заражению которым дети являются чувствительными. Вирусные антигены для детей включают антигены, которые происходят от одного или более вирусов: ортомиксовируса (грипп), пневмовируса (RSV), парамиксовируса (PIV и паротит), морбилливируса (корь), тогавируса (краснуха), энтеровируса (полио), HBV, коронавируса (SARS) и вируса ветряной оспы (VZV), вируса Эпштейна-Барра (EBV).

Композиции настоящего изобретения могут включать один или более иммуногенных белков, пригодных для использования людьми пожилого возраста или людьми с ослабленным иммунитетом. Такие люди могут нуждаться в вакцинации более часто, при высоких дозах или с помощью препаратов с адьювантами для улучшения иммунного ответа на целевые антигены. Антигены, которые могут быть целевыми для использования людьми пожилого возраста или людьми с ослабленным иммунитетом, включают антигены, происходящие от одного или более следующих вирусов: ортомиксовируса (грипп), пневмовируса (RSV), парамиксовируса (PIV и паротит), морбилливируса (корь), тогавируса (краснуха), энтеровируса (полно), HBV, коронавируса (вирус атипичной пневмонии), вируса ветряной оспы (VZV), вируса Эпштейна-Барра (EBV) и цитомегаловируса (CMV).

После роста вирусов может быть использован алкилирующий агент на очищенные вирионы, например, на вирионы, присутствующие в осветленной клеточной культуре, или на вирионы, очищенные от такой осветленной клеточной культуры. Способ согласно настоящему изобретению может включать удаление клеточного материала с помощью осветления, и затем очищения вирионов от осветленной клеточной культуры, например, с помощью хроматографии. Алкилирующий агент может быть применен к очищенным этим способом вирионам, или после дальнейшей необязательной стадии ультрафильтрации/диафильтрации. Предпочтительные способы включают использование алкилирующего агента не на осветленный супернатант инфицированной клеточной культуры, а на вирионы, очищенные от такого осветленного супернатанта (сравн., Morgeaux et al. (1993) Vaccine 11 :82-90).

Алкилирующий агент предпочтительно используется после того, как произойдет удаление эндотоксина.

Стадии способа

Композиции вакцин настоящего изобретения могут быть получены с помощью выделения иммуногенного белка и разрушения остаточной функциональной ДНК клетки-хозяина. Аналогично, препараты рекомбинантных белков могут быть получены с помощью выделения или очищения рекомбинантного белка и разрушения остаточной функциональной ДНК клетки-хозяина. Эти стадии могут быть проведены последовательно или одновременно. Стадия разрушения остаточной функциональной ДНК клеточной культуры выполняется путем добавления алкилирующего агента, например БПЛ.

Алкилирующий агент и любые остаточные побочные продукты предпочтительно удаляются до получения конечного препарата вакцины или рекомбинантного белка. Предпочтительно, композиция вакцины или препарат рекомбинантного белка содержит менее чем 0,1% комбинацию свободной пропиононовой кислоты и БПЛ (например, менее чем 0,1, 0,05, 0,025, 0,01, 0,005, 0,001 или 0,01%). Предпочтительно, конечная композиция вакцины или препарат рекомбинантного белка содержит менее чем 0,01% БПЛ.

Обычно БПЛ может быть удален при помощи нагревания, чтобы вызвать гидролиз для получения нетоксичной β -гидроксипропионовой кислоты. Промежуток времени, необходимый для гидролиза, зави-

сит от общего количества БПЛ и температуры. Более высокие температуры дают более быстрый гидролиз, но температура не должна быть поднята так высоко, чтобы повредить активные белковые ингредиенты. Как описано ниже, нагревание до 37°C в течение 2-2,5 ч подходит для удаления БПЛ.

После обработки ДНК, остаточные ДНК-продукты могут удерживаться в конечной иммуногенной или рекомбинантной композиции. Более предпочтительно, однако, чтобы они были отделены от желаемых компонентов, например, от вирионов/белков. С помощью такого разделения можно удалить продукты распада ДНК частично или полностью, и предпочтительно, удалить любую разрушаемую ДНК, которая >200 пар оснований. Таким образом, способ настоящего изобретения может включать стадию отделения ДНК от вирионов. Эта стадия разделения может включать, например, одну или более ультрафильтрацию, ультрацентрифугирование (включая градиентное ультрацентрифугирование), осаждение вирусного капсида с помощью центрифугирования и фракционирование супернатанта, хроматографию (такую как обменная хроматография, например, анионообменная), адсорбцию и т.п.

В целом, тем не менее, способ может включать обработку алкилирующим агентом для разрушения длины остаточной ДНК, и затем очищение для удаления остаточной ДНК (включая удаление разрушенной ДНК).

Клеточная культура

Вакцины данного изобретения получают из вирусов, которые размножают на клеточной культуре. Кроме того, изобретение включает препараты рекомбинантных белков, экспрессированных в клеточной культуре. Культуры клеток млекопитающих являются предпочтительными как для репликации вируса, так и для экспрессии белков.

Ряд клеточных линий млекопитающих известен из уровня техники и включает клеточные линии, происходящие от клеток человека или приматов, не являющихся человеком, (например, обезьян) (например, PER.C6 клетки, которые описаны, например, в заявках на патент WO01/38362, WO01/41814, WO02/40665, WO2004/056979 и WO2005/080556, приведенные здесь во всей полноте в качестве ссылки, также как в ECACC под депозитным номером 96022940), MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), HEK клетки, HeLa клетки, фетальные клетки легких макака-резусов (ATCC CL-160), клетки почек эмбрионов человека (293 клетки, обычно трансформированные дегидратированной ДНК аденовируса 5 типа), Vero клетки (из почек обезьян), лошади, коровы (например, MDBK клетки), овцы, собаки (например, MDCK клетки из почек собаки, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) или MDCK 33016, депозитный номер DSM ACC 2219, как описано в заявках на патент WO 97/37000 и WO 97/37001), кошки, и грызуна (например клетки хомяков, такие как BHK21-F, HKCC клетки, или клетки яичников китайского хомяка (ЯКХ)), и могут быть получены на многочисленных разнообразных стадиях развития, включая, например, зрелых, новорожденных, зародышей и эмбрионов.

Подходящими клетками обезьян являются, например, клетки африканской зеленой обезьяны, такие как клетки почек, как в клеточной линии Vero. Подходящими клетками собак являются, например, клетки почек, как в клеточной линии MDCK. Таким образом, клеточные линии включают, но не ограничиваются: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; и т.п. Использование клеток млекопитающих означает, что вакцины могут быть свободны от материалов, таких как ДНК цыплят, яичные белки (такие как овальбумин и овомукоид) и т.п., тем самым снижая аллергенность.

В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки являются бессетными (например, PER.C6 клетки; ECACC 96022940). В предпочтительных вариантах осуществления изобретения используются клетки млекопитающих, и могут быть выбраны и/или происходить от одного или более следующих неограниченных типов клеток: клетки фибробластов (например, клетки кожи, легких), эндотелиальные клетки (например, аортальные, коронарные, легочные, сосудистые, капилляров кожи, пуповинные), гепатоциты, кератиноциты, клетки иммунной системы (например, Т-клетки, В-клетки, макрофаги, естественные клетки-киллеры, дендритные), клетки молочных желез (например, эпителиальные), клетки гладких мышц (например, сосудистые, аортальные, коронарные, артериальные, маточные, бронхиальные, цервикальные, перититы сетчатки), меланоциты, нейтральные клетки (например, астроциты), клетки простаты (например, эпителиальные, гладких мышц), ренальные клетки или клетки почек (например, эпителиальные, мезангиальные, проксимальных канальцев), клетки скелета (например, хондроциты, остеокласты, остеобласты), мышечные клетки (например, миоциты, скелетных, гладких мышц, бронхиальные), клетки печени, клетки сетчатки или ретинобласты, клетки легких, и стромальные клетки.

Заявки на патент WO97/37000 и WO97/37001 описывают получение клеток животных и клеточных линий, которые способны расти в суспензии и в среде без сыворотки, и применимы при получении и репликации вирусов, в частности вируса гриппа. Дальнейшие детали даны в заявках на патент WO03/023021 и WO03/023025.

Предпочтительные линии клеток млекопитающих для выращивания вирусов гриппа включают MDCK клетки из почки собаки Madin Darby; Vero клетки, из почки африканской зеленой обезьяны (*Seropithecus aethiops*); или PER.C6 клетки из ретинобластов эмбриона человека. Эти клеточные линии свободно доступны, например, в Американской коллекции Культур Типовых Клеток (ATCC), в клеточных хранилищах Coriell, или в Европейской Коллекции Клеточных Культур (ECACC). Например, ATCC предоставляет различные клетки Vero в каталоге под номерами CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 и CRL-1587, и

поставляет MDCK клетки в каталоге под номером CCL-34. PER.C6 доступны в ECACC под депозитным номером 96022940.

Наиболее предпочтительными клеточными линиями для выращивания вируса гриппа являются линии клеток MDCK. Первичные линии клеток MDCK доступны в ATCC как CCL-34, но производные этой клеточной линии могут также быть использованы. Например, заявка на патент WO97/37000 раскрывает линию клеток MDCK, которая была адаптирована для выращивания в суспензионной культуре ('MDCK 33016', под депозитным номером DSM ACC 2219). Аналогично, заявка на патент EP-A-1260581 (WO01/64846) раскрывает происходящую от MDCK клеточную линию, которая растет в суспензии в бессывороточной культуре ('B-702', под депозитным номером FERM BP-7449). Заявка на патент WO2006/071563 раскрывает неканцерогенные MDCK клетки, включающие 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) и 'MDCK-SF103' (PTA-6503). Заявка на патент WO2005/113758 раскрывает линии клеток MDCK с высокой чувствительностью к инфекции, включающие 'MDCK.5F1' клетки (ATCC CRL-12042). Любые из этих линий MDCK клеток могут быть использованы.

Действие культур клеток MDCK в суспензии и адгезивных культур описано в заявках на патент WO97/37000, WO97/37001, WO03/023021 и WO03/023025. В частности, заявки на патент WO03/023021 и WO03/023025 описывают объемы лабораторного и промышленного масштаба культуры суспензионных клеток MDCK в бессывороточной среде, химически созданной среде и среде без белков. Каждая ссылка приведена здесь во всей своей полноте.

В качестве альтернативы млекопитающим как источникам, клеточные линии для использования в настоящем изобретении могут быть получены из птиц, таких как цыпленок, утка, гусь, куропатка или фазан. Клеточные линии из птиц могут быть получены из организмов, находящихся на разных стадиях развития, включая такие как эмбрион, птенец и взрослая особь. Предпочтительно, клеточные линии происходят от эмбриональных клеток, таких как эмбриональные фибробласты, клетки сперматозоидов или индивидуальные органы, включая нервы, мозг, сетчатку, почки, печень, сердце, мышцы, или экстраэмбриональные ткани и мембраны, защищающие эмбрион. Примеры клеточных линий из птиц включают эмбриональные стволовые клетки птиц (заявки на патент WO01/85938 и WO03/076601) и клетки сетчатки уток (заявка на патент WO2005/042728). Подходящие эмбриональные стволовые клетки птиц включают линию клеток EBx, происходящую от эмбриональных стволовых клеток цыпленка, EB45, EB14, и EB14-074 (заявка на патент WO2006/108846). Эмбриональные фибробласты цыпленка (CEF) также могут быть использованы. Эти клетки птиц являются особенно подходящими для выращивания вирусов гриппа.

Клеточные системы экспрессии насекомых, такие как рекомбинантные системы экспрессии бакуловируса, известны специалистам в данной области техники и описаны, например, Summers и Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987). Материалы и методы для бакуловируса/введенных клеточных систем экспрессии промышленно доступны в форме набора, в частности, Invitrogen, San Diego CA. Клетки насекомых для использования с векторами экспрессии бакуловируса, включают, в частности, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* и *Trichoplusia ni*.

Рекомбинантная экспрессия белков также может быть проведена в клетках-хозяинах бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, и *Streptococcus* spp. Клетки-хозяева дрожжей, подходящие для рекомбинантной экспрессии белков, включают *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Yarrowia lipolytica*.

Условия культивирования для вышеуказанных клеточных типов хорошо описаны во многих публикациях, или иначе среда для культивирования, добавки, и условия могут быть приобретены коммерческим способом, например, таким как описан в каталоге и дополнительной литературе Cambrex Bioproducts (East Rutherford, NJ).

В конкретных вариантах осуществления изобретения, клетки-хозяева, используемые в способах, описанных здесь, культивируют в бессывороточной и/или безбелковой среде. Средой называется бессывороточная среда в контексте настоящего изобретения, в которой не содержится добавок из сыворотки человеческого или животного происхождения. Без белков, как условлено, означает культуры, в которых размножение клеток происходит в отсутствие белков, факторов роста, других белковых добавок и несывороточных белков, но может необязательно включать белки, такие как трипсин или другие протеазы, которые могут быть необходимы для роста вирусов. Клетки, растущие в таких культурах, естественным образом содержат белки.

Известные бессывороточные среды включают среду Исков, Ultra-CHO среду (BioWhittaker) или EX-CELL (JRH Bioscience). Обычно среды, содержащие белки, включают базальную среду Игла (BME) или минимальную эссенциальную среду (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) или модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM или EDM), которые обычно используются с содержанием до 10% фетальной телячьей сыворотки или похожих добавок. Необязательно минимальная эссенциальная среда (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) или модифицированная по способу Дульбекко среда Игла

(DMEM или EDM) могут использоваться без какой-либо добавки, содержащей сыворотку. Безбелковые среды как PF-CHO (JHR Bioscience), химически созданные среды, такие как ProCHO 4CDM (BioWhittaker) или SMIF 7 (Gibco/BRL Life Technologies) и митогенные пептиды, такие как Primactone, Pepticase или HyPer™ (все от Quest International) или гидролизат лактальбумина (Gibco и другие производители) также достаточно известны из предшествующего уровня техники. Добавки в среды, основанные на растительных гидролизатах, имеют особое преимущество в том, что загрязнение вирусами, микоплазмой или неизвестными инфекционными агентами может быть исключено.

Условия для клеточной культуры (температура, клеточная плотность, значение pH и т.п.) изменяются в очень широких пределах в связи с пригодностью используемой клеточной линии согласно настоящему изобретению, и могут быть созданы в соответствии с требованиями особых условий выращивания вируса или деталей рекомбинантной экспрессии.

Клетки могут быть выращены различными способами, например в суспензии, адгезионной культуре, на микроносителях.

Клетки могут быть выращены при температуре ниже 37°C (например, 30-36°C) в ходе репликации вируса (заявка на патент WO97/37001).

Способ размножения вируса в клетках культуры, в общем, включает стадии заражения клеток культуры штаммом для культивирования, культивирование зараженных клеток в течение желаемого периода времени для размножения вируса, например, такого как определен с помощью титра вируса или экспрессии антигенов (например, между 24 и 168 ч после заражения) и сбор размноженного вируса. Культивируемые клетки могут быть заражены вирусом (измеренным с помощью PFU или TCID₅₀) с клеточным: отношением от 1:500 до 1:1, предпочтительно от 1:100 до 1:5, более предпочтительно от 1:50 до 1:10. Вирус может быть добавлен к клеточной суспензии или нанесен на монослой клеток, и вирус адсорбируется на клетках в течение по крайней мере 60 мин, но обычно менее чем за 300 мин, предпочтительно от 90 до 240 мин при температуре от 25 до 40°C, предпочтительно от 28 до 37°C.

Зараженная клеточная культура (например, монослой) может быть удалена или методом замораживания-оттаивания, или ферментативного действия для увеличения содержания вируса в собираемом супернатанте культуры. Собираемые жидкости затем или инактивируются, или замораживаются. Культивируемые клетки могут быть подвержены множественному заражению ("m.o.i.") от около 0,0001 до 10, предпочтительно от 0,002 до 5, более предпочтительно от 0,001 до 2. Еще более предпочтительно клетки заражают при m.o.i около 0,01. Зараженные клетки могут быть собраны от 30 до 60 ч после заражения. Предпочтительно клетки собирают от 34 до 48 ч после заражения. Еще более предпочтительно клетки собирают от 38 до 40 ч после заражения. Протеазы (обычно трипсин) обычно добавляют в ходе выделения вируса клеточной культурой, и протеазы могут быть добавлены на любой подходящей стадии в ходе культивирования.

Композиции вакцин данного изобретения будут в основном созданы в форме субвириона, например, в форме сплит-вируса, где вирусная липидная оболочка была растворена или разрушена, или в форме одного или более очищенных вирусных белков. Композиция вакцины будет содержать достаточное количество антигена(ов) для получения иммунологического ответа у пациента.

Способы расщепления вирусов, таких как вирусы гриппа, хорошо известны из уровня техники, например, см. заявки на патент WO02/28422, WO02/067983, WO02/074336, WO01/21151 и т.п. Расщепление вируса выполняется с помощью разрушения или фрагментирования цельного вируса, или инфекционного (дикого типа или аттенуированного), или неинфекционного (например, инактивированного), разрушающей концентрацией расщепляющего агента. Расщепляющие агенты, как правило, включают агенты, способные разрушать и растворять липидные мембраны, обычно с гидрофобным хвостом, прикрепленным к гидрофильной головке. Наиболее предпочтительным расщепляющим агентом является цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ). Дальнейшие детали расщепления даны ниже в контексте вирусов гриппа.

Разрушение приводит к полной или частичной солюбилизации вирусных белков, изменяя целостность вируса. Предпочтительными расщепляющими агентами являются неионные и ионные (например, катионные) поверхностно-активные вещества, например алкилгликозиды, алкилтиогликозиды, ацильные сахара, сульфобетаины, бетаины, полиоксиэтиленалкилэфиры, N,N-диалкилглюкамиды, Несамег, алкилфеноксиполиэтоксиганола, четвертичные аммониевые соединения, саркозил, ЦТАБы (цетилтриметиламмонийбромиды), три-N-бутилфосфат, Cetavlon, мирисилтриметиламмониевые соли, липофектин, липофектамин, и DOT-MA, октил- или нонилфеноксиполиэтоксиганола (например, Triton ПАВы, такие как Triton X-100 или Triton N101), полиоксиэтиленовые сложные эфиры сорбитана (Tween ПАВы), полиоксиэтиленовые простые эфиры сорбитана, полиоксиэтиленовые сложные эфиры и т.п.

Способы очистки отдельных белков от вирусов хорошо известны, и включают, например, стадии фильтрации, хроматографии, центрифугирования и элюции с помощью пористого волокна. В одном из вариантов осуществления изобретения белки очищают с помощью ионообменной смолы.

В качестве другой альтернативы, вакцина может включать целый вирус, например живой аттенуированный цельный вирус или предпочтительно инактивированный цельный вирус. Способы инактивации или разрушения вирусов для лишения их способности инфицировать клетки млекопитающих известны из уровня техники. Такие методы включают как химические, так и физические способы. Химиче-

ские способы инактивации вируса включают обработку эффективным количеством одного или более следующих агентов: детергентов, формальдегида, формалина, БПЛ или УФ-светом. Дополнительные химические методы инактивации включают обработку метиленовым синим, псораленом, карбоксифулленом (C60) или комбинацией любых из них. Другие методы вирусной инактивации известны из уровня техники, такие как, например, двойной этиламин, ацетилэтиленмин или гамма-облучение. Предпочтительно, вирус инактивируют с помощью БПЛ.

Фармацевтические композиции

Композиции настоящего изобретения являются фармацевтически приемлемыми. Они обычно включают компоненты в добавок к антигенам, например, обычно они включают один или более фармацевтический носитель(и) и/или инертный наполнитель(и). Детальное обсуждение таких компонентов доступно в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 2000; 20th edition, ISBN: 0683306472).

Композиции будут, большей частью, в водной форме.

Композиции могут включать один или более консервантов, таких как тиомерсал или 2-феноксиэтанол. Предпочтительным является, однако, то, что вакцина должна быть по существу свободна от (т.е. менее чем 5 µg/ml) от материала, содержащего ртуть, например, свободна от тиомерсала (Van-zhoff (2000) Immunology Letters 71:91-96; WO02/097072). Вакцины, не содержащие ртути, являются более предпочтительными. Вакцины, не содержащие консервантов, являются особенно предпочтительными.

Предпочтительно включать физиологическую соль, такую как соль натрия, например, для контроля тоничности. Хлорид натрия (NaCl) является предпочтительным, который может присутствовать в концентрации от 1 до 20 мг/мл. Другие соли, которые могут присутствовать, включают хлорид калия, дигидрофосфат калия, дегидратированный фосфат динатрия, хлорид магния, хлорид кальция и т.п.

Композиции будут, большей частью, иметь осмоляльность от 200 мОсм/кг до 400 мОсм/кг, предпочтительно, от 240-360 мОсм/кг, и будут более предпочтительно попадать в область 290-310 мОсм/кг.

Композиции могут включать один или более буферов. Типичные буферы включают: фосфатный буфер, Tris буфер, боратный буфер, сукцинатный буфер, гистидиновый буфер (в частности, с адьювантом гидроксидом алюминия), или цитратный буфер. Буферы будут в основном включены в концентрации из области 5-20 мМ.

pH композиции будет в основном от 5.0 до 8.1, и более характерно от 6,0 до 8,0, например от 6,5 до 7,5. Способ согласно данному изобретению может таким образом включать стадию регулирования pH вакцины до упаковки.

Композиция предпочтительно является стерильной. Композиция предпочтительно непирогенная, например, содержащая <1 ЕЭ (единицу эндотоксина, стандартное измерение) на дозу и предпочтительно <0,1 ЕЭ на дозу. Композиция предпочтительно не содержит глютена.

Композиции данного изобретения могут включать детергент, например ПАВ полиоксиэтиленового эфира сорбитана (известное как 'Tweens'), октоксинал (такой как октоксинал-9 (Triton X-100) или трет-октилфеноксиполиэтоксинал), цетилтриметиламмоний бромид ('ЦТАБ') или дезоксихолат натрия. Детергент может присутствовать только в следовых количествах.

Композиция может включать материал для одиночной иммунизации или может включать материал для множественной иммунизации (т.е. набор для многократного использования). Включение консерванта является применимым в композициях для многократного использования. В качестве альтернативы (или в дополнение) включения консерванта в композиции для многократного использования, композиции могут быть помещены в контейнер, имеющий стерильный держатель для удаления материала.

Вакцины обычно вводятся в объеме дозы около 0.5 мл, хотя половина дозы (т.е. около 0,25 мл) может вводиться детям.

Композиции и наборы предпочтительно хранятся при температуре от 2 до 8°C. Их не следует замораживать. В идеале их следует беречь от прямого воздействия света.

Способы лечения и введения вакцин

Композиции данного изобретения подходят для введения животным (и, в частности, человеку), и изобретение относится к способу повышения иммунного ответа у пациента, включающему стадию введения композиции данного изобретения пациенту.

Изобретение также относится к набору или композиции для использования в качестве лекарственного средства.

Изобретение также относится к использованию иммуногенных белков, происходящих от вируса, размноженного на клеточной культуре, где упомянутая вакцина по существу свободна от остаточной функциональной ДНК клеточной культуры, в производстве лекарственного средства для повышения иммунного ответа у пациента.

Иммунный ответ, повышенный с помощью этих методов и применений будет, как правило, включать образование антител, предпочтительно, образование защитных антител. Способы определения образования антител, нейтрализующих способность и защиту после вирусной вакцинации, хорошо известны из уровня техники. Для вируса гриппа, например, исследования человека показали, что титры антител

против НА коррелируют с защитой (титр сывороточной пробы подавления гемагглютинации около 30-40 дает около 50% защиты от инфицирования гомологичным вирусом) [Potter & Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69-75].

Композиции данного изобретения могут вводиться различными способами. Наиболее предпочтительным путем иммунизации является внутримышечная инъекция (например, в руку или ногу), но другие возможные пути включают подкожное введение, интраназальное, пероральное, внутрикожное, чрескожное и т.п.

Вакцины, полученные согласно изобретению, могут быть использованы для лечения, как детей, так и взрослых. Возраст пациента может быть менее 1 года, 1-5 лет, 5-15 лет, 15-55 лет или по крайней мере 55 лет. Пациенты могут быть преклонного возраста (например, >50 лет, >60 лет, и предпочтительно >65 лет), молодые (например, <5 лет), госпитализированные пациенты, работники здравоохранения, вооруженных сил и военный персонал, беременные женщины, хронические больные, пациенты с иммунодефицитом, пациенты, которые принимают противовирусные препараты (например, оселтамивир или занамивир против гриппа, см. ниже) за 7 дней до вакцинации, люди с аллергией на яйца и люди, путешествующие за границей. Вакцины подходят не только для этих групп, однако могут быть использованы более широко для населения.

Лечение может производиться по схеме однократной дозы или по схеме многократной дозы. Многократные дозы могут быть использованы для схемы первичной иммунизации и/или для схемы повторной иммунизации. Согласно схеме многократной дозы различные дозы могут вводиться одинаковыми или различными путями, например, парентеральным первично и через слизистую вторично, парентеральным первично и парентеральным вторично, и т.п. Введение более чем одной дозы (обычно двух доз) особенно полезно для иммунологически интактных пациентов. Многократные дозы обычно будут вводиться, по крайней мере, с перерывом в 1 неделю (например, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 6 недель, около 8 недель, около 10 недель, около 12 недель, около 16 недель и т.п.).

Вакцины, полученные с помощью данного изобретения, могут быть введены пациентам, по существу, в то же время (например, в течение одной медицинской консультации или визита к работнику здравоохранения или в центр вакцинации), что и другие вакцины, например, по существу, в то же время, что и бактериальная вакцина, такая как дифтерийная вакцина, противостолбнячная вакцина, коклюшная вакцина, коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина, конъюгированная *H. influenzae* вакцина типа b, менингококковая конъюгированная вакцина (такая как тетравалентная A-C-W135-Y вакцина), пневмококковая конъюгированная вакцина и т.п.

Аналогично, вакцины изобретения могут вводиться пациентам, по существу, в то же время (например, в течение одной медицинской консультации или визита к работнику здравоохранения), что и антивирусное средство, эффективное против вируса вакцины. Там, где вакциной является вакцина против гриппа, например, средством(ами) может быть ингибитор нейраминидазы (например, оселтамивир и/или занамивир). Эти противовирусные препараты включают (3R,4R,5S)-4-ацетиламино-5-амино-3-(1-этилпропокси)-1-циклогексен-1-карбоновую кислоту или 5-(ацетиламино)-4-[(аминоиминометил)-амино]-2,6-ангидро-3,4,5-тридезоксид-D-глицеро-D-галактонон-2-еноновую кислоту, включая ее сложные эфиры (например, этиловые эфиры) и ее соли (например, фосфатные соли). Предпочтительным эффективным противовирусным агентом против гриппа является (3R,4R,5S)-4-ацетиламино-5-амино-3-(1-этилпропокси)-1-циклогексен-1-карбоновая кислота, этиловый эфир, фосфат (1:1), также известный как оселтамивир фосфат (TAMIFLU™).

ДНК клетки-хозяина

Измерение остаточной ДНК клетки-хозяина в пределах возможностей специалиста в данной области техники. Общее количество остаточной ДНК в композициях изобретения составляет, предпочтительно менее чем 20 нг/мл, например ≤ 10 нг/мл, ≤ 5 нг/мл, ≤ 1 нг/мл, ≤ 100 пг/мл, ≤ 10 пг/мл и т.д. Как описано выше, по существу, вся эта ДНК, предпочтительно, длиной менее чем 500 пар оснований.

Анализ, используемый для измерения ДНК, обычно будет представлять собой утвержденный анализ Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001; Lundblad (2001) Biotechnology and Applied Biochemistry 34:195-197. Рабочие характеристики утвержденного метода могут быть описаны математическими и измеряемыми количественно способами, и будут определяться его возможные источники ошибок. Анализ будет, как правило, проверен на характеристики, такие как точность, воспроизводимость, специфичность. Сначала анализ калибруется (например, относительно известных стандартных количеств ДНК клетки-хозяина) и проверяется, затем, как принято, могут быть выполнены количественные измерения ДНК. Три принципиальных метода для количественного определения ДНК могут быть использованы: гибридизационные методы, такие как Саузерн-блот или слот-блот анализы (Ji et al. (2002) Biotechniques. 32:1162-7); методы иммуноанализа, такие как Threshold™ System (Briggs (1991) J Parenter Sci Technol. 45:7-12; и количественная ПЦР (Lahijani et al. (1998) Hum Gene Ther. 9:1173-80). Эти способы знакомы специалисту, хотя определенные характеристики каждого способа могут зависеть от рассматриваемой клетки-хозяина, напри-

мер, выбор зондов для гибридизации, выбор праймеров и/или зондов для амплификации, и т.п. Threshold™ System от Molecular Devices является количественным анализом для общей ДНК в пикограммовых количествах, и использовался для мониторинга уровня загрязнения ДНК в биопрепаратах (Briggs (1991) supra). Типичный анализ включает последовательное специфичное образование реакционного комплекса между биотинилированным белком, связывающим одноцепочную ДНК, уреазы-конъюгированным анти-оДНК антителом и ДНК. Все компоненты анализа включены в полный набор для анализа общей ДНК, доступный у производителя. Различные промышленные производители предлагают анализы с помощью количественной ПЦР для определения остаточной ДНК клетки-хозяина, например AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies и т.п. Сравнение хемилюминесцентного гибридизационного анализа и Threshold™ system общей ДНК для измерения загрязнения человеческой вирусной вакцины ДНК клетки-хозяина, можно найти в Lokteff et al. (2001) *Biologicals*. 29:123-32.

Эти различные аналитические методы могут также быть использованы для измерения длины ДНК клетки-хозяина. Как было упомянуто выше, средняя длина остаточной ДНК клетки-хозяина, после обработки алкилирующим агентом, составляет предпочтительно менее чем 500 пар оснований, или даже менее чем 200 пар оснований.

В частности, в случае клеток собаки, таких как MDCK клетки, анализ генома выявил 13 кодирующих последовательностей длиной <500 пар оснований, 3 последовательности <200 пар оснований и 1 последовательность <100 пар оснований. Таким образом, фрагментация ДНК до <200 пар оснований удаляет по существу все кодирующие последовательности, и весьма маловероятно, что любой фрагмент будет в действительности соответствовать одному из 3 генов приблизительно такой же длины (а именно: секретин - 81 пара оснований; PYY -108 пар оснований; и остеокальцин - 135 пар оснований).

Адьюванты

Композиции изобретения могут включать адьювант, который может функционировать с повышением иммунного ответа (гуморального и/или клеточного), вызываемого у пациента, который принимает композицию. Использование адьювантов с вирусными вакцинами хорошо известно, например, для вакцин против гепатита, полиомиелита и т.п. FLUAD™ вакцина против гриппа включает адьювант в виде эмульсии масло-в-воде.

Адьюванты, которые могут быть использованы с изобретением, включают, но не ограничиваются, соли алюминия, иммуностимулирующие олигонуклеотиды, сапонины, аналоги липида А (такие как 3dMPL) и эмульсии типа масло-в-воде. Эти и другие адьюванты раскрыты более подробно в Powell & Newman (*Vaccine Design: The Submit and Adjuvant Approach*, Plenum Press 1995, ISBN 0-306-44867-X) и O'Hagan (*Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*, volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series, ISBN: 1-59259-083-7).

Могут быть использованы адьюванты, известные как гидроксид алюминия и фосфат алюминия. Эти названия являются традиционными, но используются только для удобства, как нет и точного описания представленного подлинного химического соединения (например, см. часть 9 Powell & Newman). Изобретение может использовать любой адьювант - «гидроксид» или «фосфат», которые, как правило, используются в качестве адьювантов. Адсорбция этими солями является предпочтительной.

Иммуностимулирующие олигонуклеотиды с адьювантной активностью хорошо известны. Они могут содержать мотив CpG (динуклеотидная последовательность, содержащая неметилованный цитозин, связанный фосфатной связью с гуанозином), мотив TrG, олиго-dT последовательность, олиго-dC последовательность, двухцепочечную РНК, палиндромные последовательности, поли(dG) последовательность и т.п. Иммуностимулирующие олигонуклеотиды обычно будут включать по крайней мере 20 нуклеотидов и могут включать менее чем 100 нуклеотидов.

Сапонины (часть 22 Powell & Newman) представляют собой гетерологичную группу гликозидов стерина и гликозидов тритерпеноидов, которые находятся в коре, листьях, стволах, корнях и даже цветках широкого ряда видов растений. Сапонины из коры дерева *Quillaja saponaria* Molina широко изучались в качестве адьювантов. Композиции сапонинов в качестве адьювантов включают очищенные составы, такие как QS21, также как и липидные композиции, такие как ISCOMs. Композиции сапонинов очищали с использованием ВЭЖХ и обращено-фазовой ВЭЖХ, и конкретные очищенные фракции были идентифицированы с помощью этих методов, включая QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B и QH-C. Предпочтительно, сапонин представляет собой QS21. Метод получения QS21 описан в патенте США 5057540. Композиции сапонинов могут также включать стерин, такой как холестерин (WO96/33739). Комбинации сапонинов и холестеринных могут быть использованы для образования своеобразных частиц, называемых иммуностимулирующими комплексами (ISCOMs), ISCOMs, которые обычно также включают фосфолипид.

3dMPL (также известный как 3 де-О-ацилированный монофосфорил липид А или 3-О-деацил-4'-монофосфорил липид А) является адьювантом, в котором положение 3 восстанавливаемого конечного глюкозамина в монофосфорил липиде А было деацилировано. 3dMPL был получен из безгептозного мутанта *Salmonella Minnesota*, и является химически схожим с липидом А, но не имеет кислотнестойчивую фосфорильную группу и лабильную по отношению к основанию ацильную группу.

3dMPL может принимать форму смеси взаимосвязанных молекул, с изменением их ацилирования (например, имеющих 3, 4, 5 или 6 ацильных цепей, которые могут иметь различную длину).

Известны различные эмульсии масло-в-воде с адьювантной активностью. Они обычно включают по крайней мере одно масло и по крайней мере одно поверхностно-активное вещество, при этом масло(а) и ПАВ(ы) являются биоразлагаемыми (метаболизуемыми) и биосовместимыми. Капли масла в эмульсии, как правило, имеют субмикронные диаметры, при этом малые размеры достигаются с помощью микрофлюидизатора для получения стабильных эмульсий. Капли с размером менее чем 220 нм являются предпочтительными, так как они могут подвергаться стерилизации фильтрованием.

Конкретные адьюванты, представляющие собой эмульсию масло-в-воде, используемые с данным изобретением, включают, но не ограничиваются:

Субмикронная эмульсия сквалена, Tween 80 и Span 85. Композиция эмульсии по объему может включать около 5% сквалена, около 0,5% полисорбата 80 и около 0,5% Span 85. В весовых единицах эти соотношения составляют 4,3% сквалена, 0,5% полисорбата 80 и 0,48% Span 85. Этот адьювант известен как 'MF59', как описано более подробно в части 10 Powell & Newman и части 12 O'Hagan. Эмульсия MF59 преимущественно включает цитратные ионы, например 10 мМ буфер цитрата натрия.

Эмульсия сквалена, токоферола и Tween 80. Эмульсия может включать фосфатно-буферный солевой раствор. Она также может включать Span 85 (например, в количестве 1%) и/или лецитин. Эти эмульсии могут содержать от 2 до 10% сквалена, от 2 до 10% токоферола и от 0,3 до 3% Tween 80, и весовое соотношение сквалена и токоферола составляет предпочтительно ≤ 1 , так как это обеспечивает более стабильную эмульсию. Сквален и Tween 80 могут присутствовать в объемном соотношении около 5:2. Одна из таких эмульсий может быть получена растворением Tween 80 в PBS с образованием 2% раствора, дальнейшего смешивания 90 мл этого раствора со смесью (5 г DL- α -токоферола и 5 мл сквалена), и последующей микрофлюидизацией смеси. Полученная эмульсия может иметь капли масла субмикронного размера, например, со средним диаметром от 100 до 250 нм, предпочтительно около 180 нм.

Эмульсия сквалена, токоферола и детергента Triton (например, Triton X-100). Эмульсия может также включать 3d-MPL. Эмульсия может содержать фосфатный буфер.

Эмульсия, включающая полисорбат (например, полисорбат 80), детергент Triton (например, Triton X-100) и токоферол (например, α -токоферол сукцинат). Эмульсия может включать эти три компонента при массовом соотношении около 75:11:10 (например, 750 μ г/мл полисорбата 80, 110 μ г/мл Triton X-100 и 100 μ г/мл α -токоферол сукцината), и эти концентрации должны содержать любой вклад этих компонентов от антигенов. Эмульсия может также включать сквален. Эмульсия может также содержать 3d-MPL. Водная фаза может содержать фосфатный буфер.

Вакцины против гриппа

Изобретение особенно подходит для получения вакцин против вируса гриппа. В настоящее время доступными являются различные формы вакцины против вируса гриппа, см., например, главы 17 и 18, Plotkin & Orenstein (Vaccines, 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0). Они, как правило, основаны на живом вирусе или на инактивированном вирусе. Инактивированные вакцины могут быть основаны на целых вирионах, «сплит» вирионах или на поверхностно-очищенных антигенах (включая гамагглютинин). Антигены гриппа могут также находиться в форме виросом (вирусоподобных липосомальных частиц, не содержащих нуклеиновую кислоту). Также могут использоваться антигены, очищенные от рекомбинантного хозяина (например, в линии клеток насекомых с использованием вектора бакуловируса).

Химические средства инактивации вируса включают обработку эффективным количеством одного или более следующих агентов: детергентов, формальдегида, β -пропиолактона, метиленового синего, псоралена, карбоксифуллерена (C60), вторичного этиламина, ацетилэтиленимина или их комбинаций. Нехимические способы вирусной инактивации известны из уровня техники, такие как, например, УФ излучение или гамма-облучение.

Вирионы могут быть получены из вирус содержащих жидкостей различными способами. Например, способ очищения может включать зональное центрифугирование с использованием раствора с линейным градиентом сахарозы, который содержит детергент для разрушения вирионов. Антигены затем могут быть очищены с помощью диафильтрации после необязательного разбавления.

Сплит-вирионы получают обработкой очищенных вирионов детергентами (например, этиловым эфиром, полисорбатом 80, дезоксихолатом, три-N-бутилфосфатом, Triton X-100, Triton N101, цетилтриметиламмонийбромидом и т.п.) для получения композиций субвирионов, включая способ «Твин-эфир» расщепления. Способы расщепления вирусов гриппа хорошо известны из уровня техники, например, WO02/28422, WO02/067983, WO02/074336, WO01/21151, WO02/097072, WO2005/113756 и т.п. Расщепление вируса обычно осуществляется с помощью разрушения или фрагментации целого вируса, как инфекционного, так и неинфекционного расщепляющим агентом с разрушающей концентрацией. Разрушение приводит к полной или частичной солюбилизации вирусных белков, изменяющей целостность вируса. Предпочтительными расщепляющими агентами являются неионные или ионные (например, катионные) поверхностно-активные вещества, например, алкилгликозиды, алкилтиогликозиды, ацильные сахара, сульфобетаины, бетаины, полиоксиэтиленалкиловые эфиры, N,N-диалкилглюкамиды, Несameg, ал-

килфенокси-полиэтоксизтанола, четвертичные аммониевые соединения, саркозил, ЦТАБы (цетилтриметиламмонийбромиды), три-N-бутилфосфат, Cetavlon, миристилтриметиламмониевые соли, липофектин, липофектамин, и DOT-MA, октил- или нонилфеноксиполиэтоксизтанола (например, Triton ПАВы, такие как Triton X-100 или Triton N101), полиоксиэтиленовые эфиры сорбитана (Tween ПАВы), полиоксиэтиленовые простые эфиры, полиоксиэтиленовые сложные эфиры и т.п. Одна из удобных методик расщепления основана на использовании последовательных воздействий дезоксихолата натрия и формальдегида, и расщепление может происходить в ходе первоначальной очистки вириона (например, растворе с градиентом плотности сахарозы). Таким образом, способ расщепления может включать очистку вирион-содержащего материала (для удаления невирионного материала), концентрирование полученных вирионов (например, с использованием метода адсорбции), такой как адсорбция CaHPO_4 , отделение цельных вирионов от невирионного материала, расщепление с использованием расщепляющего агента на стадии центрифугирования в градиенте плотности (например, с использованием градиента сахарозы, который содержит расщепляющий агент, такой как дезоксихолат натрия), и затем фильтрацию (например, ультрафильтрацию) для удаления нежелательных материалов. Сплит-вирионы могут эффективно быть ресуспендированы в изотоническом растворе хлорида натрия, забуференном фосфатом натрия.

Вакцины поверхностно-очищенных антигенов включают поверхностные антигены гриппа, гемагглютинин, как правило, также нейраминидазу. Способы получения этих белков в очищенной форме хорошо известны из уровня техники.

Штаммы вируса гриппа для использования в вакцинах изменяются от сезона к сезону. В настоящий межпандемический период вакцины, как правило, включают два штамма вируса гриппа А (H1N1 и H3N2) и один штамм вируса гриппа В, а трехвалентные вакцины являются типичными. В изобретении может также использоваться NA из пандемических штаммов (т.е. штаммы, к которым пациент, получающий вакцину, и вся человеческая популяция иммунологически интактна), таких как H2, H5, H7 или H9 подтипы штаммов (в частности вируса гриппа А), и вакцины против гриппа для пандемических штаммов могут быть моновалентными или могут быть основаны на нормальной трехвалентной вакцине, дополненной пандемическим штаммом. В зависимости от сезона и от природы антигена, включенного в вакцину, однако, изобретение может защищать от одного или более гемагглютинина вируса гриппа А подтипов H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 или H16.

Будучи пригодными для иммунизации против межпандемических штаммов, композиции данного изобретения также особенно применимы для иммунизации против пандемических штаммов. Характеристиками штамма гриппа, которые дают ему возможность создавать вспышки пандемии, являются: (а) он содержит новый гемагглютинин по сравнению с гемагглютининами циркулирующих в настоящее время человеческих штаммов, т.е. гемагглютинин, который не был выражен в человеческой популяции в течение десяти лет (например, H2), или ранее никогда не встречался в человеческой популяции (например, H5, H6 или H9, которые, как правило, находятся только в популяциях птиц), так что человеческая популяция будет иммунологически интактна к гемагглютинину штамма; (b) он способен передаваться горизонтально в человеческой популяции; и (с) он является патогенным для человека. Вирус с гемагглютинином типа H5 является предпочтительным для иммунизации против пандемического гриппа, такого как штамм H5N1. Другие возможные штаммы включают H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 и H7N7, и любые другие потенциально возникающие пандемические штаммы. Внутри подтипа H5, вирус может входить в NA группы 1, NA группы 1', NA группы 2 или NA группы 3 (World Health Organization (2005) Emerging Infectious Diseases 11(10): 1515-21, при этом группы 1 и 3 являются особенно значимыми. Другими штаммами, антигены которых могут быть эффективно включены в композиции, являются штаммы, которые устойчивы к противовирусной терапии (например, устойчивы к оселтамивиру и/или занамивиру), включая устойчивые пандемические штаммы.

Композиции данного изобретения могут включать антиген(ы) одного или более (например, 1, 2, 3, 4 или более) штаммов вируса гриппа, включая вирус гриппа А и/или вирус гриппа В. Трехвалентная вакцина является предпочтительной, включая антигены двух штаммов вируса гриппа А и одного штамма вируса гриппа В.

Вирус гриппа может быть химерного штамма, и может быть получен методами обратной генетики. Таким образом, вирус гриппа А может включать один или более сегментов РНК из вируса А/PR/8/34 (обычно 6 сегментов из А/PR/8/34, причем сегменты NA и Н - из штамма вакцины, т.е. 6:2 реассортанты). Он также может включать один или более сегментов РНК из вируса А/WSN/33, или из любого другого вирусного штамма, используемого для получения реассортантных вирусов для препарата вакцины. Обычно изобретение защищает от штамма, который способен к передаче от человека к человеку, и, таким образом, геном штамма будет обычно включать по крайней мере один сегмент РНК, который берет начало от вируса гриппа млекопитающих (например, человека). Он может включать NS сегмент, который берет начало от вируса гриппа птиц.

NA является основным иммуногеном в инактивируемых вакцинах против гриппа в настоящее время, и дозы вакцин стандартизованы по отношению к уровням NA, обычно измеряемым с помощью одномерной радиальной иммунодиффузии (SRID). Существующие вакцины обычно содержат около 15 μg

НА на штамм, хотя более низкие дозы могут использоваться, например, для детей, или в случае пандемии, или при использовании адьюванта. Дробные дозы, такие как $1/2$ (т.е. 7.5 $\mu\text{г}$ НА на штамм), $1/4$ и $1/8$ были использованы, как и более высокие дозы (например, 3х или 9х дозы). Таким образом, вакцины могут включать от 0,1 до 150 $\mu\text{г}$ НА на штамм гриппа, предпочтительно от 0,1 до 50 $\mu\text{г}$, например 0,1-20 $\mu\text{г}$, 0,1-15 $\mu\text{г}$, 0,1-10 $\mu\text{г}$, 0,1-7.5 $\mu\text{г}$, 0,5-5 $\mu\text{г}$ и т.п. Особые дозы включают, например, около 15, около 10, около 7,5, около 5, около 3,8, около 1,9, около 1,5 и т.п. на штамм.

Для живых вакцин дозировка измеряется средней инфекционной дозой в тканевой культуре (TCID_{50}), а не содержанием НА, и TCID_{50} от 10^6 до 10^8 (предпочтительно, между $10^{6.5}$ - $10^{7.5}$) на штамм является типичной.

НА, используемый с данным изобретением, может быть природным НА, как обнаружен в вирусе, или может быть модифицирован. Например, известно модифицирование НА для удаления детерминант (например, гиперосновные области вокруг сайта расщепления между НА1 и НА2), которые делают вирус чрезвычайно патогенным у видов птиц.

После обработки вирион-содержащей композицией для разрушения ДНК клетки-хозяина (например, с помощью БПЛ), продукты распада предпочтительно удаляются из вирионов, например, с помощью анионообменной хроматографии. Если вирус гриппа был очищен для определенного штамма, он может быть соединен с вирусами из других штаммов, например, для создания трехвалентной вакцины, как описано выше. Предпочтительной является обработка каждого штамма в отдельности и смешение моновалентных масс с получением конечной мультивалентной смеси, а не смешение вирусов и разрушение ДНК в мультивалентной смеси.

Общие сведения

Понятие "включающий" охватывает "содержащий", также как и "состоящий", например, композиция, "включающая" X, может состоять только из X или может содержать что-нибудь дополнительное, например X + Y.

Выражение "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, которая "по существу свободна" от Y может быть полностью свободна от Y. Там, где необходимо, выражение "по существу" может быть пропущено в описании изобретения.

Понятие "около" в связи с числовым значением x означает, например, $x \pm 10\%$.

Терминами "выделенный" и "очищенный" обозначены по крайней мере на 50% чистые, более предпочтительно на 70% чистые, или на 80% чистые, или на 90% чистые, или на 95% чистые, или более чем на 99% чистые.

Если конкретно не указано, то способ, включающий стадию смешения двух или более компонентов, не требует никакого особого порядка смешения. Таким образом, компоненты могут быть смешаны в любом порядке. Там, где присутствуют три компонента, затем два компонента могут быть соединены друг с другом, и потом комбинация может соединяться с третьим компонентом и т.п.

Если используются материалы, полученные из животных (и в особенности крупного рогатого скота), в культуре клеток, их следует получать из источников, которые свободны от передающихся губчатых энцефалопатии (TSEs), и в частности, свободны от губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE). В целом, предпочтительным является культивирование клеток при полном отсутствии материалов животного происхождения.

Если соединение вводится в организм как часть композиции, тогда такое соединение может в качестве альтернативы быть заменено на подходящее пролекарство.

Когда клеточный субстрат используется для рекомбинации или методов обратной генетики, предпочтительным является, чтобы это было одобрено для использования в производстве человеческой вакцины, например, как в Ph Eur general chapter 5.2.3.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 и 2 показывают результаты ПЦР амплификации 6 названных мишеней в геноме MDCK. Некоторые образцы были разбавлены, как указано, до 1:10000 перед ПЦР.

Фиг. 3 показывает результаты ПЦР амплификации SINE последовательностей в MDCK геноме. Как на фиг. 1 и 2, ДНК была иногда разбавлена перед ПЦР. На нижней части числами обозначены исходное количество ДНК в ПЦР (фг).

Фиг. 4 показывает эффект обработки ДНК MDCK с помощью БПЛ. Геномную ДНК инкубировали с БПЛ при различной температуре и в течение различных интервалов времени.

Фиг. 5 показывает похожие результаты. Агарозные гели были окрашены SYBRGoId.

Фиг. 6 показывает капиллярный электрофорез остаточной ДНК (верхняя линия) по отношению к маркерам (нижняя линия), имеющей указанные размеры.

Варианты осуществления изобретения

Вирусы гриппа (A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Panama/2007/99(H3N2); B/Jiangsu/10/2003; A/Wyoming/3/2003(H3N2)) были выращены в MDCK клетках в суспензионной культуре, согласно WO97/37000, WO03/23025 и WO04/92360. Конечная культуральная среда была очищена для получения вирионов, которые были затем подвергнуты хроматографии и ультрафильтрации/диафильтрации. Ви-

рионы в полученном материале были инактивированы с помощью β -пропиолактона (конечная концентрация 0.05% v/v; инкубировали в течение 16-20 ч при 2-8°C и затем гидролизировали с помощью инкубации при 37°C в течение 2-2,5 ч). Затем использовали ЦТАБ для расщепления вирионов, и дальнейшие различные стадии способа привели к конечной моновалентной вакцине, содержащей очищенные поверхностные белки.

ДНК MDCK была охарактеризована для оценки ее; количества, размера и целостности на трех стадиях способа производства: (А) после стадии ультрафильтрации/диафильтрации; (В) после обработки β -пропиолактоном; и (С) в конечной моновалентной массе. Для исследования размера, целостности и биологической активности любой остаточной геномной ДНК были использованы капиллярный гель-электрофорез и амплификация нуклеиновых кислот.

Определение размера

Как упомянуто выше, размер остаточной ДНК клетки-хозяина был проанализирован на стадиях (А), (В) и (С) с помощью капиллярного гель-электрофореза. Анализ был выполнен на пяти отдельных вирусных культурах.

500 μ л образцы были взяты на этих трех стадиях и обработаны 10 μ л протеиназы К при 56°C в течение от 16 до 22 ч, за которыми следовала экстракция общей ДНК с использованием набора для экстракции ДНК (Wako Chemicals) при следовании инструкции производителя. ДНК была ресуспендирована в 500 μ л ультрачистой воды для электрофореза на P/ACE MDQ Molecular Characterization System (Beckman Coulter) при постоянной температуре 20°C. Были использованы одиннадцать маркеров с молекулярным весом от 72 до 1353 пар оснований. Предел обнаружения (ПО) нуклеиновых кислот для этого метода составлял 0,7 пг/мл.

На основании размера маркеров и относительной плотности цепей ДНК, были определены распределение и размер фрагментов ДНК и присвоены четырем категориям с различными размерами в пределах от <200 по t >1000 по. Фиг. 6 показывает капиллярный электрофорез образца на стадии (С). Анализ показывает, что вся определяемая остаточная ДНК в этом образце имеет длину по существу меньше, чем 200 по.

Средние значения результатов из пяти культур показаны в следующей таблице:

Стадия	Количество ДНК	<200 по	200-500 по	500-1000 по	>1000 по
А	47 мг	25%	12%	6%	55%
В	5 мг	79%	18%	3%	4%
С	0.07 мг	>99%	<ПО	<ПО	<ПО

Обработка БПЛ, таким образом, приводит к десятикратному уменьшению количества ДНК, но также отодвигает распределение от длинных последовательностей по направлению к малым фрагментам <200 по. Дальнейшее проведение процесса, между стадиями (В) и (С), включая стадии хроматографии и ультрафильтрации, понижает уровни общей ДНК приблизительно в 70 раз, и удаляет всю определяемую ДНК >200 по.

Амплификация ДНК

Трансформация неопластической клетки представляет собой явление, часто ассоциируемое с модифицированными протоонкогенами и/или модифицированными генами опухолевых супрессоров. Последовательности из нескольких таких генов собак были проанализированы с помощью ПЦР до и после обработки БПЛ, т.е. на стадиях (А) и (В). Кроме того, ДНК из неинфицированных клеток MDCK была обработана и исследована. Исследованными протоонкогенами были: H-ras и m-tus. Исследованными генами опухолевых супрессоров были: p53; p21/waf-1; и PTEN. Кроме того, повторяющиеся SINE последовательности были проанализированы с помощью ПЦР. Большое число копий SINEs облегчает чувствительную детекцию.

Во все образцы было добавлено известное количество внешней контрольной ДНК (фрагмент pUC19) для мониторинга качества пробоподготовки и ПЦР. Во всех экспериментах наблюдали последовательное увеличение пика, показывающее, что остаточный гидролизованный БПЛ и побочные продукты, присутствующие в ПЦР-смесях, не имеют ингибиторного действия на образец и обеспечивают достаточное качество пробоподготовки и ПЦР. Образцы были разбавлены десятикратно до амплификации, до тех пор, пока продукты ПЦР возможно было определить, тем самым, показывая логарифмическое уменьшение уровня ДНК. Предел определения ПЦР анализа составляет 55 пг.

Продукты ПЦР были проанализированы с помощью агарозного гель-электрофореза. Фиг. 1 показывает результаты, полученные в неинфицированных MDCK клетках, а фиг. 2 показывает результаты, по-

лученные в ходе культивирования вируса. Все шесть анализируемых генов показали сильный сигнал амплификации перед обработкой БПЛ, но сила сигнала уменьшилась после воздействия БПЛ. Во всей исследованной партии продукции остаточная геномная ДНК МДСК была уменьшена по крайней мере в 2 раза по логарифмической зависимости после воздействия БПЛ.

Так как фиг. 2 показывает результаты на стадии (В), перед дальнейшим очищением результаты перепредставленной ДНК находятся в конечных вакцинах. Благодаря чувствительности при использовании SINE последовательностей ПЦР была также возможна на стадии (С) в конечной моновалентной массе. Результаты этого анализа показаны на фиг. 3. Амплификация ДНК на стадии (А) и (В) была относительно такая же, как для области SINE, показывающая, что БПЛ является менее активным в отношении меньших ДНК последовательностей. Даже для этих малых последовательностей, однако, существовало заметное уменьшение сигнала амплификации для всех анализируемых образцов. Сравнение интенсивностей ПЦР сигнала стадии отбора пробы (В) и (С) отражает уменьшение остаточной ДНК благодаря промежуточным стадиям очистки.

После экстраполяции анализа, основанного на генах, и непосредственно на основании анализа на основе SINE, в конечной вакцине ожидают уровень общей ДНК <1 нг на дозу и часто <100 пг на дозу.

Температура

Обработка БПЛ в ходе инактивации вируса имела 2 независимых стадии: (1) добавление БПЛ к вирион-содержащей смеси при 2-8°C; затем (2) повышение температуры до 37°C для осуществления гидролиза БПЛ. Были исследованы эффекты двух стадий БПЛ на инактивацию ДНК МДСК и фрагментацию.

Очищенная геномная ДНК из неинфицированных МДСК клеток была обработана БПЛ с конечной концентрацией 0,05% (об./об.) при 2-8°C в течение 16 ч или при 37 или 50°C в течение до 6,5 ч. Фрагментацию ДНК затем контролировали, и результаты показаны на фиг. 4. Эти эксперименты выявили активность БПЛ против клеточной ДНК, но неинфицированные клетки не отражают состояние МДСК после вирусного роста, так как клеточная ДНК является уже весьма фрагментированной из-за апоптоза.

При 2-8°C различие между необработанной и обработанной ДНК на агарозном геле было незначительным, что указывает на то, что фрагментация ДНК с помощью БПЛ может по существу не происходить при этих условиях. В противоположность этому, ДНК была сильно модифицирована как при 37°C, так и при 50°C, при этом более высокая температура приводила к ускоренной кинетике реакции. ДНК из неинфицированных клеток показала относительно четкую полосу на агарозном геле с легким пятном продуктов распада (фиг. 5, дорожка 3). После короткой инкубации с БПЛ при 37°C, однако, ДНК МДСК смазывалась с гелевых борозд и интенсивность сигнала полосы уменьшалась (фиг. 5, дорожка 2). Более длительные периоды инкубации приводили к исчезновению больших молекул геномной ДНК и повышали фрагментацию ДНК МДСК.

В дальнейших экспериментах БПЛ сначала инкубировали с клетками при 4°C в течение 16 ч. В первой популяции температуру поднимали до 37°C в течение 2 ч; во второй популяции БПЛ удаляли с помощью фильтрующей центрифуги и затем температуру повышали. Намного более низкие (>2 раза ниже по логарифмической зависимости) уровни остаточной ДНК наблюдали в первой популяции.

Таким образом, фрагментация ДНК, наблюдаемая в ходе обработки БПЛ, как оказалось, происходит главным образом в ходе стадии гидролиза БПЛ при 37°C, а не в ходе стадии вирусной инактивации при 2-8°C.

Будет понятно, что изобретение было описано только на примере, и могут быть сделаны модификации, в то же время остающиеся в пределах сущности и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения субвирионной вакцины против вируса гриппа, включающей иммуногенные белки, полученные из вируса гриппа, размноженного на клеточной культуре, включающий:

(i) добавление алкилирующего агента для разрушения остаточной функциональной ДНК клеточной культуры и также для инактивации вируса;

(ii) разрушение или фрагментирование цельного вируса с помощью разрушающей концентрации расщепляющего агента и

(iii) отделение иммуногенных белков.

2. Способ по п.1, где указанный алкилирующий агент представляет собой β-пропиолактон (БПЛ).

3. Способ по п.2, где указанную остаточную ДНК клеточной культуры разрушают с помощью обработки менее чем 0,1% β-пропиолактона (БПЛ).

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, где полученная вакцина обладает пониженным уровнем агрегации.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, где стадия (iii) включает отделение ДНК от вирионов.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где клеточная культура выбирается из группы, состоящей из МДСК клеток, Vero клеток и PER.C.6 клеток.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где расщепляющий агент представляет собой неионное или ионное поверхностно-активное вещество.

8. Способ по п.7, где расщепляющий агент на стадии (ii) представляет собой цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ).

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, где субвирионная вакцина представляет собой сплит-вакцину.

10. Способ по любому из пп.1-8, где субвирионная вакцина представляет собой вакцину на основе очищенных вирусных белков.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, где иммуногенные белки представляют собой вирусные антигены, выбранные из группы, состоящей из гемагглютинина (НА), нейраминидазы (НА), нуклеопротеина (NP), матричного белка (М1), мембранного белка (М2), одного или более компонентов транскриптазы (PB1, PB2 и PA).

12. Способ по п.11, где иммуногенный белок представляет собой гемагглютинин (НА).

13. Способ по п.11, где иммуногенный белок представляет собой нейраминидазу (НА).

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, кроме того, содержащий стадию включения иммуногенных белков в вакцину.

15. Способ получения вакцины против вируса гриппа в форме одного или более очищенных вирусных белков, отличающийся тем, что проводятся следующие стадии:

(i) размножение вирусов на клеточной культуре;

(ii) инактивация вируса посредством обработки алкилирующим агентом, где алкилирующий агент также применяется для разрушения ДНК клетки-хозяина;

(iii) расщепление вируса с помощью разрушающей концентрации расщепляющего агента;

(iv) очищение вирусных белков и

(v) включение в вакцину.

16. Способ по п.15, включающий стадии:

(i) размножения вирусов на клетках MDCK в суспензии;

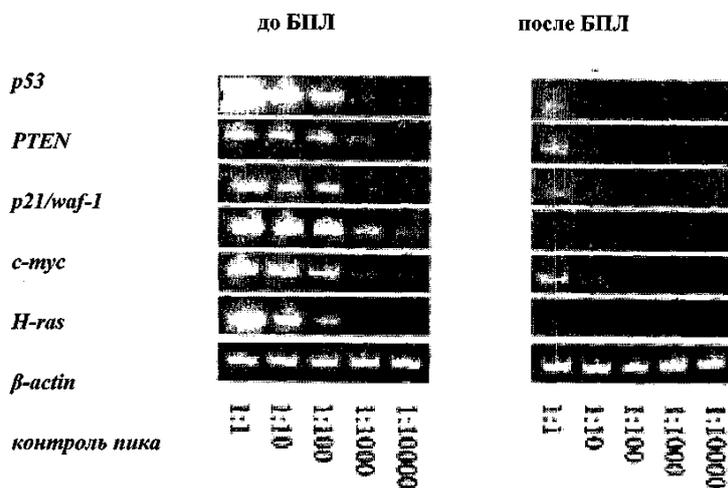
(ii) осветления культуральной среды с получением вирионов;

(iii) подвергания вирионов, полученных на стадии (ii), хроматографии и ультра-фильтрации/диафильтрации;

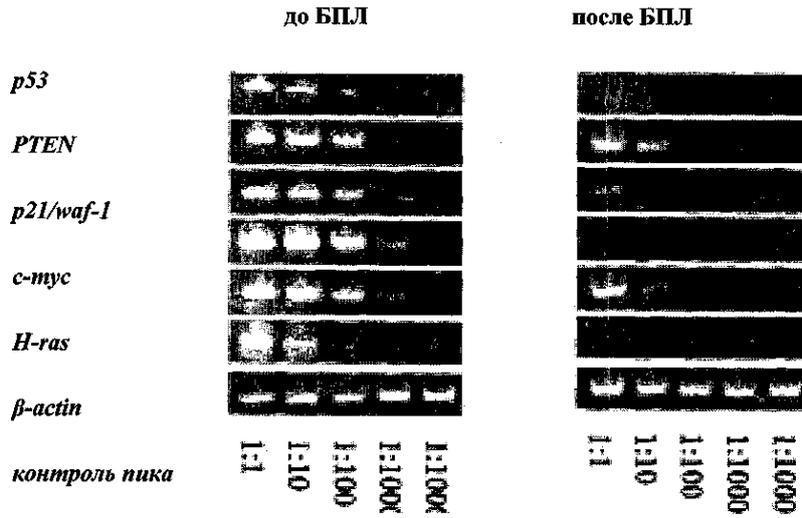
(iv) инактивации вирионов β -пропиолактоном;

(v) расщепления вирионов цетилтриметиламмонийбромидом (ЦТАБ) и

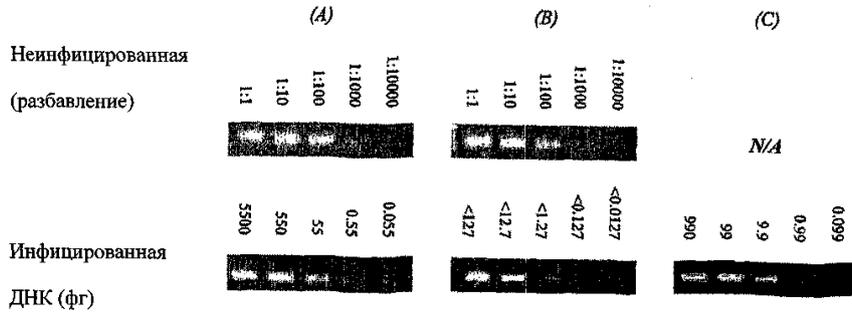
(vi) включения сплит-вирионов в вакцину.



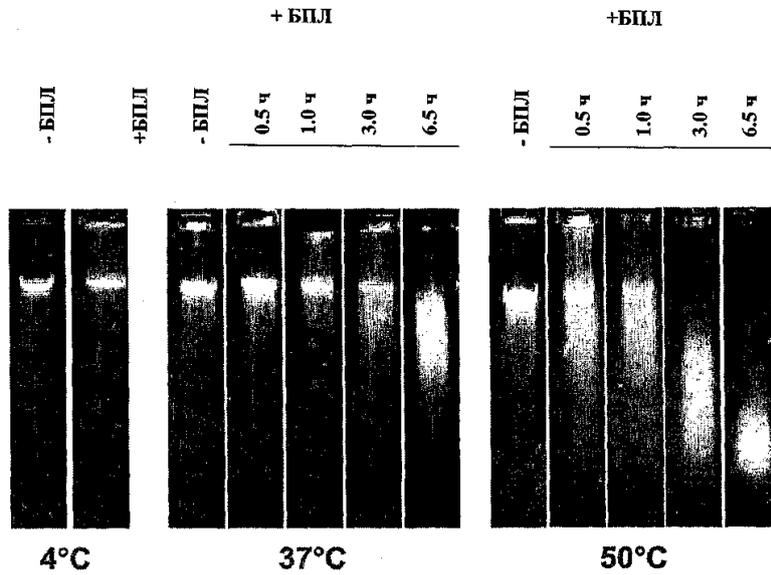
Фиг. 1



Фиг. 2



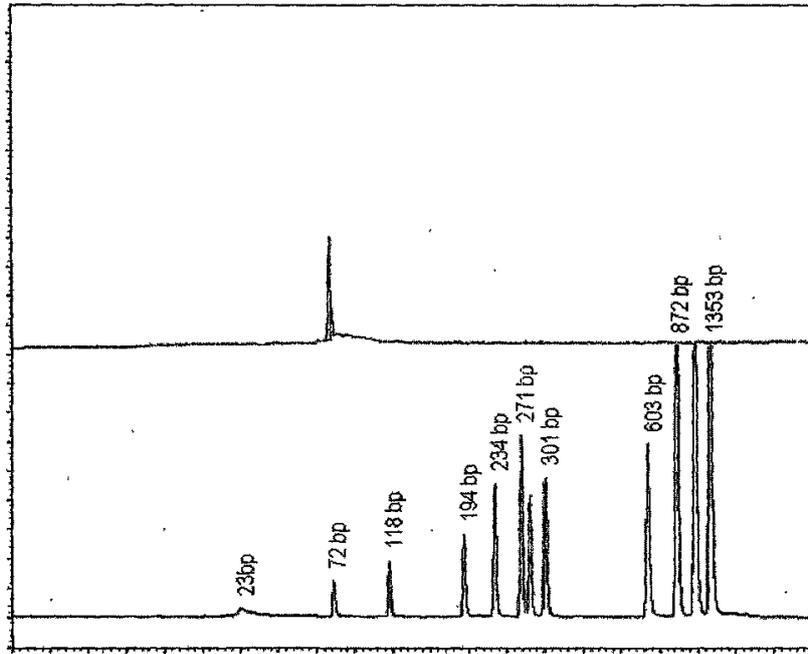
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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