

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 031988

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2019.03.29

(21) Номер заявки

201500275

(22) Дата подачи заявки

2013.08.30

(51) Int. Cl. A61K 39/008 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A23L 3/015 (2006.01)

---

### (54) ГИПЕРБАРИЧЕСКОЕ УСТРОЙСТВО И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН И ПОВТОРНО СВЕРНУТЫХ/ СОЛЮБИЛИЗИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

---

(31) 61/694,968; 61/830,425

(32) 2012.08.30; 2013.06.03

(33) US

(43) 2015.07.30

(86) PCT/US2013/057426

(87) WO 2014/036345 2014.03.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

МЕРИАЛ, ИНК. (US); ТОП  
ЭНДЮСТРИ С.А.С. (FR)

(72) Изобретатель:

Карбулек Никола Пьер Ив, Мериан  
Жильда, Лабатю Рене, Жерант  
Лионель (FR)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(56) HERNANDO-SAIZ ET AL.: "Advances in design for successful commercial high pressure food processing", FOOD AUSTRALIA, NORTH SYDNEY, AU, vol. 60, no. 4, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 154-156, XP009175699, ISSN: 1032-5298, the whole document

MARTIN M.F. SAN ET AL.: "Food processing by high hydrostatic pressure", CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION, TAYLOR & FRANCIS, USA, vol. 42, no. 6, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 627-645, XP009175698, ISSN: 1040-8398, pages 628-630

ZIMMERMAN F. ET AL.: "ISOSTATIC HIGH-PRESSURE EQUIPMENT FOR FOOD PRESERVATION", FOOD TECHNOLOGY, INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, CHICAGO, IL, US, vol. 47, no. 6, 1 June 1993 (1993-06-01), pages 162-163, XP000372669, ISSN: 0015-6639, the whole document  
WO-A2-2004000451  
WO-A1-2011091860  
US-A1-2002076347

QORONFLEH ET AL.: "Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 55, no. 2, 8 September 2007 (2007-09-08), pages 209-224, XP022238126, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/J.PEP.2007.05.014, page 216, left-hand column, paragraph 4 - page 222, left-hand column, paragraph 1, figure 5

B1

031988

(57) Изобретение относится к гипербарическим устройствам для инактивации микроорганизмов и вирусов при сохранении их иммуногенности и для создания и производства растворимых, дезагрегированных, повторно свернутых или активных иммуногенных или терапевтических белков из телец включения, полученных из прокариот или эукариот. Изобретение охватывает способы гипербарической инактивации патогенных организмов и способы получения вакцинных композиций с использованием инактивированных патогенных микроорганизмов. Инактивированные гипербарической обработкой микроорганизмы являются более безопасными и более иммуногенными, чем химически инактивированные микроорганизмы. Аналогичным образом, солюбилизированные белки обладают превосходящими свойствами по сравнению с более сильно агрегированными белками, включая снижение неспецифических иммунных реакций.

031988  
B1

### **Включение ссылкой**

Изобретение заявляет приоритет по предварительным заявкам США с серийными номерами заявок № 61/694968, поданной 30 августа 2012 г., и № 61/830425, поданной 3 июня 2013 г., каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Все документы, цитируемые или упоминаемые в настоящем документе, вместе с любыми инструкциями производителя, описаниями, характеристиками продуктов и листами описания продуктов, касающимися любых продуктов, упомянутых в настоящем документе или в любом документе, включенном сюда посредством ссылки, включены сюда посредством ссылки и могут быть использованы в практическом осуществлении изобретения.

### **Область техники изобретения**

Изобретение относится к гипербарическим устройствам и способам их использования с целью инактивации микроорганизмов и/или вирусов для применения в иммуногенных/вакцинных композициях и с целью рефолдинга и/или солюбилизации рекомбинантных белков для применения в терапевтических и иммуногенных/вакцинных композициях.

### **Уровень техники изобретения**

Ученые, занятые исследованиями пищевых продуктов, уже давно используют гипербарические условия для снижения микробной нагрузки пищевых продуктов. Биологи, занимающиеся разработками вакцин, также очень заинтересованы в инактивации микроорганизмов для их применения в вакцинальных препаратах. Однако чтобы сделать безопасную, эффективную вакцину, необходимо 1) полностью инактивировать патогенные микроорганизмы; и 2) сохранить иммуногенный потенциал организма (иммуногенность). Перед тем как было сделано настоящее изобретение, специалисту в данной области были известны определенные комбинации параметров давления, температуры и времени, которые могли бы использоваться для уменьшения количества жизнеспособных микроорганизмов, однако отсутствовал общепринятый способ для получения "подходящих для вакцины" инактивированных микроорганизмов. Для примеров снижения гипербарическим способом биологической нагрузки в пище, см., например, Isbarn, 2007 (грипп); Ritz, 2000 (салмонеллы); и Wilkinson, 2001 (полиовирус). До недавнего времени любое снижение иммуногенного потенциала микроорганизмами было просто случайно связано с поставленной целью снижения микробной нагрузки.

Что касается применения инактивации под действием высокого давления для производства вакцин, одна группа добилась хорошей инактивации *Leptospira interrogans*, серовар hardjo, действием на микроорганизмы давления до двух килобар в течение шестидесяти минут (Silva, 2001). Инактивированные лептоспирсы были способны вызывать иммунные ответы у кролика, хотя их способность вызывать защитный иммунный ответ у животного-мишени, такого как крупный рогатый скот, не была продемонстрирована. На сегодняшний день заявители не знают о каких-либо опубликованных результатах, демонстрирующих полный защитный иммунитет с помощью инактивированных давлением бактерий или протозойных паразитов. Для обзора см. Shearer et al., 2009. В дополнение к еще не полученным эффективным вакцинам с использованием способов гипербарической инактивации, в данной области до сих пор не производятся необходимые гипербарические устройства. Современные устройства высокого гидростатического давления (ВГД, high hydrostatic pressure (HHP)), разработанные для простого уменьшения микробной нагрузки, не способны полностью инактивировать патогенные микроорганизмы и сделать их применимыми в качестве вакцинных компонентов.

Кроме того, существующие гипербарические способы вносят неприемлемые неоднородные распределения температуры, что приводит к снижению выходов для сворачивания/солюбилизации белков и для способов инактивации патогенных микроорганизмов. Доступные устройства вызывают увеличения давления с помощью внешних насосов для введения дополнительной жидкости в сосуд фиксированного размера. По существу, насосы, расположенные вне сосуда, оказывают давление на воду, и, когда в сосуд вводится больше воды, давление возрастает, и расположение клапанов обеспечивает требуемое давление внутри камеры. Проблема распределения температуры связана с насосом, потому что при увеличении давления внутри насоса вода сильно нагревается. Под действием высокого давления горячая вода приводит к высокой степени неоднородности температуры. Данные устройства, таким образом, могут быть вполне достаточными для снижения патогенной нагрузки в пищевых продуктах, где точность регулирования температуры и давления не требуется, но такие устройства не могут эффективно применяться для рефолдинга/солюбилизации белка или инактивации патогенных микроорганизмов при сохранении их иммуногенного потенциала. Компании, работающие в данной области, включают Barofold (см., например, US 6489450, US 7064192, US 7538198, US 7767795, US 7829681, US 8329878 и US 20080161242A1) и Avure, которая выпускает гипербарические устройства для пищевой и перерабатывающей промышленности.

Поскольку известные из уровня техники устройства не позволяют оптимально управлять температурой и давлением, необходимы гипербарические устройства, предназначенные для обеспечения точного контроля над данными параметрами, служащие для облегчения инактивации патогенных микроорганизмов, сохраняющей иммуногенность, и рефолдинга/солюбилизации белков.

Поэтому заявители разработали специальные гипербарические способы и устройства для производства готовых для вакцины инактивированных микроорганизмов и для рефолдинга/солюбилизации име-

ющих коммерческое значение терапевтических и иммуногенных белков.

Цитирование или идентификация любого документа в данной заявке не является признанием того, что такой документ доступен в качестве уровня техники, предшествующего настоящему изобретению.

#### **Сущность изобретения**

Изобретение относится к гипербарическому устройству и способам его применения для: 1) инактивации микроорганизмов при сохранении их иммуногенности и 2) рефолдинга/солюбилизации рекомбинантных белков. Таким образом, первой задачей изобретения является создание гипербарического устройства для инактивации микроорганизмов и рефолдинга/солюбилизации белков. Другой задачей настоящего изобретения является создание способов использования гипербарического устройства для инактивации микроорганизмов и рефолдинга/солюбилизации белков. Третьей задачей данного изобретения является создание иммуногенных композиций, содержащих микроорганизмы, инактивированные гипербарической обработкой; и четвертая задача данного изобретения заключается в предоставлении иммуногенных и/или терапевтических белков, получаемых с помощью гипербарического устройства.

Инактивированные гипербарической обработкой микроорганизмы по настоящему изобретению являются в идеальном случае полностью инактивированными с сохранением их иммуногенного потенциала, являются безопасными и способны вызывать защитные иммунные реакции в животных-мишениях при вирулентной опасности. Аналогичным образом, полученные гипербарическим способом иммуногенные и/или терапевтические белки являются безопасными и эффективными при введении человеку и отличным от человека животным.

Следует отметить, что в данном описании и, в частности, в формуле изобретения такие термины, как "содержит", "содержащийся", "содержащий" и им подобные, могут иметь значение, приписываемое им в патентном законодательстве США; например, они могут означать "включает в себя", "включено", "включающий" и им подобные; и что такие термины, как "состоящий, по существу, из" и "состоит, по существу, из" имеют значение, определенное для них в патентном законодательстве США, например, они допускают, чтобы элементы явно не перечислялись, но исключают элементы, которые найдены в данной области техники или которые воздействуют на основную или новую характеристику изобретения.

Данные и другие варианты осуществления настоящего изобретения раскрыты или очевидны из приведенного ниже подробного описания и охвачены им.

#### **Краткое описание чертежей**

Следующее подробное описание, приведенное в качестве примера и не предназначеннное для ограничения изобретения описаными конкретными вариантами осуществления, может быть понято в сочетании с прилагаемыми чертежами, включенными в настоящее описание посредством ссылки, в которых

фиг. 1А изображает гипербарическое устройство в соответствии с изобретением;

фиг. 1В - типичный контейнер для мешочка с образцом;

фиг. 2А - гипербарическое прессовое устройство (1) для передачи давления на образцы. Жидкость поступает в камеру (3) высокого давления жидкости через выпускное отверстие (2), в то время как пневмоцилиндр/пистон (5) втянут. Плунжер (5) затем перемещается в указанное положение, и уплотнительная прокладка (6) и пробка (7) предотвращают выход жидкости из камеры (3) высокого давления жидкости. После завершения цикла(ов) повышения давления и понижения давления жидкость выходит через выпускное отверстие (4). Давление передается в камеру (8) первичной жидкости через камеру (9) усилиителя давления, которая получает воздух/жидкость под высоким давлением от устройства усилителя давления. Давление в камере (8) первичной жидкости направляется в камеру (3) высокого давления жидкости через плунжер (5);

фиг. 2В представляет собой трехмерную модель пресса (1) в соответствии с изобретением;

фиг. 3 - увеличенный вариант прессового устройства (1), с фокусом на камере (8) первичной жидкости. Различные компоненты обозначены и дополнительно описаны в разделе подробного описания ниже;

фиг. 4 - увеличенный вариант прессового устройства (1), с фокусом на плунжере (5). Различные компоненты обозначены и дополнительно описаны ниже;

фиг. 5 - увеличенный вариант прессового устройства (1), с фокусом на пробке (7). Различные компоненты обозначены и дополнительно описаны ниже;

фиг. 6 - схематическое изображение гипербарического устройства в соответствии с настоящим раскрытием, выполняющего цикл повышения давления/сброса давления на образце, содержащем патогенные микроорганизмы, предназначенные для инактивации, или пептиды, которые должны быть повторно уложены и/или солюбилизированы из бактериальных телец включения. 1) Продукт в камере, готовый для загрузки; 2) выдвижение зарядного цилиндра; 3) удаление образца из удерживающей камеры; 4) втягивание загрузочного цилиндра; 5) размещение образца в корпусе; 6) цилиндр продвигается для создания уплотнения, что позволяет заполнение мультиплликатора давления; 7) левый цилиндр продвигается для заполнения; 8) левый цилиндр продвигается дополнительно для герметизации камеры; 9) осуществление блока, что предотвращает левый цилиндр от втягивания; 10) правый цилиндр выдвигается дополнительно влево, чтобы увеличить давление; 11) давление сброшено; 12) блок снят; 13) левый цилиндр выведен для слива; 14) исходное положение для мультиплликатора давления; 15) выдвижение корпуса, чтобы раз-

грузить образец; 16) выдвижение зарядного цилиндра;

фиг. 7 - блок-схему с изложением безопасной работы гипербарического устройства;

фиг. 8 - блок-схему, изображающую действия, которые должны быть предприняты в случае отказа/разрыва мешочка с микроорганизмами внутри камеры устройства высокого давления;

фиг. 9 - схематическое изображение предполагаемых защитных антигенов Leptospira;

на фиг. 10 представлены результаты вестерн-блота для суспензий лептоспир, предварительно подвергнутых химической, гипербарической инактивации или не подвергнутых инактивации. Штаммы: L.canicola, L.ictero. Антигены: LipL32, LipL41 и LipL46;

на фиг. 11 - результаты вестерн-блота для суспензий лептоспир, предварительно подвергнутых химической, гипербарической инактивации или не подвергнутых инактивации. Штаммы: L.canicola, L.ictero. Антигены: LigA и LigB;

на фиг. 12 - результаты вестерн-блота для суспензий лептоспир, предварительно подвергнутых химической, гипербарической инактивации или не подвергнутых инактивации. Штамм: L.grippotyphosa. Антигены: LipL32, LipL41 и LipL46;

на фиг. 13 - результаты вестерн-блот для L.grippotyphosa, предварительно подвергнутых химической, гипербарической инактивации или не подвергнутых инактивации. Антигены: LigA и LigB;

фиг. 14А и 14В изображают количественную оценку данных вестерн-блота. Как и прежде, L.grippotyphosa (А) и L.icterohaemorrhagiae (В) предварительно подвергались химической, гипербарической инактивации или не подвергались инактивации. Антиген: липополисахариды (ЛПС). Блоты оценивали количественно, используя Pixel (техника LICOR);

фиг. 15 представляет собой график, представляющий гипербарическую инактивацию бактерий с использованием различных комбинаций температуры и давления. Несмотря на то что бактерии были первоначально эффективно инактивированы, они восстанавливают жизнеспособность для каждого набора условий;

на фиг. 16 представлены экспериментальные условия температуры и давления, приводящие к получению инактивированных гипербарической обработкой бактерий, которые не смогли восстановить жизнеспособность;

на фиг. 17 - FACS клеток, инактивированных с помощью формалина (две дискретные популяции бактерий), мертиолата (небольшая неоднородность), либо гипербарической обработкой (полная однородность);

фиг. 18 представляет P65-флуоресцентное мечение обработанных формалином, мертиолатом и подвергнутых гипербарической обработке Erysipelothrix rhusiopathiae. Почти 100% инактивированных гипербарической обработкой клеток помечены;

на фиг. 19 представлены вестерн-блоты, показывающие гуморальное распознавание сывороток от мышей, вакцинированных инактивированными формалином, гипербарической обработкой или мертиолатом principle actives ("активное начало", РА). Как указано, инактивированный формалином РА не вызывает Mab-специфический ответ, в то время как инактивированный гипербарической обработкой, так и инактивированный мертиолатом РА вызывают специфический ответ;

на фиг. 20 показано выживание в процентах и серология для мышей, вакцинированных разведениями E. rhusiopathiae, инактивированных формалином, мертиолатом или гипербарическими условиями;

на фиг. 21 - гуморальное распознавание сывороток от свиней, вакцинированных инактивированными формалином, гипербарической обработкой или мертиолатом РА из Erysipelothrix rhusiopathiae. Как указано, присутствуют диффузные полосы, соответствующие 60 и 75 кДа, аналогично исследованию с мышами;

на фиг. 22 - гуморальное распознавание сывороток от свиней, вакцинированных рекомбинантным белком SpaA. Как уже отмечалось, имеется несколько полос, соответствующих молекулярной массе, составляющей от около 65 до около 75 кДа, для вакцинированных (+) особей, но отсутствуют полосы для отрицательных контролей (-). Полученные результаты показывают, что вакцинация SpaA, инактивированного как гипербарической обработкой, так и мертиолатом (но не инактивированного формалином), вызывала у свиней производство антител, специфичных для Р65;

фиг. 23 представляет собой график, представляющий титры антител против E.rhusiopathiae после вакцинации различными вакцическими препаратами;

фиг. 24 - снимки сканирующей электронной микроскопии инактивированного термической и гипербарической обработкой концентрата Bordetella pertussis, подвергнутого воздействию давления в 4000 бар в течение 90 мин (правая сторона) и концентрата Bordetella pertussis, инактивированного мертиолатом (левая сторона) (увеличение X30000);

фиг. 25 изображает SDS-ПААГ образцов KSAC (сливый пептид из вида Leishmania), обработанных давлением в 3000 бар;

фиг. 26 - хроматограмму ВЭЖХ обработанного давлением в 3000 бар супернатанта KSAC, наложенную поверх хроматограммы белка KSAC, полученного с использованием классического способа рефолдинга/солюбилизации;

фиг. 27 показывает распределение размеров, полученное способом DLS, по интенсивности (сверху)

и численно (внизу). Показаны данные для подвергнутого воздействию давления в 3000 бар белка (светлая линия) и белка, полученного классическим рефолдингом (темная линия);

фиг. 28 - влияние давления и буфера на размер белка;

на фиг. 29 показано сравнение содержание растворимого белка KSAC, определенное с помощью ВЭЖХ и Qdot-блоттинга;

фиг. 30А-30Д изображают анализ Q-Dot-блоттинг образцов KSAC после обработок высоким давлением;

фиг. 31 - анализ ВЭЖХ образцов KSAC после обработки по способу А;

фиг. 32 - анализ ВЭЖХ образцов KSAC после обработки по способу В;

фиг. 33 - анализ ВЭЖХ образцов KSAC после обработки по способу А, по способу В и классическим способом.

#### **Подробное описание изобретения**

Изобретение относится к гипербарическому устройству для 1) инактивации микроорганизмов при сохранении их иммуногенности и 2) для рефолдинга/солюбилизации рекомбинантных белков. Таким образом, первой задачей настоящего изобретения является создание устройства для гипербарической инактивации "микроорганизмов", (которые в целях настоящего изобретения определяются как бактерии, простейшие, любые другие одноклеточные эукариоты, любые другие monerans и вирусы), при сохранении их иммуногенности. Устройства в соответствии с настоящим изобретением могут иметь средство для точного регулирования температуры и средство для точного регулирования давления.

В одном варианте осуществления устройства имеет средство для приема пакетов или других подходящих контейнеров, которые заполнены микроорганизмами предназначенными для инактивации. В устройство может быть встроен целый ряд средств для отбора проб и оценки уровня инактивации микроорганизмов. Все функции устройства можно регулировать с помощью подходящего пользовательского интерфейса и блока компьютерной обработки. В дополнение к инактивации микроорганизмов гипербарическое устройство может быть эффективно использовано в рефолдинге/солюбилизации неправильно свернутых и/или захваченных тельцами включения рекомбинантных белков. Описанное устройство обеспечивает значительное преимущество по сравнению с предыдущими технологиями, в частности, поскольку оно позволяет выполнять рефолдинг и солюбилизацию белка одновременно.

Данное раскрытие дополнительно относится к компьютерным моделям и способам моделирования распределения температуры внутри устройств высокого давления. Поддержание равномерного или однородного распределения температуры имеет важное значение для требовательных приложений, таких как инактивация патогенных микроорганизмов, сохраняющая их иммуногенность, и рефолдинг/солюбилизация белков. Высокоточные измерения температуры были сделаны во время эксплуатации существующих устройств высокого давления, и точки, соответствующие таким данным, были использованы для разработки модели распределения температуры, которая была утверждена в сравнении с фактическими измерениями, взятыми из существующих устройств, работающих при различных условиях температуры и давления. Вкратце, модель точно предсказывала распределение температуры внутри существующих сосудов, и поэтому модель была применена для разработки устройства высокого давления, способного минимизировать неоднородность распределения температур. Таким образом, в одном варианте осуществления описанные устройства свободны от неприемлемого изменения температуры.

Модель распределения температуры определяет выбор размерных параметров, в том числе длину трубки, толщину и т.п., с целью сведения к минимуму изменения температуры в камере высокого давления. В отличие от барокамер фиксированного размера, известных из предшествующего уровня техники, настоящее изобретение обеспечивает гипербарическое устройство на основе прессового плунжера, в котором размер камеры высокого давления не является постоянным за счет выдвижения и втягивания плунжера или поршневого пресса. Размер камеры, таким образом, уменьшается с ростом давления и увеличивается с уменьшением давления.

В одном варианте осуществления устройства в соответствии с настоящим изобретением содержат плунжер и механизм уплотнения для передачи давления на жидкость, включая воду, в камеру высокого давления. Повышенное давление преодолевает межмолекулярные (например, H<sub>2</sub>O с H<sub>2</sub>O) силы отталкивания, и при давлении в 6000 бар объем воды уменьшается приблизительно на десять процентов по отношению к условиям давления окружающей среды. Устройство по изобретению является особенно применимым для инактивации патогенных микроорганизмов, так как находящиеся под строгим контролем температура и давление могут быть использованы для стабилизации белков в их нативном состоянии (т.е. хорошо для сохранения иммуногенности), в то время как уничтожение/блокирование ферментативных активностей продолжается достаточно долго для того, чтобы сделать патогенные микроорганизмы неинфекционными. В особенном варианте осуществления микроорганизмы или патогенные микроорганизмы никогда не восстанавливаются после начального молекулярного повреждения, опосредованного гипербарической обработкой.

Аналогичным образом, точная настройка давления и температуры могут быть использованы, чтобы облегчить рефолдинг/солюбилизацию белка. Белок имеет специфический молекулярный объем, который определяется его трехмерной структурой, которая является функцией содержания присущих ему амино-

кислот, его вторичных структур и взаимодействия многих сил, включая взаимодействия ван-дер-Ваальса и электростатические взаимодействия, гидрофобные взаимодействия, водородные связи, дисульфидные мостики, температуру, давление и тому подобное. Когда белок неправильно свернут, его удельный объем, как правило, больше, чем в том случае, когда тот же самый белок свернут правильно. В одном варианте осуществления давление применяется точно, чтобы облегчить укладку белка, что приводит к снижению удельного объема белка.

В целях настоящего изобретения "правильно свернутый" означает белок в его нативной конфигурации, которая является конфигурацией, наиболее связанной с белком или приписываемой белку, когда она является компетентной для того, чтобы служить осуществлению основной структурной и/или функциональной роли белка. Например, рецептор клеточной мембраны находится в нативной конфигурации, когда он способен взаимодействовать с родственным лигандом(ами) для того, чтобы участвовать в деятельности передачи клеточных сигналов. Аналогичным образом, фермент находится в нативной конфигурации, когда он способен взаимодействовать с родственным субстратом(ами) и катализировать соответствующие реакции с ним(ми).

В одном варианте осуществления управляемый рефолдинг/солябилизация белка достигается первым применением давления для ограничения свободы движения развернутого белка (например, молекулярной вибрации и вращения). Тем не менее, слишком быстрое снижение давления может ограничить движение так, что белок не может принять нативную (правильно свернутую) конфигурацию. Таким образом, устройства в соответствии с изобретением должны иметь возможность тщательно контролировать давление и скорость, с которой изменяется давление (и, таким образом, применяться для биологических образцов), чтобы позволить 1) начальное определение условий идеального/оптимального рефолдинга/солябилизации; и 2) исполнение упомянутых условий для равноценных образцов в будущем.

В другом варианте осуществления может быть увеличена температура, чтобы увеличить движение и энергию (например, броуновское движение, внутримолекулярную вибрацию или межатомное движение), чтобы уменьшить время, необходимое для того, чтобы неправильно свернутый белок принял нативную конфигурацию.

В предпочтительных вариантах осуществления точные комбинации температуры и давления определяются для каждого типа биологического образца, чтобы свести к минимуму количество времени, необходимое для получения максимального процента правильно свернутых белков.

В другом варианте осуществления устройство является предпочтительным по сравнению с известными гипербарическими устройствами в том, что оно предусматривает контролируемые уменьшения давления, а также проведения обработки при постоянных давлениях. Белки, подвергнутые воздействию таких условий регулируемого давления, с большей вероятностью будут эффективно повторно сворачиваться в нативные конфигурации, по сравнению с белками, подвергнутыми быстрым и неконтролируемым снижениям давления (т.е. неконтролируемое снижение давления придает избыточную энергию белкам, что позволяет им перейти или перепрыгнуть к энергетически стабильным, но ненативным конфигурациям).

В некоторых вариантах осуществления раскрытое гипербарическое устройство содержит устройство из плунжера и цилиндра, которое уменьшает или устраняет количество нежелательного неправильного рефолдинга/солябилизации, позволяя, чтобы снижения давления были точно настроены и контролировались.

В одном варианте осуществления устройство имеет преимущество в том, что оно может быть легко и быстро обеззаражено. В конкретном варианте осуществления устройство является полностью GMP-совместимым, может быть открыто с обеих сторон и может быть очищено любым разумным способом, включая, но без ограничения, очистку паром.

Настоящее изобретение, таким образом, обеспечивает поршневое прессовое гипербарическое устройство, которое позволяет точный контроль и управление давлением и температурой, чтобы определить (и затем обеспечить) оптимальный баланс давления и температуры для получения максимального рефолдинга/солябилизации белка и, следовательно, выхода.

Те же свойства позволяют устройству также оптимизировать и применять эффективные комбинации давления и температуры для инактивации микроорганизмов/патогенных микроорганизмов при сохранении их иммуногенного потенциала. В некоторых вариантах осуществления гипербарическое устройство повышает иммуногенный потенциал микроорганизмов, которые оно инактивирует.

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает корпус для размещения гипербарического устройства (см. фиг. 1А). Корпус разработан с учетом как ограничения высокого давления, так и простоты очистки/дезактивации. Корпус может вместить любой коммерчески применимый объем и давление, включая, но не исключительно, до 4000, до 5000, до 6000, до 7000, до 8000, до 9000 или до около 10000 бар. Применимые действующие объемы включают в себя, например, 50 л или более.

В одном варианте осуществления устройства инактивации, размещенное внутри корпуса, может содержать два цилиндра, заключенные в металлическом каркасе. Устройство может принимать любую применимую конфигурацию в соответствии с данным изобретением и может занять общую форму, изображенную на фиг. 2А, 2В, 3 и 4.

В одном варианте осуществления, например, как показано на фиг. 2А, гипербарическое устройство содержит прессовое устройство (1) для передачи давления на образцы. Жидкость поступает в камеру (3) высокого давления жидкости через впускное отверстие (4), в то время как плунжер (5) усилителя давления втянут. Плунжер (5) затем выдвигается в указанное положение, а уплотнения (6) плунжера высокого давления и пробка (7), выдерживающая высокое давление, предотвращают выход жидкости из камеры (3) высокого давления жидкости. После завершения цикла(ов) повышения давления и понижения давления жидкость выходит через выпускное отверстие (2). Давление передается на камеру (8) первичной жидкости через верхнюю камеру усилителя (9). Давление в камере (8) первичной жидкости направляется в камеру высокого давления жидкости (3) с помощью плунжера (5).

В одном из вариантов осуществления прессовое устройство может включать в себя компоненты, как показано на увеличенных видах, приведенных на фиг. 3-5. Устройство может включать в себя уплотнительную крепежную пластину (20); основные крепежные винты (22а и б) плунжера; устройство (24а и б) для демонтажа держателя верхней камеры; устройство для демонтажа верхней камеры (25а); уплотнение (25б) верхней камеры; впускное отверстие (26) для ввода первичной жидкости; держатель (27а) нижней камеры; устройство для демонтажа держателя нижней камеры; и устройство (29а) для демонтажа нижней камеры.

В одном варианте осуществления может быть надет металлический каркас, с тем чтобы обхватить стержень поршневой камеры и мультиплликатор, так что данные два элемента остаются фиксированными, несмотря на силы, генерируемые давлением.

В конкретном варианте осуществления компактная конструкция сводит к минимуму распространение загрязнения в случае нарушения работы, особенно, при сравнении с более открытой конструкцией, требующей группу независимых и внешних источников давления. Кроме того, компактная конструкция позволяет избежать необходимости в наборе труб высокого давления, что потребовало бы частой замены многочисленных клапанов, что нежелательно в загрязняемой области.

В одном варианте осуществления усилитель давления и плунжер могут быть отделены от корпуса, чтобы позволить легкий доступ к внутренней части корпуса и легкую замену поршневых уплотнений в случае загрязнения. Мультиплликатор давления может предпочтительно работать в течение более длительных промежутков времени, к примеру, до около 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или около 20 ч или более.

В одном варианте осуществления размер всего устройства составляет около 7,4 м, высота составляет около 1,6 м, и ширина составляет около 2,2 м. В одном варианте осуществления устройство весит около 12700 кг. Любые другие разумные и коммерчески обоснованные монтажные размеры рассматриваются в данном описании, таким образом, специалист в данной области техники может изменить данные размеры, не выходя за пределы рутинной работы.

В одном варианте осуществления корпус полностью покрыт, чтобы ограничить осаждение пыли. Устройство может быть стерилизовано, например, введением аэрозоля перекиси водорода в камеру. Покрытия могут быть сняты в целях обеспечения тщательной очистки, и можно получить доступ через рабочие части к внутренней части устройства, в частности, чтобы дать возможность для замены уплотнителей.

В одном варианте осуществления корпус выполнен из устойчивого к загрязнению материала, в частности из нержавеющей стали. С высоким давлением 4000 бар в качестве примера сталь обладает идеальной высокой механической прочностью/целостностью. В одном из вариантов осуществления материалом может быть INCONEL 718.

В одном варианте осуществления внутренний диаметр камеры может составлять 150 мм, а наружный диаметр может составлять 440 мм. В данном варианте осуществления внутренний объем, равный 50 л, таким образом, дает свободную внутреннюю длину, составляющую около 2,8 м. При давлении в около 4000 бар сжимаемость воды составляет около 13%. К расчетам общей сжимаемости можно добавить воздушные карманы внутри образцов. В одном варианте осуществления свободная длина при атмосферном давлении была рассчитана с 20% сжатия или равной около 3,4 м. Это дает общую длину камеры, составляющую около 3,9 м, и массу, равную около 4900 кг.

В одном варианте осуществления устройство может предотвратить высвобождение потенциально загрязненной воды путем откачки воды, содержащейся в камере, а затем повторной герметизации концевых частей. Впускные и выпускные отверстия предусмотрены отверстиями, перпендикулярными оси корпуса. В конкретном варианте осуществления корпус является цельным.

В другом варианте осуществления уплотнительное средство для плунжера/цилиндра обеспечивается с одной стороны уплотнением (6) прессового поршня, с другой стороны пробкой (7). Оба уплотнительные средства могут быть выполнены из нержавеющей стали, имеющей высокую механическую прочность. Уплотнительное средство может быть также покрыто любым подходящим материалом или состоять из любого подходящего материала.

В одном варианте осуществления устройство перемещается в поперечном направлении, с тем чтобы позволить загрузку и разгрузку пакетов с образцами, содержащими микроорганизмы, белок, предназначенный для рефолдинга, и т.п. Пакеты с образцами могут перевозиться в контейнерах, которые последо-

вательно ввозят в устройство, как маленький поезд. Камера может быть расположена на колесах, движущихся по рельсам, при этом весь процесс приводится в действие поршнем.

В одном варианте осуществления устройства содержит усилитель давления, который может быть изготовлен из нержавеющей стали. Однако, поскольку усилитель давления не подвергают тем же жестким воздействиям, что и устройство поршень/цилиндр, усилитель может быть выполнен из специальной стали 1,4418. В одном варианте осуществления усилитель имеет форму цилиндра с наружным диаметром, равным 620 мм, и длиной, равной 1750 мм, весом, составляющим 2200 кг. Внутри находится поршень. Внутренний диаметр основной части равен 540 мм. Она содержит до 160 л масла. Данный объем подается от гидравлического блока 310 бар с расходом, составляющим 250 л/ч, и установленного за пределами комнаты. Давление в первом контуре равно 310 бар.

Ход поршня может составлять около 940 мм. В убранном положении он может быть полностью вынут из корпуса. Тем не менее, герметичное уплотнение в корпусе является доступным, чтобы позволить легкую замену или очистку, в виде уплотнения затвора, когда корпус подается в часть загрузки/разгрузки.

Центральная часть поршневого плунжера (5) может быть полой и может содержать магниты, чтобы обеспечить непрерывное и точное движение и измерение расположения поршня. В случае утечки через уплотнение, давление можно поддерживать продвижением поршня соответствующим образом для того, чтобы компенсировать утечку и обеспечить инактивацию. Уплотнение может быть заменено во время следующего открытия камеры.

В одном варианте осуществления исполнительный механизм позволяет боковое перемещение мультипликатора для облегчения очистки.

В другом варианте осуществления может быть предусмотрен лазер системы проверки, чтобы обеспечить надлежащее выравнивание камеры и цилиндров мультипликатора.

В другом варианте осуществления металлический каркас предназначен для поддержания камеры и мультипликатора на месте, когда последний оказывает давление в 4000 бар внутри корпуса. Каркас может состоять из нескольких конструкционных стальных перфорированных пластин. Отделочный сварной шов может быть использован для предотвращения проникновения жидкости или аэрозоля между пластинами. Устройство может быть покрыто защитной краской или другим подходящим защитным покрытием.

В одном варианте осуществления внешняя длина каркаса составляет около 6,8 м, высота составляет около 1,3 м, а его вес составляет около 5600 кг.

В другом варианте осуществления труба передает гидравлическую энергию от гидравлического блока. Труба может быть зафиксирована и может быть удалена, когда мультипликатор перемещают на техническое обслуживание.

В одном варианте осуществления в корпус поступает деминерализованная вода через трубу или подходящий трубопровод. Труба может быть гибкой и/или выдвижной, так что ее не нужно удалять во время переноса корпуса в положение загрузки/выгрузки. Может также присутствовать вторая труба или трубопровод, чтобы позволить введение сжатого воздуха для сушки камеры перед открытием. Часть выпускной трубы вблизи корпуса также может быть гибкой для приспособления к рабочему диапазону движения корпуса.

Эвакуация воды из корпуса производится в систему очистки воды здания. Даже при разрыве мешочка, когда давление на несущую конструкцию достигло 4000 бар, воду можно выпустить без дополнительной обработки.

Однако в случае недостижения несущей конструкции или малого времени удержания, вода будет сбрасываться в бак независимо, позволяя провести анализ, чтобы определить, было ли возможно загрязнение при разрыве мешочка, и провести специфическую обработку. То же самое будет для воды, используемой для промывки корпуса.

В одном из вариантов осуществления первой задачи изобретения гипербарическое устройство может быть расположено внутри корпуса, имеющего общую компоновку, как схематически показано на фиг. 1А. Гипербарическое устройство может быть предназначено для размещения и приема устройств удерживания образцов, как показано на фиг. 1В. Одним из важных признаков устройства является то, что микроорганизмы, являющиеся образцами, которые должны быть подвергнуты воздействию высокого давления, содержатся в эластичных мешочках, вместо того, чтобы "непосредственно подвергаться" (например, в виде суспензии концентрированных микроорганизмов) изменениям температуры и гидростатическим давлениям. Вместо этого суспензия концентрированных микроорганизмов может быть герметично закрыта внутри мешков с образцами, которые разработаны так, чтобы войти в держатель мешочка или приемник, как это показано на фиг. 1В. Такой подход к гипербарической инактивации микроорганизмов предоставляет множество преимуществ, включая последовательность обработки образца, простоту дезактивации оборудования (в случае разрыва мешочка), и снижает вероятность заражения партии (например, даже если мешочек загрязняется, остаток партии может оставаться чистым).

В другом варианте осуществления первой задачи изобретения устройство содержит поршневое прессовое устройство, такое как изображено на фиг. 2А. Гипербарическое устройство (1) передает кон-

тролируемые количества давления образцам. Давление первоначально передается камере (8) первичной жидкости через камеру (9) усилителя давления, которая получает воздух/жидкость под высоким давлением от устройства усилителя давления. Давление в камере (8) первичной жидкости передается в камеру (3) жидкости высокого давления через плунжер (5). До выдвижения плунжера (5) жидкость поступает в камеру (3) жидкости высокого давления через выпускное отверстие (2), в то время как пневмоцилиндр (5) втянут. Плунжер (5) затем выдвигается в положение, показанное на фиг. 2А, а уплотнение (6) и пробка (7) предотвращают выход жидкости из камеры (3) высокого давления жидкости. После завершения цикла(ов) повышения давления и понижения давления жидкость выходит через выпускное отверстие (4). В одном варианте осуществления гипербарическое устройство содержит компоненты, как указано на фиг. 3-6.

В конкретном варианте осуществления образцы могут быть обработаны гипербарическим устройством в соответствии со схемой, описанной на фиг. 7. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ рефолдинга/солюбилизации или дезагрегации белков или инактивации патогенных микроорганизмов при сохранении их иммуногенности, содержащий следующие стадии:

- 1) помещение образца в загрузочную камеру;
- 2) выдвижение зарядного цилиндра;
- 3) удаление образца из загрузочной камеры;
- 4) втягивание зарядного цилиндра;
- 5) размещение образца в камере высокого давления;
- 6) выдвижение правого цилиндра дает возможность для создания уплотнения, что позволяет заполнить мультиплликатор давления жидкостью;
- 7) расширение левого цилиндра;
- 8) выдвижение левого цилиндра дополнительно для герметизации камеры высокого давления;
- 9) позиционирование блока, который предотвращает втягивание левого цилиндра при применении давления;
- 10) выдвижение правого цилиндра дополнительно влево, чтобы увеличить давление;
- 11) сброс давления;
- 12) отвод блока;
- 13) отвод левого цилиндра, чтобы произвести дренаж жидкости;
- 14) возврат мультиплликатора давления в исходное положение;
- 15) выдвижение корпуса, чтобы выгрузить образец;
- 16) выдвижение зарядного цилиндра.

В одном варианте осуществления устройство, таким образом, включает в себя средство для приема держателей мешочеков и их доставки или позиционирования таким образом, чтобы подвергнуть их воздействию высокого гидростатического давления (high hydrostatic pressure (HHP)), производимого под действием изостатического прессового/поршневого устройства. Устройство содержит средство для подвергания мешочеков воздействию определенных температур и давлений в течение определенных периодов времени. Устройство может иметь локальную подачу циркулирующей воды, чтобы точно контролировать температуру в корпусе устройства. Температура корпуса и подача циркулирующей воды может изменяться, как показано в табл. 1. Устройство может применяться в широком диапазоне давлений, до, например, 7000, 8000, 9000 или 10000 бар. Устройство может содержать любое количество компонентов для достижения требуемых давлений и температур.

Таблица 1. Экстремальные и средние температуры внутри корпуса объемом 50 л в ответ на изменения начальной температуры корпуса и температуры технологической воды. Рmax = 3500 бар; V = 1000 бар/мин, длительность 1 ч, процесс 1 цикла: Рmax = 3500 бар, V = 1000 бар/мин, плато 1 ч, 1 цикл.

T воды (°C)	Локальная Т (°C)	Мин. Т (°C)	Макс. Т (°C)
15	18	12.75	23.68
15	20	13.57	23.68
15	22	14.38	23.68
15	24	14.99	23.69
15	26	14.91	23.69
20	18	15.65	28.84
20	20	16.47	28.84
20	22	17.28	28.84
20	24	18.10	28.84
20	26	18.913	28.84
25	18	18.56	33.99
25	20	19.37	33.99
25	22	20.19	33.99
25	24	21.0	33.99
25	26	21.82	33.99
27	15	18.5	36
27	27	23.38	36.05

В другом варианте осуществления первой задачи изобретения устройство дополнительно содержит

средство для дезактивации. Средство для дезактивации может обеспечить общую очистку, как это требуется для какого-либо устройства, используемого для производства биологического продукта фармацевтического класса, и/или может быть использовано для стерилизации устройства в случае разрыва мешочка с образцом.

В еще одном варианте осуществления устройства дополнительно содержит средство для контроля за состоянием инактивации образца (sample inactivation status monitoring (SISM)). Средство SISM может содержать иглы или другие подходящие устройства для зондирования, приспособленные к отбианию асептическим путем определенных частей образцов (из мешочков с образцами) в соответствующие моменты времени на протяжении процесса гипербарической инактивации. Таким образом, средство SISM может помочь пользователю устройства в определении, когда была достигнута полная инактивация микроорганизма. Средство SISM может дополнительно включать в себя любое количество автоматизированных анализов жизнеспособности, подходящих для определения статуса инактивации микроорганизмов. Устройство может быть предназначено для автоматической регулировки условий температуры и времени, основанной на данных, полученных с помощью средства SISM.

В вариантах осуществления, где не используется средство SISM, кинетические параметры для инактивации определяются в каждом конкретном случае, хранятся и используются повторно по мере необходимости. Во время QC-оценки (контроля качества), проводимой после инактивации, образцы могут быть определены как недостаточно инактивированные, и могут быть подвергнуты дополнительному раунду(ам) инактивации. Данные QC могут быть сохранены для регулировки кинетических параметров инактивации для данного типа и концентрации микроорганизмов.

Устройство обязательно имеет по меньшей мере один пользовательский интерфейс программируемого компьютера. Компьютерный интерфейс позволяет пользователю устройства управлять всеми функциями устройства. Интерфейс управляет по меньшей мере одним средством для хранения данных, которое записывает все данные, полученные во время циклов инактивации, включая, но не ограничиваясь ими, температуру корпуса, температуру воды и состояние образца во время инактивации. Интерфейс может отображать информацию в виде графиков, выводимых на дисплейное средство и/или выводить данные в виде удобной для пользователя электронной таблицы или другого подходящего для обработки данных приложения.

Второй задачей настоящего изобретения является создание способов инактивации микроорганизмов при сохранении их иммуногенности. В одном варианте осуществления способ включает в себя стадии подвергания микроорганизмов воздействию гипербарических условий при контролируемой температуре в течение определенных периодов времени. Способ может также содержать стадии попеременно высоких и низких давлений в течение определенных периодов времени и при определенных температурах. Было выполнено обширное моделирование параметров, которое дополнительно описано в подробном описании ниже. В целом, температура в помещении составляла от 15 до 26°C, а температура воды устройства составляла от 15 до 27°C.

В другом варианте осуществления второй задачи настоящего изобретения микроорганизмы полностью инактивированы и не способны вызвать инфекцию, но способны вызывать иммунный ответ у восприимчивых к ним животных. В одном варианте осуществления иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ. В другом варианте осуществления микроорганизмы являются даже более иммуногенными, чем те же микроорганизмы, которые были химически инактивированы. В еще одном варианте осуществления микроорганизмы являются более иммуногенными, так как гипербарическая обработка демаскирует иммуногенный эпитоп.

Третьей задачей настоящего изобретения является создание способов определения статуса инактивации микроорганизмов во время и после выполнения способов гипербарической инактивации. Статус инактивации может быть определен любым количеством анализов жизнеспособности и может быть использован для настройки и оптимизации параметров гипербарической инактивации (т.е. давление, температура, время). Можно также контролировать и оценивать целостность и/или наличие эпитопов, чтобы определить оптимальные параметры инактивации.

Четвертой задачей настоящего изобретения является создание иммуногенных композиций, содержащих инактивированные гипербарической обработкой микроорганизмы. В одном варианте осуществления иммуногенные композиции представляют собой вакцинные композиции, которые вызывают *in vivo* у животного защитный иммунный ответ. Композиции могут быть более безопасными и более эффективными, чем сравниваемые композиции, полученные с использованием химически инактивированных микроорганизмов. В одном варианте осуществления вакцины содержат инактивированные гипербарической обработкой *leptospira* или *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Поскольку описанное гипербарическое устройство может быть использовано для инактивации широкого спектра микроорганизмов, в настоящем описании предусмотрены композиции, содержащие любой микроорганизм, инактивированный таким образом.

Пятой задачей настоящего изобретения является создание способов, содержащих использование гипербарического устройства для рефолдинга/солюбилизации белков для различных молекулярно-биологических применений. В одном варианте осуществления настоящего изобретение относится к спо-

себу получения растворимого, дезагрегированного, повторно свернутого или активного белка, экспрессируемого в прокариотах или эукариотах, содержащему стадии (i) получения телец включения в буфере, не содержащем мочевины или с низкой концентрацией мочевины, с образованием суспензии телец включения; и (ii) подвергания суспензии телец включения воздействию высокого давления в течение некоторого периода времени.

В другом варианте осуществления настоящего изобретение относится к способу получения растворимого, дезагрегированного, повторно свернутого или активного белка, экспрессируемого в прокариотах или эукариотах, содержащему стадии (i) получения телец включения в буфере, не содержащем мочевины или с низкой концентрацией мочевины, с образованием суспензии телец включения; (ii) подвергания суспензии телец включения воздействию постепенного увеличения давления в течение некоторого периода времени; и (iii) поддержания высокого давления, приложенного к тельцам включения в течение некоторого периода времени.

В одном аспекте настоящего изобретения буфер может содержать дитиотреитол (DTT). В другом аспекте настоящего изобретения концентрация ДТТ может находиться в пределах от около 1 мМ до около 100 мМ, от около 1 мМ до около 90 мМ, от около 1 мМ до около 70 мМ, от около 1 мМ до около 60 мМ, от около 1 мМ до около 50 мМ или составлять около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 мМ. В одном аспекте настоящего изобретения мочевина может не присутствовать в буфере. В другом аспекте настоящего изобретения мочевина может присутствовать в буфере с концентрацией, составляющей около 1М, около 2М, около 3М, 4М, около 5М, около 6М, около 7М, около 8М, около 9М и около 10М.

В другом аспекте настоящего изобретения высокое давление может быть в диапазоне от около 1000 бар до около 5000 бар, от около 2000 бар до около 4000 бар. Высокое давление может быть любым давлением в диапазоне от около 2000 бар до около 4000 бар, например, но без ограничения, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900 и 4000 бар.

В другом аспекте настоящего изобретения постепенное увеличение давления может быть сделано непрерывно или ступенчато. В одном аспекте настоящего изобретения постепенное увеличение давления прикладывается к суспензии телец включения непрерывным увеличением давления с постоянной скоростью в течение определенного периода времени, чтобы достичь требуемого конечного высокого давления. Например, давление увеличивают со скоростью, составляющей от около 200 бар/мин до около 1000 бар/мин, непрерывно в течение от около 2 мин до около 10 мин, чтобы достичь 2000 бар, со скоростью, составляющей от около 200 бар/мин до около 1000 бар/мин, непрерывно в течение от около 3 мин до около 15 мин, чтобы достичь 3000 бар, со скоростью, составляющей от около 200 бар/мин до около 1000 бар/мин, непрерывно в течение от около 4 мин до около 20 мин, чтобы достичь 4000 бар, со скоростью, составляющей от около 200 бар/мин до около 1000 бар/мин, непрерывно в течение от около 5 мин до около 25 мин, чтобы достичь 5000 бар. В другом аспекте настоящего изобретения постепенное увеличение давления применяют ступенчато. Например, давление увеличивают со скоростью, равной 1000 бар/мин, в течение одной минуты, чтобы достичь 1000 бар, а затем давление поддерживают на уровне в 1000 бар в течение одного часа для релаксации белка, после периода релаксации давление увеличивают со скоростью, равной 1000 бар/мин, в течение одной минуты, чтобы достичь желаемого конечного высокого давления в 2000 бар.

Чтобы достичь конечное целевое высокое давление, равное 3000, 4000 и 5000 бар, может быть использовано то же ступенчатое повышение давления со скоростью, равной 1000 бар/мин, в течение одной минуты с промежуточной релаксацией белка в течение одного часа. Например, давление увеличивают со скоростью, равной 1000 бар/мин, в течение одной минуты, чтобы достичь 1000 бар, а затем давление поддерживают на уровне 1000 бар в течение одного часа для релаксации белка, давление снова увеличивают со скоростью, равной 1000 бар/мин, в течение одной минуты, чтобы достичь давления в 2000 бар, а затем давление поддерживают на уровне 2000 бар в течение одного часа для релаксации белка во второй раз, давление снова увеличивают со скоростью, равной 1000 бар/мин, в течение одной минуты, чтобы достичь желаемого конечного давления в 3000 бар. Для достижения конечного желаемого давления, равного 4000 бар, давление увеличивают со скоростью, равной 1000 бар/мин, в течение одной минуты, чтобы достичь 1000 бар, а затем давление поддерживают на уровне 1000 бар в течение одного часа для релаксации белка во второй раз, давление снова увеличивают со скоростью, равной 1000 бар/мин, в течение одной минуты, чтобы достичь давления в 2000 бар, а затем давление поддерживают на уровне 2000 бар в течение одного часа для релаксации белка во второй раз, давление снова увеличивают со скоростью, равной 1000 бар/мин, в течение одной минуты, чтобы достичь желаемого окончательного давления в 3000 бар, а затем давление поддерживают на уровне 3000 бар в течение одного часа для релаксации белка в третий раз, давление снова увеличивают со скоростью, равной 1000 бар/мин, в течение одной минуты, чтобы достичь желаемого окончательного давления в 4000 бар.

Суспензия телец включения может быть обработана под высоким давлением в течение от около 10 часов до около 100 ч, от около 20 ч до около 100 ч. Обработка высоким давлением продолжается предпочтительно в течение более чем 24 ч, например от около 25 ч до около 100 ч, от около 25 ч до около 80 ч, от около 25 ч до около 60 ч, от около 25 ч до около 50 ч, около 25 ч, около 26 ч, около 27 ч, около 28 ч,

около 29 ч, около 30 ч, около 31 ч, около 32 ч, около 33 ч, около 34 ч, около 35 ч, около 36 ч, около 37 ч, около 38 ч, около 39 ч, около 40 ч, около 41 ч, около 42 ч, около 43 ч, около 44 ч, около 45 ч, около 46 ч, около 47 ч, около 48 ч, около 49 ч, около 50 ч.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения растворимого, дезагрегированного, повторно свернутого или активного белка, экспрессируемого в прокариотах или эукариотах, содержащему стадии (i) получения телец включения в буфере, не содержащем мочевины или с низкой концентрацией мочевины, с образованием супензии телец включения; (ii) подвергания супензии телец включения воздействию постепенного увеличения давления в течение некоторого периода времени; (iii) поддержания высокого давления, приложенного к тельцам включения в течение некоторого периода времени; и (iv) восстановления белка понижением давления.

Белок может быть выбран из мембранных белков, поверхностных антигенов или любого белка, представляющего антигенный интерес, включая, но без ограничения, мембранные белки *Leptospira* и поверхностные белки *Bordetella*.

Понижение давления можно выполнять со скоростью, составляющей от около 83 бар/мин до около 200 бар/мин. Прокариоты, предусмотренные в настоящем изобретении, могут включать в себя *Avibacterium*, *Brucella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus* (например, *Haemophilus suis*), *Salmonella* (например, *Salmonella enteritis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*), *Shigella*, *Pasteurella* и *Rimeirella*.

В прокариотических системах можно выбрать ряд векторов экспрессии. Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, полифункциональные векторы клонирования и экспрессии *E.coli*, такие как pBLUESCRIPT (Stratagene); векторы pIN (Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264:5503 5509 (1989)); и тому подобное; векторы PGEX (Promega, Madison, Wis.); В эукариотических системах клеточные линии могут представлять собой дрожжи (например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), клетки бактериуса, клетки млекопитающих, клетки растений. Экспрессирующие векторы эукариотических систем включают в себя, но не ограничиваются ими, векторы pVR1020 или pVT1012 (Vical Inc., San Diego, CA), вектор *PichiaPink* (Invitrogen, CA, США), вектор pFasBac TOPO (Invitrogen).

Способ получения растворимого, дезагрегированного, повторно свернутого или активного белка, экспрессируемого в прокариотах или эукариотах, предлагаемый в настоящем изобретении, может быть использован для солюбилизации любых белков. Белки могут включать в себя антитела и инсулин. Белки могут также включать любые терапевтические белки, включая факторы свертывания, пептидные гормоны и тому подобное.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции или вакцине, содержащей инактивированный гипербарической обработкой микроорганизм, включая вирус. Микроорганизм может, например, представлять собой простейшие (например, *Giardia*, трипаносома, амеба, фальципарум и тому подобное), вирус (например, PCV2, Rota, вирус лихорадки западного Нила, ящура, чумы, бешенства, гриппа, герпеса, диареи крупного рогатого скота, инфекционного бурсита, инфекционного ринита, аденоовирус, поксвирус и тому подобное), или бактерии (*Erysipelothrix rhusiopathiae*, *E.coli*, стафилококки, кокцидии, стрептококки, микоплазмы *hyopneumoniae*, *Helicobacter* и тому подобное), и его фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, наполнитель, носитель или вспомогательное вещество.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу гипербарической инактивации клеточной супензии *Bordetella pertussis* (*B.pertussis*), содержащему следующие стадии:

- (а) получение супензии клеток *Bordetella pertussis* в культуральной среде,
- (б) концентрирование супензии клеток, полученной в упомянутой культуральной среде, не обязательно с добавлением солевого раствора (0,9% NaCl) или буферного раствора, содержание которого не превышает 25% от конечного объема (об./об.),
- (с) нагревание концентрированной супензии клеток при температуре в пределах от 50 до 54°C, и
- (д) инактивация термически обработанной концентрированной супензии клеток обработкой под высоким давлением, причем высокое давление превышает 2000 бар, но ниже чем 6000 бар.

Может быть использована любая жидккая среда, подходящая для культуры *B.pertussis*. Это может быть, в частности, среда Cohen Wheeler (American Journal of Public health, 1946, 36, 371-376), среда Verwey (J. Bacteriol 1949; 58: 127-134) или химически определенная среда, как описано у Stainer D.W. et al. (Journal of General Microbiology 1971, 63, 211-220). Предпочтительно жидккая среда представляет собой среду Cohen Wheeler, которая происходит из исходной жидкой среды Horni-brooks и, как было показано, особенно подходит для крупномасштабного культивирования *B.pertussis*. Состав среды Cohen Wheeler содержит источник азота, например, казаминокислоты или гидролизат казеина, смеси неорганических солей (однозамещенный фосфат натрия, хлорид магния, хлорид кальция, сульфат железа, сульфат меди), растворимый крахмал, экстракт дрожжей и производное цистеина, выбранное из группы, состоящей из цистеина, соли цистеина, такой как гидрохлорид цистеина, цистина и гидрохлорида глутатиона. При желании в состав Cohen Wheeler могут входить дополнительные компоненты, такие как аминокислоты и/или хлорид натрия. Обычно дрожжевой экстракт присутствует в виде гидролизованного экстракта дрожжей или автолизированного дрожжевого экстракта и был подвергнут диализу или ультрафильтрации.

Полученную супензию *B.pertussis* собирают и концентрируют, например, центрифугированием и ресуспендируют осадка клеток с уменьшенным объемом культурального супернатанта, к которому необязательно добавляют солевой раствор (0,9% NaCl) или буферный раствор, такой как фосфатный буферный раствор, содержание которого не превышает 25% от конечного объема (об./об.), или фильтрацией с тангенциальным потоком, таким образом, что конечная концентрация клеток, как правило, составляет от  $10^9$  до  $10^{13}$  КОЕ/мл. Как правило, конечный объем концентрированной супензии клеток от 10 до 20 раз меньше, чем объем собранных клеток. Концентрированную супензию *B. pertussis* затем нагревают при контролируемой температуре между 50 и 54°C (пределы включительно) в течение периода времени, который снижает жизнеспособность клеток в от около  $10^4$  до около  $10^6$  (измеряется в КОЕ/мл) раз и токсичность коклюшных токсинов, в то же время предотвращая тепловую денатурацию белков. Данный эффект может быть достигнут нагреванием концентрированной супензии в течение 30 минут при контролируемой температуре между 50 и 54°C (пределы включительно). Предпочтительно, период времени, в котором температура находится в диапазоне от 38 до 54°C, также принимается во внимание при нагревании концентрированной супензии. Например, период времени, в котором концентрированную супензию нагревают при температуре от 38 до 54°C, который включает в себя 30-минутный период, когда температура составляет от 50 до 54°C, может длиться от 40 до 90 мин, или от 50 до 80 мин, или даже от 55 до 70 мин (пределы включительно). Установку данных температурных параметров можно легко контролировать программой автоматического регулируемого нагрева, согласно которой температура концентрированной супензии клеток ступенчато увеличивается от 38 до 50°C в течение определенного периода времени (например от 10 до 20 мин), с последующим 30-минутным периодом времени, в котором температура поддерживается между 50 и 54°C (пределы включительно), и заключительного определенного периода времени (например, от 10 до 20 мин), когда температура концентрированной супензии клеток ступенчато снижается с 50 до 38°C.

Подвергнутую термической обработке и сконцентрированную супензию клеток *B.pertussis*, наконец, полностью инактивируют гипербарической обработкой в условиях, которые сохраняют иммуногенность целых инактивированных бактерий. Данный эффект достигается при подвергании термически обработанной и концентрированной супензии клеток воздействию высокого давления, которое выше чем 2000 бар, но ниже чем 6000 бар, с помощью, в частности, гипербарического устройства в соответствии с настоящим изобретением. Давление может составлять, например, но без ограничения, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500 бар. Чем выше давление, тем короче требуемая обработка высоким давлением. В частности, высокое давление может быть любым давлением в диапазоне от 3000 до 5000 бар (пределы входят включительно), например, но без ограничения, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000 бар. В данном диапазоне высокого давления обработка высоким давлением длится по меньшей мере 15 мин, но, как правило, продолжительность изменяется от 15 до 180 мин и регулируется в соответствии с силой высокого давления, которое применяется к термически обработанной и концентрированной супензии клеток. Когда высокое давление, которое должно применяться, составляет 3000 бар, обработка высоким давлением должна длиться более 30 мин, например 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 мин. С другой стороны, когда высокое давление, которое должно применяться, находится в диапазоне от 4000 до 5000 бар (пределы включительно), то продолжительность обработки высоким давлением может быть сокращена, например, до 30 мин или даже меньше, но из-за меры предосторожности рекомендуется проводить обработку в течение периода времени от 30 до 180 мин. Продолжительность обработки может составлять, например, но без ограничения, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 мин, например, обработка в течение 90 мин при 4000 бар. В данном диапазоне высокого давления и периода времени, как было отмечено, отсутствует феномен восстановления, что означает, что инактивация бактерий является необратимой и окончательной, так как после периода покоя больше нет жизнеспособных бактерий.

Полностью инактивированная концентрированная супензия *B.pertussis*, полученная сочетанием тепловой обработки и гипербарической обработки в соответствии со способом по изобретению, сохраняет хорошие иммуногенные свойства, так как его активность хорошо сохраняется и сравнима с активностью эталонной вакцины, калиброванной по международному стандарту для вакцины Pertussis или эквивалентной стандартной вакцины, одобренной международным регулирующим органом. Токсины при приготовлении хорошонейтрализуются, так как тест прибавки в массе мышей дает удовлетворительные результаты. Наблюдение с помощью сканирующего электронного микроскопа показывает, что после термической и гипербарической обработок в популяции инактивированных бактерий нет никаких видимых морфологических изменений. Такая популяция, по существу, состоит из целых инактивированных бактерий без значительной части лизических бактерий и выглядит как популяция бактерий, которые были инактивированы химической обработкой с мертиолатом. Кроме того, способ по изобретению может быть легко выполняем в промышленном масштабе, так как гипербарическое устройство по изобретению было разработано для обработки значительных объемов биологического материала (50 л или более). Способ по изобретению представляет собой хорошую альтернативу классической химической инактивации *B.pertussis* мертиолатом и представляет новую возможность для изготовления коклюшной вакцины.

на основе инактивированной целой клетки. Соответственно, еще одна задача настоящего изобретения относится к способу изготовления цельноклеточной коклюшной вакцины, содержащий стадии 1) инактивации концентрированной суспензии клеток *Bordetella pertussis* под действием термической и гипербарической обработок, как описано в настоящем изобретении, и 2) разбавления инактивированной концентрированной суспензии клеток *B. pertussis* в фармацевтически приемлемом наполнителе перед разделением в упаковочные устройства.

Фармацевтически или ветеринарно приемлемые носители или вспомогательное вещество или носители для доставки или наполнительные хорошо известны специалисту в данной области техники. Фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, или вспомогательное вещество, или средство доставки, или наполнитель, которые могут быть использованы в способах по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, 0,9% NaCl (например, физиологический раствор) раствор или фосфатный буфер, поли(L-глютамат) или поливинилпирролидон. Фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, или средство доставки, или наполнитель могут представлять собой любое соединение или сочетание соединений, способствующее введению вектора (или белка, экспрессируемого из вектора по изобретению *in vitro*) или облегчающее трансфекцию или инфекцию и/или способствующее сохранению вектора (или белка). Дозы и объемы доз здесь обсуждаются в общем описании и также могут быть определены специалистом в данной области техники из чтения данного описания в совокупности с уровнем знаний в данной области, без излишнего экспериментирования.

Субъединичная (белковая) вакцина может быть объединена со вспомогательными веществами, такими как эмульсии масло-в-воде, вода-в-масле-в-воде, на основе минерального масла и/или растительного масла и неионогенных поверхностно-активных веществ, таких как блок-сополимеры, TWEEN®, Span®. Такие эмульсии представляют собой, в частности, те, которые описаны на странице 147 "Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach", Pharmaceutical Biotechnology, 1995, или эмульсии TS, в частности, эмульсия TS6 и эмульсия LF, в частности, эмульсия LF2 (для обеих эмульсий TS и LF, см. WO 04/024027). Другими подходящими вспомогательными веществами являются, например, витамин Е, сапонины и Carbopol® (Noveon; см. WO 99/51269, WO 99/44633), гидроксид алюминия или фосфат алюминия ("Vaccine Design, The subunit and adjuvant approach", Pharmaceutical Biotechnology, том 6, 1995), биологические вспомогательные вещества (например, C4b, в частности мышиный C4b (Ogata R.T. et al.) или лошадиный C4b, GM-CSF, в частности лошадиный GM-CSF (патент США 6645740)), токсины (например, холерные токсины CTB или CTB, термолабильные токсины LTA или LTB из *Escherichia coli* (Olsen C.W. et al.; Fingerat E. et al.; Zurbriggen R. et al. Peppoloni S. et al.) и CpG (т.е. CpG #2395 (см. Jurk M. et al.), CpG #2142 (см. SEQ ID NO: 890 в EP 1221955)). Другие вспомогательные вещества включают полиА-полиУ, бромид диметилдиоктадециламмония (dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA)) ("Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach", под редакцией Powell and Newman, Pharm. Biotech., 6: p.03, p.157); N,N-диоктадецил-N',N'-бис(2-гидроксигексил)пропандиамин (например, AVRIDINE®); (*Ibid*, стр 148); и карбомер, хитозан (см. патент США № 5980912, например); полимеры акриловой или метакриловой кислоты, сополимеры малеинового ангидрида и алкенильных производных, катионные липиды, содержащие соль четвертичного аммония, цитокины. Любая комбинация вспомогательных веществ также может быть использована.

В одном варианте осуществления растворов вспомогательного вещества, особенно карбомера (Pharmeuropa, т. 8, № 2, июнь 1996), получают в дистиллированной воде, предпочтительно в присутствии хлорида натрия, причем полученный раствор имеет кислое значение pH. Данный исходный раствор разбавляют, добавляя его или значительную часть его к требуемому количеству (для получения желаемой конечной концентрации) воды, загруженной NaCl, предпочтительно физиологическим солевым раствором (9 г/л NaCl), за один раз в виде нескольких порций с сопутствующей или последующей нейтрализацией (значение pH от 7,3 до 7,4), предпочтительно с помощью NaOH. Данный раствор при физиологическом значении pH используется для смешивания с вакциной, которую можно особым образом хранить в сублимационно-высушенней, жидкой или замороженной формах. Концентрация полимера в конечной композиции вакцины может составлять от 0,01 до 2% мас./об., от 0,06 до 1% мас./об. или от 0,1 до 0,6% мас./об.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу индукции иммунного ответа у животного против одного или нескольких антигенов или защитной реакции у животного против одного или нескольких патогенных микроорганизмов, и данный способ содержит прививание животному по меньшей мере один раз вакцины или фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу индукции иммунного ответа у животного на один или более антигенов или защитной реакции у животного против одного или нескольких патогенных микроорганизмов *Leishmania* в режиме введения "прайм-буст", который состоит из по меньшей мере одного первичного введения и по меньшей мере одного бустерного введения с использованием по меньшей мере одного общего полипептида, антигена, эпитопа или иммуногена. Иммунологическая композиция или вакцина, используемые для первичного введения, могут быть, теми же, могут быть отличающимися по своей природе от тех, которые используются в качестве бустера. Прайм-введение может содержать

одно или несколько введений. Аналогичным образом, буст-введение может содержать одно или несколько введений. Введения в режиме "прайм-буст" могут выполняться в интервале от 2 до 6 недель друг от друга, например в интервале, составляющем около 3 недель. Согласно одному из вариантов осуществления также предусмотрен полугодовой бустер или годовой бустер, преимущественно с использованием субъединичной (белковой) вакцины.

Различные способы введения могут быть использованы в дополнение к подкожному или внутримышечному, такие как внутримышечное, или трансдермальное.

Композиция или вакцина согласно изобретению содержат или состоят, по существу, из или состоят из количества, эффективного для того, чтобы вызвать терапевтический ответ одного или нескольких полипептидов, как обсуждается здесь; и эффективное количество может быть определено из данного описания, включая документы, включенные в данный документ, и знаний в данной области, без излишнего экспериментирования.

Для композиции или вакцины, содержащей экспрессированный белок по настоящему изобретению, доза может включать от около 1 до около 2000 мкг, от около 5 до около 1000 мкг, от около 10 до около 100 мкг, от около 20 до около 1000 мкг, от около 30 до около 500 мкг или от около 50 до около 500 мкг. Объемы дозы могут составлять от около 0,1 до около 10 мл или от около 0,2 до около 5 мл.

Термин "антigen" или "иммуноген" означает вещество, которое индуцирует специфический иммунный ответ у животного-хозяина. Антиген может содержать целый организм, убитый, ослабленный или живой; субъединицу или часть организма; рекомбинантный вектор, содержащий вставку с иммуногенными свойствами; участок или фрагмент ДНК, способный индуцировать иммунный ответ при презентации животному-хозяину; полипептид, эпитоп, гаптен или любую их комбинацию. Альтернативно, иммуноген или антиген может содержать токсин или антитоксин.

Термины "белок", "пептид", "полипептид" и "полипептидный фрагмент" используются здесь взаимозаменяющими для обозначения полимеров из аминокислотных остатков любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислот, и он может быть прерван химическими группами, отличными от аминокислот. Данные термины также охватывают аминокислотный полимер, который был изменен естественным образом или при вмешательстве; например образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидизацией, ацетилированием, фосфорилированием или любой другой манипуляцией или модификацией, такой как конъюгация с маркирующим или биоактивным компонентом.

Термин "иммуногенный или антигенный полипептид", используемый здесь, включает полипептиды, которые являются иммунологически активными в том смысле, что, будучи введенными хозяину, они способны вызвать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против белка. Предпочтительно фрагмент белка является таким, что он имеет, по существу, такую же иммунологическую активность, что и весь белок. Таким образом, фрагмент белка в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит, по существу, из или состоит из по меньшей мере одного эпитопа или антигенных детерминанты. "Иммуногенный" белок или полипептид в целях настоящего изобретения включает в себя полноразмерную последовательность белка, его аналоги или его иммуногенные фрагменты. Под "иммуногенным фрагментом" подразумеваются фрагмент белка, который включает один или несколько эпитопов, и, таким образом, вызывает иммунный ответ, описанный выше. Такие фрагменты могут быть идентифицированы с использованием любого количества способов картирования эпитопов, хорошо известных в данной области техники. См., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Например, линейные эпитопы могут быть определены, например, одновременным синтезированием больших количеств пептидов на твердых подложках, пептидов, соответствующих участкам молекулы белка, и подверганием пептидов взаимодействию с антителами, в то время как пептиды все еще прикреплены к подложкам. Такие способы известны в данной области и описаны, например, в патенте США № 4708871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. Сходным образом, конформационные эпитопы могут быть легко идентифицированы определением пространственной конформации аминокислот, таким как, например, рентгеновская кристаллография и 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols, выше. Способы, особенно применимые к белкам T.parva, подробно описаны в PCT7 US 2004/022605, включенной сюда посредством ссылки в полном объеме.

Как обсуждается в данном документе, изобретение охватывает активные фрагменты и варианты антигенного полипептида. Таким образом, термин "иммуногенный или антигенный полипептид" дополнительно предусматривает делеции, добавления и замены в последовательности, при условии, что полипептид вызывает иммунный ответ, как определено в данном описании. Термин "консервативная вариация" означает замену аминокислотного остатка другим биологически аналогичным остатком или замену нуклеотида в последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, что закодированный аминокислотный остаток не меняется или представляет собой другой биологически аналогичный остаток. В связи с этим особенно предпочтительные замены, как правило, будут консервативными в природных условиях, т.е. те замены, которые происходят внутри одного семейства аминокислот. Например, аминокислоты обычно делятся на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин,

гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Примеры консервативных вариаций включают замещение одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой гидрофобный остаток или замещение одного полярного остатка на другой полярный остаток, такое как замещение аргинина лизином, глутаминовой кислоты аспарагиновой кислотой или глутамина аспарагином и тому подобное; или аналогичную консервативную замену аминокислоты структурно родственной аминокислотой, которая не будет оказывать большое воздействие на биологическую активность. Белки, имеющие, по существу, такую же аминокислотную последовательность, что и референсная молекула, но обладающие незначительными аминокислотными заменами, которые не оказывают существенного влияния на иммуногенность белка, находятся, таким образом, в рамках определения референсного полипептида. Все полипептиды, полученных в результате таких модификаций, включены в данный документ. Термин "консервативная вариация" также включает в себя применение замещенной аминокислоты вместо незамещенной родительской аминокислоты при условии, что антитела, полученные к замещенному полипептиду, также обладают иммунной реакцией против незамещенного полипептида.

Термин "эпитоп" относится к участку на антигене или гаптене, на который реагируют определенные В-клетки и/или Т-клетки. Этот термин также используется взаимозаменяющими с "антигенней детерминантой" или "сайтом антигенной детерминанты". Антитела, которые распознают тот же эпитоп, могут быть идентифицированы в простом иммуноанализе, показывающем способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью.

"Иммунный ответ" к композиции или вакцине представляет собой развитие в хозяине клеточного и/или антитело-опосредованного иммунного ответа на композицию или вакцину, представляющую интерес. Как правило, "иммунный ответ" включает в себя, но без ограничения, один или более из следующих эффектов: производство антител, В-клеток, Т-хелперов и/или цитотоксических Т-клеток, направленных специально на антиген или антигены, включенные в композицию или вакцину, представляющую интерес. Предпочтительно, хозяин будет отображать либо терапевтическую, либо защитную иммунологическую реакцию таким образом, что сопротивление новой инфекции будет увеличиваться и/или клиническая тяжесть заболевания будет уменьшаться. Такая защита будет продемонстрирована либо снижением, либо отсутствием симптомов и/или признаков клинического заболевания, обычно отображаемых зараженным хозяином, быстрым временем восстановления, и/или пониженным титром вируса в инфицированном хозяине.

Под "животным" подразумевают млекопитающих, птиц и тому подобное. Животное или хозяин, в целях настоящего изобретения, включает млекопитающих и человека. Животное может быть выбрано из группы, состоящей из лошадиных (например, лошадь), собачьих (например, собаки, волки, лисы, койоты, шакалы), кошачьих (например, львы, тигры, домашние кошки, дикие кошки, другие большие кошки и другие животные из семейства кошачьих, включая гепардов и рысей), овчевых (например, овцы), крупного рогатого скота (например, крупный рогатый скот), свиных (например, свиньи), птиц (например, куры, утки, гуси, индейки, перепел, фазан, попугай, зяблик, ястреб, ворон, страус эму и казуар), приматов (например, полуобезьяна, долгопят, мартышка, гиббон, человекообразная обезьяна), хорьков, тюленей и рыб. Термин "животное" включает также отдельное животное на всех стадиях развития, в том числе стадии новорожденных, эмбриона и плода.

Если не объясняется иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, обычно понимаемое специалистом с обычной квалификацией в данной области, к которой данное изобретение принадлежит. Артикли "a", "an" и "the", указывающие на форму единственного числа, включают ссылки на множественное число, если контекст ясно не указывает на иное. Аналогичным образом, слово "или" предназначено для того, чтобы включать в себя "и", если из контекста явно не следует иное.

#### Композиции.

Настоящее изобретение относится к инактивированной гипербарической обработкой микроорганизменной вакцине или композиции, которая может содержать инактивированные гипербарической обработкой микроорганизмы и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, наполнитель или средство доставки, которая вырабатывает, индуцирует или стимулирует реакцию у животного.

Термин "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" относится к РНК или ДНК, которая является линейной или разветвленной, одно- или двухцепочечной или ее гибридом. Термин также охватывает гибриды РНК/ДНК. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: ген или фрагмент гена, экзоны, интроны, мРНК, тРНК, рРНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, зонды нуклеиновой кислоты и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов, урацил, другие сахара и связывающие группы, такие как фторрибоза и тиолат, и нуклеотидные разветвления. Последовательность нуклеотидов может быть дополнительно модифицирована после полимеризации,

например конъюгацией с маркирующим компонентом. Другие типы модификаций, включенных в данное определение, представляют собой caps ("кэпы"), замещение одного или нескольких встречающихся в природных условиях нуклеотидов аналогом и включение средства для прикрепления полинуклеотида к белкам, ионы металлов, маркирующие компоненты, другие полинуклеотиды или твердую подложку. Полинуклеотиды могут быть получены химическим синтезом или происходить из микроорганизма.

Термин "ген" используют в широком смысле для обозначения любого сегмента полинуклеотида, связанного с биологической функцией. Таким образом, гены включают интроны и экзоны, как в геномной последовательности, или только кодирующие последовательности, как в кДНК, и/или регуляторные последовательности, необходимые для их экспрессии. Например, ген также обозначает фрагмент нуклеиновой кислоты, который экспрессирует мРНК или функциональную РНК, или кодирует специфический белок, и который включает в себя регуляторные последовательности.

"Выделенный" биологический компонент (такой как нукleinовая кислота или белок или органелла) относится к компоненту, который был по существу отделен или очищен от других биологических компонентов в клетке организма, в которой данный компонент встречается в природе, например, от другой хромосомной и экстрахромосомной ДНК и РНК, белков и органелл. Нукleinовые кислоты и белки, которые были "выделены", включают нукleinовые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. Данный термин также охватывает нукleinовые кислоты и белки, полученные с помощью рекомбинантной техники, а также химическим синтезом.

Термин "консервативная вариация" означает замену аминокислотного остатка другим биологически аналогичным остатком или замену нуклеотида в последовательности нукleinовой кислоты таким образом, что закодированный аминокислотный остаток не меняется или является другим биологически аналогичным остатком. В связи с этим особенно предпочтительные замены, как правило, консервативны в природных условиях, как описано выше.

Термин "рекомбинантный" означает полинуклеотид полусинтетического или синтетического происхождения, который либо не встречается в природе, либо связан с другим полинуклеотидом в расположении, не найденном в природе.

"Гетерологичный" означает происходящий от объекта, генетически отличающегося от остальной части объекта, с которой он сравнивается. Например, полинуклеотид может быть помещен способами генной инженерии в плазмиду или вектор, полученный из другого источника, и является гетерологичным полинуклеотидом. Промотор, удаленный из его нативной кодирующей последовательности и функционально связанный с кодирующей последовательностью, отличной от нативной последовательности, является гетерологичным промотором.

Полинуклеотиды по изобретению могут содержать дополнительные последовательности, такие как дополнительные кодирующие последовательности внутри одной и той же транскрипционной единицы, контрольные элементы, такие как промоторы, сайты связывания рибосом, 5'-UTR, 3'-UTR, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования, дополнительные единицы транскрипции под контролем того же или другого промотора, последовательности, которые позволяют клонирование, экспрессию, гомологичную рекомбинацию, а также трансформацию клетки-хозяина, и любую такую конструкцию, что может быть целесообразным для обеспечения вариантов осуществления данного изобретения.

#### Способы применения и производимый продукт.

Настоящее изобретение включает в себя следующие варианты осуществления способов. В одном варианте осуществления раскрыт способ вакцинации животного, содержащий введение композиции, содержащей инактивированный гипербарической обработкой микроорганизм и фармацевтический или ветеринарно приемлемый носитель, наполнитель или средство доставки, животному. В одном аспекте данного варианта осуществления животное представляет собой свинью.

В одном из вариантов осуществления изобретения может быть использована схема введения "прайм-буст", которая состоит из по меньшей мере одного первичного введения и по меньшей мере одного бустерного введения с использованием по меньшей мере одного общего полипептида, антигена, эпитопа или иммуногена. Обычно, иммунологическая композиция или вакцина, используемая для первичного введения, отличается по своей природе от тех, которые используются в качестве бустера. Тем не менее, следует отметить, что тот же состав может быть использован как для первичного введения, так и для бустерного введения. Такой протокол введения называется "прайм-буст".

Схема "прайм-буст" содержит по меньшей мере одно первичное введение и по меньшей мере одно буст-введение с использованием по меньшей мере одного общего полипептида и/или его вариантов или фрагментов. Вакцина, используемая для первичного введения, может отличаться по своей природе от тех, которые используются в качестве последующей бустерной вакцины. Первичное введение может содержать один или несколько приемов. Аналогичным образом, буст-введение может содержать один или несколько приемов.

Объем дозы композиций для целевых видов, которые представляют собой млекопитающих, например объем дозы композиции для свиньи или свиной композиции на основе бактериальных антигенов, как правило, составляет от около 0,1 до около 2,0 мл, от около 0,1 до около 1,0 мл и от около 0,5 до около 1,0 мл.

Эффективность вакцин может быть испытана через от 2 до 4 недель после последней иммунизации заражением животных, таких как свиньи, вирулентным штаммом *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Как гомологичные, так и гетерологичные штаммы используются для заражения, чтобы проверить эффективность вакцины. Животное может быть заражено внутримышечной или подкожной инъекцией, спреем, интраназально, через глаз, внутритехнически и/или перорально. Образцы из суставов, легких, мозга и/или ротового отверстия могут быть собраны до и после заражения и могут быть проанализированы на наличие антител, специфических к *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Композиции, содержащие инактивированные микроорганизмы по данному изобретению, используемые в протоколах "прайм-буст", содержатся в фармацевтически или ветеринарно приемлемом наполнителе, разбавителе или наполнителе. Протоколы изобретения защищают животное от вирулентных форм микроорганизмов и/или предотвращают прогрессирование заболевания в инфицированном животном.

Различные введения проводят предпочтительно с интервалом от 1 до 6 недель. Предпочтительный интервал времени составляет от 3 до 5 недель и оптимально 4 недель в соответствии с одним вариантом осуществления, также предусмотрен ежегодный бустер. Животные, например свиньи, могут быть по меньшей мере 3-4-недельного возраста в момент первого введения.

Специалисту в данной области техники следует понимать, что раскрытие здесь предоставляется в качестве примера и настоящее изобретение не ограничивается этим. Из данного описания и знаний в данной области техники специалист в данной области может определить количество введений, путь введения и дозы, которые должны использоваться для каждого протокола инъекций, без каких-либо излишних экспериментов.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой набор для выполнения способа вызывания или индукции иммунологической или защитной реакции против микроорганизма у животного, содержащий инактивированную гипербарической обработкой иммунологическую композицию или вакцину и инструкции для выполнения способа доставки в количестве, эффективном для вызывания иммунного ответа у животного.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой набор для выполнения способа индукции иммунологической или защитной реакции против вирулентных микроорганизмов у животного, содержащий композицию или вакцину, содержащую инактивированный гипербарической обработкой микроорганизм по изобретению и инструкции для выполнения способа доставки в количестве, эффективном для вызывания иммунного ответа у животного.

Еще один объект настоящего изобретения относится к набору для вакцинации в режиме "прайм-буст" в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше. Набор может содержать по меньшей мере два флакона: первый флакон, содержащий вакцину или композицию для первичной вакцинации в соответствии с настоящим изобретением, и второй флакон, содержащий вакцину или композицию для буст-вакцинации в соответствии с настоящим изобретением. Набор может предпочтительно содержать дополнительные первые или вторые флаконы для дополнительных первичных вакцинаций или дополнительных буст-вакцинаций.

В одном варианте осуществления вспомогательные вещества включают те вещества, которые способствуют повышенной абсорбции через слизистые оболочки. Некоторые примеры включают MPL, LTK63, токсины, микрочастицы PLG и некоторые другие (Vajdy M. Immunology and Cell Biology (2004) 82, 617-627). В одном варианте осуществления вспомогательное вещество может представлять собой хитозан (Van der Lubben et al. 2001; Patel et al. 2005; Majithiya et al. 2008; US Patent Serial No. 5,980.912). В одном варианте осуществления вспомогательное вещество может представлять собой инактивированные бактерии, инактивированный вирус, фракции инактивированных бактерий, бактериальные липополисахарида, бактериальные токсины или их производные или их комбинации.

В одном варианте осуществления вспомогательное вещество содержит целые бактерии и/или вирусы, включая *H.parasuis*, *Clostridium*, вирус иммунодефицита свиньи (SIV), цирковирус свиней (*porcine circovirus (PCV)*), вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней (*porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)*), *Mannheimia*, *Pasteurella*, *Histophilus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* или комбинации и/или их вариации. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество увеличивает производство животным антител IgM, IgG, IgA и/или их комбинаций.

Изобретение будет теперь дополнительно описано с помощью следующих неограничивающих примеров.

Пример 1. Разработка параметров устройства.

Изобретение относится, в частности, к устройству высокого давления, которое: 1) полностью инактивирует микроорганизмы (что делает их неинфекционными); и 2) сохраняет и/или улучшает иммуногенный потенциал (иммуногенность) микроорганизмов. У предыдущих устройств, предназначенных для уменьшения микроорганизменной нагрузки в пище (например, соки) или в биологических препаратах (например, препараты крови или рекомбинантный фактор VIII), не хватало данных функций, которые имеют решающее значение для производства безопасных, эффективных инактивированных гипербарической обработкой вакцинных компонентов. Во время утверждения кинетических параметров инактива-

ции микроорганизмов были оценены граничные условия, включая экстремальные температуры и давления и крайности в градиентах давления. Антигенность и иммуногенность инактивированных гипербарической обработкой микроорганизмов также были оценены, чтобы помочь определить требования к устройству, так же как и к механизмам нагрева/охлаждения устройства. Также была смоделирована однородность рабочей температуры устройства, чтобы разработать оптимальные условия гипербарической инактивации. Определение экстремальных температур в устройстве с помощью моделирования дало возможность для проверки параметров инактивации (давление, время и температура).

**Моделирование параметров.** Способ конечных элементов с использованием кода расчетов Cats3M был разработан и использован для оценки теплообмена в камере высокого давления (несколько сотен МПа) для инактивации вирусов и/или бактерий. Расчет проводился по нескольким 2D геометрическим моделям осесимметричного корпуса, чтобы лучше понять влияние механической конфигурации корпуса на тепловую реакцию последнего. Цель исследования заключалась в разработке большого объема корпуса (около 100 л), с целью ограничения неоднородности в температуре и для удовлетворения ограничений механизма биологической инактивации. Способ высокого давления был разработан и изучен в течение нескольких циклов компрессии-декомпрессии со временем релаксации под высоким давлением и при нулевом давлении.

Разработанный алгоритм позволял проводить визуализацию изотерм на протяжении всего процесса. Средняя температура и зависимость неоднородности температуры от времени были извлечены из данных расчетов. Обоснованность алгоритма была проверена сравнением с несколькими экспериментальными исследованиями. Заявители протестирували различные жидкости в отношении передачи давления и оценили воздействие таких факторов, как скорость компрессии и декомпрессии, начальная температура передающей давление жидкости и максимальное достигнутое давление.

Полученные результаты указывают на хорошее соответствие с экспериментальными измерениями и делают возможным профилирование экспериментального протокола, а также задачу геометрии корпуса с помощью данного алгоритма, используемого в качестве руководства при конструировании корпуса (сравнение между экспериментальным и смоделированным температурными профилями на изостатическом прессе, режим поршня с объемом  $\frac{1}{4}$  л). Оба измерения дают значение, отличающееся на около 0,16% от Cp (4236 JG-1.K-1 и 4243 JG-1.K-1) при температуре, равной 13°C. При данной температуре это дает теплоемкость, равную  $4240 \pm 0,004$  JG-1.K-1. Удельная теплоемкость воды при 20°C составляет 4,1813 JG-1.K-1 [4], что дает разность в 1,4% с измерениями, проводимыми на биологическом препарате, предназначенном для обработки способом прессования. Учитывая небольшие различия в физических свойствах между биологической жидкостью и водой, данные результаты были вполне последовательны и также подтвердили применимость модели для гипербарической инактивации микроорганизмов. Таким образом, моделирование циклов, выполненное для воды, с варьированием степени сжатия и декомпрессии, скорости начальной температуры передающей давление жидкости и максимального достигнутого давления представляет фактический случай обработки биологической жидкости.

Теперь, когда изобретатели представили настоящее описание, специалист в данной области техники сможет успешно инактивировать любое количество микроорганизмов посредством обычной оптимизации параметров, описанных здесь.

**Пример 2. Эффективность инактивированного гипербарической обработкой *Erysipelothrix rhusiopathiae* у свиней.**

*Erysipelothrix rhusiopathiae* был инактивирован с помощью устройства по настоящему изобретению. Неожиданно, во время попыток инактивировать *E. rhusiopathiae* гипербарической обработкой, было обнаружено, что существует "феномен восстановления", который заключается в том, что бактерии обладают способностью восстанавливать свои ферментные системы после нескольких дней хранения при комнатной температуре. Следовательно, давление, температура и временные параметры гипербарического устройства должны быть отрегулированы таким образом, чтобы компенсировать данный феномен. Были исследованы несколько условий инактивации, включая давление в 4000 бар в течение 90 мин при 37°C.

Сто литров бактериальной культуры *Erysipelothrix rhusiopathiae* инактивировали тремя различными способами получения Active Principles (РА, инактивированных бактерий): 1) тимеросалом; 2) формальдегидом натрия; и 3) гипербарической обработкой (4000 бар, 90 мин, 37°C). Образцы от каждой из инактивированных фракций были охарактеризованы, и белок SpaA (поверхностный белковый антиген, Surface Protein Antigen A), белок, известный как защитный антиген *E. rhusiopathiae*, детектировали во всех трех фракциях, включая инактивированную гипербарической обработкой фракцию (моно克лональное Ab, Вестерн-блоттинг, данные не показаны). Сыворотки от мышей, иммунизированных РА, содержат три поликлональных антитела против данного белка. Дополнительно, сыворотки от свиней, вакцинированных рекомбинантным белком SpaA, имеют антитела, которые распознают белок SpaA в РА, инактивированном мертиолятом и гипербарической обработкой. И, наконец, три препарата РА окрашивали флуоресцентным моно克лональным антителом против SpaA, и распределения помеченных/непомеченных бактериальных популяций существенно различались в зависимости от режима инактивации: 95% инактивированных гипербарической обработкой бактерий было помечено со средней интенсивностью флуоресценции, равной 24 условным единицам, в то время как только 79% инактивированных мертиолатом бакте-

рий было помечено со средней интенсивностью, составившей только 7 единиц (фиг. 18). Данный результат позволяет предположить, что химическая инактивация повредила антигенные белки, присутствующие в бактериях.

Испытание вакцин на лабораторных животных. Мышей вакцинировали каждой из трех инактивированных культур *Erysipelothrix rhusiopathiae* (мертиолят, формальдегид и гипербарическая обработка), а затем заражали вирулентной/живой культурой *E.rhusiopathiae* инъекцией IP. Сто процентов мышей, вакцинированных инактивированной гипербарической обработкой культурой, пережило заражение (фиг. 20).

Вакцинация целевого животного: свиньи. Группы из 7 свиней вакцинировали бактериями, инактивированными либо химическим способом, либо гипербарической обработкой, или рекомбинантным белком SpaA, затем заражали живыми бактериями, вводимыми внутривенно (серологические данные приведены на фиг. 23). Контролировали появление кожных поражений, и вакцина считалась эффективной, если она полностью защищала от образования поражения. Все вакцинированные животные были полностью защищены от двух штаммов *E.rhusiopathiae* (серотипы 1 и 2).

T-клеточный ответ, индуцированный инактивированной гипербарической обработкой культурой *E.rhusiopathiae*. Последовательные разведения трех культур *E.rhusiopathiae* помещали в присутствии мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) свиней, вакцинированных рекомбинантным белком, и количественно определяли T-клеточный ответ на специфические бактериальные антигены SpaA с использованием анализа ELISpot, выявляющего IFN. Данное исследование показало лучшую реакцию реактивации ex vitro T-клеток, специфичную для инактивированного гипербарической обработкой антигена, во всех тестируемых разведениях. Кроме того, через 42 дня после вакцинации, когда частота специфических T-клеток снижалась, данный эффект был еще более выраженным, что ясно свидетельствует о более высоком качестве антигена (для инактивированной гипербарической обработкой фракции).

Картирование T-клеточных эпитопов. Банк перекрывающихся пептидов белка LOG использовали для определения того, какие T-клеточные эпитопы активировались различными инактивированными бактериями (principle active, PA). Данное исследование показало, что некоторые эпитопы гораздо лучше распознаются животными, вакцинированными инактивированными гипербарической обработкой PA, чем те, которые были вакцинированы химически инактивированными PA.

Наконец, сыворотки из свиней, вакцинированных различными вакцинными препаратами, анализировали на уровне специфических антител к *Erysipelothrix rhusiopathiae*. IgG1 и IgG2 индуцировали, и среди 3 способов инактивации титры IgG1 и IgG2 были выше у животных, вакцинированных инактивированными гипербарической обработкой бактериями по сравнению с животными, вакцинированными химически инактивированными бактериями.

Пример 3. Гипербарическая инактивация лептоспир.

Три вакцинных штамма лептоспир оценивали с целью гипербарической инактивации: *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa* и *Leptospira Icterohaemorrhagiae*. Предварительные тесты показали, что бактерии *Leptospira* успешно инактивировались при давлении, равном 2500 бар, для трех испытанных температур инактивации (10, 20 и 30°C). Данные результаты подтверждают результаты, полученные Carla Silva в 2000 году (C.Silva et al., 2001). Многочисленные публикации были сосредоточены на исследованиях и идентификации защитных антигенов в различных штаммах лептоспир (P.Cullen et al., Infection And Immunity, 2005): липополисахариды или ЛПС, основной компонент поверхности бактерий, ответственный за антигенные и агглютинационные тесты; трансмембранный белок OmpL1; и липопротеины, закрепленные в мембране своим N-концом и обеспечивающие частичную защиту у лабораторных животных: LipL32, LipL36 и LipL41.

Недавно было установлено, что поверхностные белки (LigB и LigA) с повторами из 90 аминокислот, напоминающие иммуноглобулин, обеспечивают частичную защиту лабораторных животных при тестировании аналогами (W.Yan et al., Microbes and Infections, 2009). На фиг. 9 схематически представлены предполагаемые защитные антигены в *Leptospira*. Для характеристики антигенности различных бактериальных суспензий после гипербарической инактивации проводили изучение ЛПС, липопротеина (LipL32/41/46), закрепленного во внешней мемbrane, и факторов вирулентности (LigA/B) на культурах трех сероваров *Leptospira*. Условия обработки включали отсутствие инактивации, химическую инактивацию мертиолатом натрия (0,1 г/л, от 24 до 29°C) и гипербарическую инактивацию при 20°C в соответствии с табл. 2.

Таблица 2. Описание различных суспензий *Leptospira* и условий инактивации. FTU: единицы мутности. FACS: сортировка клеток с возбуждением флуоресценции (Fluorescence Activated Cell Sorting)

	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	<i>L. canicola</i>	<i>L. grippotyphosa</i>
ID	Li84	Lc87	ATCC 23604
O.D. 450 нм	0.709	0.53	0.73
FTU	341	256	400
FACS	1.8*10E9 U/мл	1.2*10E9 U/мл	2.4*10E9 U/мл
<b>ИНАКТИВАЦИЯ</b> Гипербарическая	<b>2500b/60' (инакт1)</b>	<b>2500b/60' инакт 1)</b>	<b>2500b/60' (инакт 1) - 2500b/30'</b>
			<b>(инакт 2)</b>
Инактивация контроль	-	-	-
<b>ИНАКТИВАЦИЯ</b> <b>Химическая</b>	<b>Мертиолат 0.1g/L</b>		
Инактивация контроль	-	-	-

Все испытанные условия инактивации привели к инактивации лептоспир. Контролями инактивации служат обычно используемые контроли, и их порог обнаружения известен и достаточно чувствителен, чтобы обнаружить бактерию, живущую в нескольких миллилитрах. Вкратце, образцы центрифугируют для получения контрольного продукта, чтобы собрать инактивированные бактерии в осадке и удалить как можно больше инактивирующего агента в надосадочной жидкости и затем перенести осадок культуры в свежую среду. Ту же среду проверяют с помощью теста на жизнеспособность и рост определяется посевом такого малого количества, как 10 бактерий Leptospira. После инактивации проводили исследования на антигенность с использованием трех типов сывороток: 1) моноклональные антитела против ЛПС, не вступающие в перекрестную реакцию между различными сероварами; 2) моноспецифические поликлональные антитела к липопротеину (LIPL); и 3) поликлональные антитела, специфичные для не LigA/B (распознавание общих эпигенов). Табл. 3 детализирует природу различных антител.

Таблица 3. Антитела, используемые для исследований на антигенность Leptospira.

M: моноклональные антитела (Ab); P: поликлональные антитела (Ab)

M(Моноклональные)/ P (Поликлональные)	LPS	LipL32	LipL41	LipL46	LigA	LigB
LI	M	P	P	P	P	P
LC	M	P	P	P	P	P
LG	M	P	P	P	P	P

В одной публикации было отмечено исчезновение некоторых мембранных белков после гипербарической обработки (M.Ritz et al., International Journal Of Food Microbiology, 2000) - данные антигены следует искать в целых бактериальных суспензиях (или Brutes Crops-RB), осадках или надосадочных жидкостях из таких бактериальных суспензий после центрифугирования, до и после инактивации. Вестерн-блоты данных антигенов для трех штаммов представлены на фиг. 10-13. Антигены LipL32, LipL41 и LipL46 (фиг. 10 и 12) распознавались поликлональными антителами для всех трех способов обработки. Гипербарическая инактивация не изменяла антигенные свойства; однако, некоторая деградация антигена LipL32 и LipL46 была замечена после гипербарической обработки, по сравнению с неинактивированными или химически инактивированными группами (особенно для L.grippotyphosa, фиг. 12).

Антигены LigB и LIGA (фиг. 11 и 13) распознавались поликлональными антителами для всех трех способов обработки. Гипербарическая инактивация не влияет на антигенные свойства данных антигенов, и надосадочные жидкости/осадки остаются неизменными для всех рассмотренных обработок. Наконец, результаты анализов ЛПС для Li и Lg представлены на фиг. 14A и B. LPS распознаются после гипербарической инактивации, и выявленные количества идентичны до и после инактивации. В заключение, гипербарическая инактивация лептоспир является эффективной и не приводит к изменениям в их антигенных свойствах.

Пример 4. Термическая и гипербарическая инактивация *Bordetella pertussis*.

1) Получение концентрированной суспензии *B.pertussis*.

Образец после сублимационной сушки, полученный из штамма *B.pertussis*, предоставленного лабораторией биологии отдела Boston Public Health Department (Massachusetts - USA) (Ref 214873M1), помещали в среду Verwey (J. Bacteriol. 1949; 58:127-34) и использовали для посева на твердую среду Bordet-gengou, дополненную 25% дефибринированной овечьей крови. После инкубации (72 ч при 36°C) бактерии затем переносили в жидкую среду Verwey с добавлением 1 г/л ультрафильтрованного автолитического дрожжевого экстракта (Ref: Springer 0701) и культивировали при 36°C в течение около 24 ч. Затем бактерии переносили в биореактор, наполненный 4,5 л среды Cohen Wheeler (American Journal of Public health, 1946, 36, 371-376) с добавлением 1 г/л ультрафильтрованного автолитического дрожжевого экстракта, начальное значение pH 7,3 и культивировали при 35°C с установленным значением pO2 в 26%. Когда оптическая плотность клеточной суспензии достигла 0,4 при 650 нм, часть данной культуры использовали для инокуляции второго биореактора. Данный производственный биореактор наполняли 4,5 л среды Cohen Wheeler с добавлением 1 г/л ультрафильтрованного автолитического дрожжевого экстракта. Данную культуру инкубировали при 35°C, с установкой содержания растворенного кислорода на уровне 26%, начальное значение pH 7,3 и останавливали через около 20 ч после инокуляции. Суспензию

клеток концентрировали 1) центрифугированием объема культуры при около 21000 g в течение около 30 мин при + 5°C и 2) ресуспенсированием осадка клеток в объеме, который был в около 14 раз меньше объема надосадочной жидкости культуры.

2) Термическая обработка концентрированной суспензии *B.pertussis*.

Термическую обработку концентрированной суспензии клеток в надосадочной жидкости культуры проводили на водяной бане, имеющей систему мониторинга температуры, которая контролирует настройки температурных параметров так, чтобы температура воды в бане ступенчато повышалась от 38 до 50°C в течение 15-минутного периода времени, за которым следует 30-минутный период времени, когда температура поддерживалась от 50 до 54°C, и, наконец, 15-минутный период времени, когда температура ступенчато снижалась с 50 до 38°C.

Жизнеспособность концентрированной суспензии клеток оценивали до и после термической обработки, перенося аликовты в 0,5 мл на 3 чашки Петри, содержащие твердую среду Bordet-gengou (Merck; Ref AX029167) с добавлением 25% овечьей крови (BioMerieux; REF: 55822). Бактерии подсчитывали после инкубации в чашках Петри при 36,5°C в течение 5 дней (табл. 4).

Таблица 4. Жизнеспособность концентрированных суспензий

*B.pertussis* до и после термической обработки

	Число колоний (в CFU/мл)
концентрированная в 14 раз суспензия клеток	$6.5 \times 10^{10}$
концентрированная в 14 раз и обработанная нагреванием суспензия клеток	$1.4 \times 10^6$

Оценивали также другие настройки температурных параметров, относящиеся к периодам времени, выделенным для ступенчатого увеличения и ступенчатого снижения температуры от 38 до 50°C, в частности, для различных периодов времени от 5 до 30 мин. Данные изменения, как было показано, не оказывают никакого влияния на процесс инактивации.

3) Гипербарическая обработка термически обработанного концентрата *B.pertussis*.

Испытывали различные условия гипербарической обработки: 2000 бар в течение 30 мин, 3000 бар в течение 30 или 90 мин, 4000 бар в течение 30 или 90 мин и 5000 бар в течение 30 и 90 мин. Некоторые условия повторяли несколько раз.

Жизнеспособность концентрированной суспензии клеток контролировали после гипербарической обработки с использованием того же протокола, как описано в предыдущем параграфе. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5. Остаточная жизнеспособность *B.pertussis* после различных условий гипербарической обработки

Давление (в бар)	Время (в минутах)	Остаточная жизнеспособность
2000	30	+
3000	30	+/-
3000	90	-
4000	30	-
4000	90	-
5000	30	-
5000	90	-

+: Остаточный бактериальный рост наблюдался по меньшей мере на одной из 3 чашек Петри, используемых для контроля клеточного роста.

+/-: Остаточный бактериальный рост иногда наблюдался по меньшей мере на одной из 3 чашек Петри, используемых для контроля клеточного роста, когда были повторены те же гипербарические условия.

-: Остаточный бактериальный рост не наблюдался на 3 чашках Петри, используемых для контроля роста клеток.

Данные результаты показывают, что концентраты, подвергшиеся термической и гипербарической обработке, полностью инактивировались (без остаточного бактериального роста), когда проводилась гипербарическая обработка при давлении в 3000 бар в течение более чем 30 мин. Когда применялась гипербарическая обработка при давлении выше, чем в 3000 бар, (например, 4000 или 5000 бар), было достаточно 30-минутного периода времени или менее того, чтобы полностью инактивировать подвергшиеся термической и гипербарической обработке концентраты.

Подвергшиеся термической и гипербарической обработке концентраты, которые полностью инактивировались, также были испытаны в "тесте на восстановление". Данный тест использовали для оценки того, подтверждаются ли результаты инактивации, наблюдаемые сразу после стадии гипербарической обработки, после периода покоя в 15 дней. Подвергшиеся термической и гипербарической обработке концентраты, которые, как было установлено, являются инактивированными, хранили при комнатной температуре в течение 15 дней. Три образца по 0,5 мл затем отбирали из концентратов и высевали на три чашки Петри, содержащие твердую среду Bordet-gengou, дополненную 25% овечьей крови. Чашки Петри инкубировали в течение 6 дней при 36,5°C и контролировали на присутствие колоний. Если не было об-

наружено никаких колоний, это означает, что не было никакого феномена восстановления, поскольку больше не было найдено жизнеспособных бактерий в полностью инактивированных концентратах, которые испытывали, в частности, в концентрате, подвергнувшемся термической и гипербарической обработке, который был подвергнут воздействию давления в 4000 бар в течение 90 мин.

4) Характеристика инактивированного термической и гипербарической обработкой концентрата *B. pertussis*.

Биологические и аналитические признаки инактивированного термической и гипербарической обработкой концентрата, в частности, концентрата клеток, подвергнутого воздействию давления в 4000 бар в течение 90 мин, сравнивали с таковыми признаками инактивированного мертиолатом концентрата *B. pertussis*, обычно используемого в качестве одновалентного основного компонента для производства цельноклеточной коклюшной вакцины. Концентрат *B. pertussis*, который был инактивирован обработкой мертиолатом, получали в соответствии с протоколом, описанным в параграфе 1).

#### 4.1) Сканирующая электронная микроскопия.

Морфологические признаки инактивированного термической и гипербарической обработкой концентрата и инактивированного мертиолатом концентрата, в качестве контроля, исследовали способом сканирующей электронной микроскопии (scanning electron microscopy (SEM)). Концентраты клеток фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде в PBS с последующей фиксацией в 1%-ном водном растворе тетроксида осмия. Данные материалы затем обезвоживали в этаноле, а затем в гексаметилдисилизане. Два образца затем помещали на пластинки слюды для последующего наблюдения с помощью SEM (Hitachi S4700, 8KV) при различных увеличениях. Полученные электронной микроскопией фотографии (X30000-кратное увеличение) инактивированного термической и гипербарической обработкой концентрата, подвергнутого воздействию давления в 4000 бар в течение 90 мин (правая сторона) и инактивированного мертиолатом концентрата (левая сторона) показаны на фигурах. Никаких существенных различий в морфологии не было обнаружено между двумя образцами, которые были получены после двух процессов инактивации. В частности, в образце, который был отобран из инактивированного термической и гипербарической обработкой концентрата, не наблюдалось ни бактериального лизиса, ни деформации клеточной стенки бактерий.

#### 4.2) Эффективность инактивированного термической и гипербарической обработкой концентрата.

Эффективность инактивированного термической и гипербарической обработкой концентрата, подвергнутого воздействию давления в 4000 бар в течение 90 мин, оценивали определением дозы, которая обеспечивает защиту 50% мышей (ED 50) от воздействия смертельной дозы штамма *Bordetella pertussis* при внутрицеребральном введении. Данную дозу сравнивали с ED 50 референсной коклюшной вакцины, калиброванной в международных единицах. Тест на эффективность проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ, упомянутыми в ВОЗ TRS № 941. Полученные результаты были удовлетворительными, что означает, что объединение термической обработки и гипербарической обработки не снижает активность инактивированного препарата.

#### 4.3) Специфическая токсичность.

Токсичность инактивированного термической и гипербарической обработкой концентрата, подвергнутого воздействию давления в 4000 бар в течение 90 мин, тестировали на токсичность с использованием теста прибавки массы мышей в соответствии с рекомендациями ВОЗ, упомянутыми в TRS ВОЗ № 941. Полученные результаты были удовлетворительными, без признаков токсичности.

#### 4.4) Содержание эндотоксина.

Цельноклеточная коклюшная вакцина содержит липо-олигосахаридные эндотоксины, которые количественно определяются анализом лизата амебоцитов *Limulus amebocyte lysate*). Содержание эндотоксина в инактивированном термической и гипербарической обработкой концентрате было в пределах того же порядка величины содержания эндотоксина в инактивированном мертиолатом концентрате *B. pertussis*.

Пример 4. Солюбилизация белка KSAC, экспрессируемого в тельцах включения *E.coli*.

Тельца включения с KSAC (см. приложения, вытекающие из USSN 61/694968) были приготовлены в следующих трех буферах: 1) Трис 20 mM, 50 mM DTT, pH 8; 2) Трис 20 mM, 50 mM DTT, pH 8, мочевина 1M; 3) Трис 20 mM, 50 mM DTT, pH 8, мочевина 2M. Тельца включения с KSAC, приготовленные в таких же буферах при комнатной температуре без воздействия давления на протяжении всей продолжительности обработки, использовали в качестве контролей.

Повышение давления до целевого давления применяли в течение 48 ч, а затем сбрасывали давление, оказываемое на образцы, в течение 24 ч. Фиг. 25 изображает SDS-PAGE образцов KSAC, обработанных давлением в 3000 бар. Фиг. 26 изображает наложенную хроматограмму ВЭЖХ надосадочной жидкости образцов с KSAC, обработанных давлением в 3000 бар, и белка KSAC, полученного классическим способом рефолдинга/солюбилизации. Результаты показывают, что пики похожи и что растворимый белок, полученный обработкой под высоким давлением, организован в тример.

Таблица 6. Количественная оценка белка KSAC после обработки давлением в 3000 бар посредством qDot-блота и ВЭЖХ

	2M мочевина		
	контроль	Анализируемый осадок	Анализируемая надосадочная жидкость
Dot-блот мкг/мл	347	10	797
HPLC мкг/мл	-	-	723
1M мочевина			
	Контроль	Анализируемый осадок	Анализируемая надосадочная жидкость
Dot-блот мкг/мл	328	10	750
ВЭЖХ мкг/мл	-	-	746
Без мочевины			
	Контроль	Анализируемый осадок	Анализируемая надосадочная жидкость
Dot-блот мкг/мл	123	15	649
ВЭЖХ мкг/мл	-	-	825

Количество растворенного белка составляло около 800 мкг/мл, что было очень близко к оцениваемому количеству первоначального белка KSAC в виде телец включения (1000 мкг/мл). Таким образом, выход был очень высоким (от 75 до 100%).

На фиг. 27 представлено наложение данных DLS, полученных с белком, обработанным давлением в 3000 бар (светлая линия) в буфере без мочевины, и с белком, полученным классическим способом рефолдинга/солюбилизации (темная линия). Исчерпывающий диапазон размеров (верхняя панель) показывает, что меньше объектов большего размера обнаружено в образцах, бывших под давлением. Распределение по числу (нижняя панель) показывает, что большая часть молекул популяции, в которой рефолдинг происходил под давлением, имеет сходный размер с размером молекул популяции, полученной рефолдингом классическим способом, и фолдинг выглядит очень похожим.

Фиг. 28 показывает, что размеры белка, полученные при давлении в 3000 бар, идентичны размерам белка, полученным из рефолдинга/солюбилизации способом классической хроматографии, для всех используемых здесь буферов. При обработке давлением в 2000 бар размеры белка идентичны размерам белка из рефолдинга/солюбилизации способом классической хроматографии при использовании мочевины в буфере. При давлении выше чем 3000 бар появляются агрегаты высокого давления, если не используется мочевина. С мочевиной, присутствующей в буфере, белок, очевидно, коллапсирует (размером в 10 нм), что указывает на то, что произошла денатурация.

На фиг. 29 показано сравнение содержания растворимого белка KSAC, определенного посредством ВЭЖХ и Qdot-блоттинга. Результаты показывают, что максимальные концентрации растворенных белков получают в образцах, обработанных давлением в 3000 бар, с хорошей согласованностью между способами ВЭЖХ и Qdot-блот. Для образцов, обработанных давлением в 2000 бар, присутствие мочевины способствует увеличению выхода солюбилизации. Для образцов, обработанных давлением в 4000 бар, ВЭЖХ дает более высокий выход, чем Qdot-блот, что указывает на потерю распознавания антигенов.

Пример 3. Сравнение различных способов гипербарической солюбилизации - белок KSAC.

Целью исследования является сравнение различными способами эффективности солюбилизации белка из телец включений.

Тельца включений с KSAC, полученные из E.coli, были приготовлены в следующих буферах с образованием суспензии телец включений: а) 20 мМ Трис-буфер, 50 мМ дитиотреитол (ДТТ), pH 8,0; б) 20 мМ Трис-буфер, pH 8,0.

Суспензии телец включения хранили в пробирках Quick Seal для обработок высоким давлением, как описано ниже. При способе А к суспензии телец включений применяли ступенчатое повышение давления с увеличением давления от 0 бар до 3000 бар при скорости в 1000 бар/мин, с плато продолжительностью 1 ч при каждом повышении на 500 бар (целевое давление в 3000 бар, достигнутое после 5 ч). Давление в 3000 бар поддерживали в течение 48 ч. Затем с образцов сбрасывали давление от 3000 бар до 0 бар при постоянной скорости в 125 бар/ч в течение 24 ч. При способе В суспензии телец включений обрабатывали в соответствии со способом, описанным в патенте США 6489450. Образцы подвергали воздействию повышения давления с постоянной скоростью до 2500 бар в 1 ч. Давление в 2500 бар поддерживали в течение 6 ч. Сбрасывание давления выполняли с постоянной скоростью в течение 1 ч, уменьшая давление от 2500 до 0 бар. Образцы готовили, как показано в табл. 7 ниже.

Таблица 7. Обработка суспензий телец включений

Образец (1 мг/мл) Тельца включений с KSAC	Буфер	Способ обработки высоким давлением
1	Трис 20 мМ	Способ А
2	Трис 20 мМ + ДТТ 50 мМ	Способ А
3	Трис 20 мМ	Контроль*
4	Трис 20 мМ + ДТТ 50 мМ	Контроль
5	Трис 20 мМ	Способ В
6	Трис 20 мМ + ДТТ 50 мМ	Способ В
7	Трис 20 мМ	Контроль
8	Трис 20 мМ + ДТТ 50 мМ	Контроль

Контроль\*: нет обработки под высоким давлением, хранение при комнатной температуре.

Анализ способом SDS-PAGE.

После обработок под высоким давлением образцы центрифугировали, чтобы отделить надосадочную жидкость и осадок, и обрабатывали для анализа белков способом SDS-PAGE. Анализ способом SDS-PAGE показан на фигурах 18A и 18B. В каждую лунку загружали 5 мкл образца (неочищенный) или 5 мкл надосадочной жидкости или 5 мкл осадка, ресуспендированного в трис-буфере.

Количества белка KSAC, рассчитанные по интенсивности полос на SDS-PAGE, представлены ниже в табл. 8.

Таблица 8. Сравнительная интеграция интенсивностей полос, измеренных на SDS гелях

образец	Способ А				Способ В			
	I.I. KSAC полоса	Сумма рный белок I.I.	%KSA C /всего	%KSAC -S /%KSA C-P*	I.I. KSAC полоса	Сумма рный белок I.I.	%KSA C /всего	%KSAC- S /%KSAC- P
KSAC сравнительный	36	49	73%	-	29	47	62%	
Контроль – без ДТТ	S <sup>1</sup>	0	0%	0%	0	0	0%	-
	P <sup>2</sup>	13	50%		4	5	80%	
	C <sup>3</sup>	3	14%		6	16	38%	
Способ – без ДТТ	S	0	0%	0%	0	2	0%	0%
	P	43	57%		28	39	72%	
	C	27	31%		14	41	34%	
Контроль – с ДТТ	S	1	13%	-	0	0	0%	-
	P	20	50%		24	36	67%	
	C	16	52%		22	37	59%	
Способ – с ДТТ	S	55	43%	75%	18	29	62%	69%
	P	8	57%		8	9	89%	
	C	45	42%		28	47	60%	
KSAC срав- нительный	38	52	73%		29	45	64%	

S : надосадочная жидкость;

P<sup>2</sup>: осадок;

C<sup>3</sup>: неочищенный, перед центрифугированием;

% KSAC-S/%KSAC-P\*: [% KSAC/всего в надосадочной жидкости]/[% KSAC/всего в осадке].

Результаты показывают, что не было обнаружено значительного количества KSAC в надосадочной жидкости контрольных образцов или образцов, обработанных в соответствии со способами А и В, при использовании буфера, не содержащего ДТТ. Растворимый белок KSAC был обнаружен в надосадочной жидкости образцов, обработанных высоким давлением (оба процессы А и В) при использовании буфера, содержащего ДТТ. Неожиданно, но результаты количественного определения белка способом SDS-PAGE показывают также, что способ А обеспечивал лучшую солюбилизацию по сравнению со способом В. Данный неожиданный результат был дополнительно подтвержден более точным расчетом выхода солюбилизации для каждого способа обработки под высоким давлением с использованием Q-дот-блота и ВЭЖХ.

Анализ Q-дот блот.

Надосадочные жидкости образцов были проанализированы с помощью Q-дот-блота для оценки количества белка KSAC, солюбилизированного обработками. Результаты показаны на фиг. 30A-30D и в табл. 11.

Таблица 11. Концентрации растворенного KSAC, найденные в надосадочных жидкостях для контрольных образцов и образцов, обработанных высоким давлением

Тип образца	Способ А	Способ В
Обработка без ДТТ	26.0 г/мл	12.7 г/мл
Контроль без ДТТ	0	9.9 г/мл
Обработка с ДТТ	632.1 г/мл	368.9 г/мл
Контроль без ДТТ	61.7 г/мл	63.9 г/мл

Не наблюдалось существенной разницы между контрольными образцами (без обработки под высоким давлением) с ДТТ и без него. В надосадочной жидкости не был найден растворимый KSAC. Резуль-

тат Q-дот-блота подтвердил результат, полученный способом SDS-PAGE.

Обработка, осуществляемая при использовании способа А в присутствии ДТТ, позволила провести солюбилизацию и рефолдинг белка KSAC (детектировано Q-дотом). Концентрация растворимого белка KSAC, как было установлено, составляла 632 мкг/мл при использовании способа А, в то время как концентрация белка KSAC, полученного с использованием способа В, составляла только около 369 мкг/мл. Полученные уровни солюбилизации составляли 63% для способа А и 37% для способа В. Результаты Q-дот-блота дополнительно демонстрируют, что способ А является более эффективным в производстве растворимых и повторно свернутых белков.

#### Анализ способом ВЭЖХ.

На фиг. 20 показана суперпозиция ВЭЖХ-хроматограмм надосадочной жидкости контрольного образца и образца, обработанного по способу А. Время удерживания, удерживаемый объем и оцененная степень чистоты, полученные для образца, обработанного по способу А, показаны в табл. 11 ниже.

Таблица 11. Время удерживания, удерживаемый объем и оцененная степень чистоты, полученные для образца, обработанного по способу А

Детекция	Информация	Контроль - без обработки	После способа А
УФ	RT (Время удерживания – мин)	12.7	12.4
	VR (Удерживаемый объем – мл)	6.64	6.46
	Оцененная степень чистоты (%)	17.3	85.5

На фиг. 21 показана суперпозиция ВЭЖХ-хроматограмм надосадочной жидкости образца, обработанного по способу А, и образца, обработанного по способу В. Время удерживания, удерживаемый объем и оцененная степень чистоты, полученные для образца, обработанного по способу А, и образца, обработанного по способу В, представлены в табл. 12 ниже.

Таблица 12. Время удерживания, удерживаемый объем и оцененная степень чистоты, полученные для образцов, обработанных по способу А и способу В

Детекция	Информация	Способ А	Способ В
UV	RT (Время удерживания – мин)	12.4	12.4
	VR (Удерживаемый объем - мл)	6.46	6.47
	Оцененная степень чистоты (%)	85.5	74.2

На фиг. 22 показана суперпозиция ВЭЖХ-хроматограмм надосадочной жидкости образца, обработанного по способу А, образца, обработанного по способу В, и образца, обработанного классическим способом (денатурация и рефолдинг, полученные обработкой мочевиной и ДТТ). Время удерживания, удерживаемый объем и оцененная степень чистоты, полученные для образцов, обработанных по способу А, способу В и классическим способом, приведены в табл. 13 ниже.

Таблица 13. Время удерживания, удерживаемый объем и оцененная степень чистоты, полученные для образцов, обработанных по способу А, способу В и классическим способом

Детекция	Информация	Классический способ	Способ А	Способ В
UV	RT (Время удерживания – мин)	12.5	12.4	12.4
		6.50	6.46	6.47
	VR (Удерживаемый объем)	8628	25251	10506
	Площадь пика (mAU)	94.7	85.5	74.2
	Оцененная степень чистоты (%)			

Результаты ВЭЖХ дополнительно подтвердили, что способ А обеспечивает лучшую солюбилизацию белка KSAC, чем способ В, судя по площадям пиков (25251 mAU для способа А против 10506 mAU для способа В). Как способ А, так и способ В позволяют получить рефолдинг белка KSAC, очень близкий к полученному с использованием классического способа (солюбилизация с использованием мочевины + обработка ДТТ и рефолдинг хроматографией SEC).

Испытания, проводимые с обоими способами А и В, не дали значительного количества растворимого белка KSAC в отсутствие ДТТ. Результаты подтвердили, что восстанавливающий агент необходим при обработке высоким давлением, чтобы разорвать дисульфидные связи. Тем не менее, неожиданное удивительное открытие заключается в том, что нет необходимости в удалении ДТТ для того, чтобы получить правильный рефолдинг белка. В отличие от общего мнения, что ДТТ должен быть удален из буфера для того, рефолдинг белков прошел правильным образом, заявители неожиданно обнаружили, что наличие ДТТ не мешает процессу рефолдинга при обработке высоким давлением по настоящему изобретению. Растворимые белки KSAC, полученные способом высокого давления по настоящему изобретению, были правильно повторно уложены с образованием тримеров в присутствии ДТТ.

#### Ссылки.

C. Silva et al.: Effect of hydrostatic pressure on the Leptospira interrogans: high immunogenicity of the pressure-inactivated serovar hardjo; Vaccine 19, 2001, 1511-1514.

P. Cullen et al.: Surfaceome of Leptospira spp.; Infection And Immunity 73, 2005, 4853-4863.

W. Yan et al.: Immunogenicity and protective efficacy of recombinant leptospira immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model; *Microbes And Infection* 2, 2009, 230-237.

M. Ritz et al.: Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*; *International Journal of Food Microbiology* 55, 2000, 115-119.

N. Wilkinson et al.: Resistance of polioviruses to inactivation by high hydrostatic pressures; *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2, 2001, 95-98.

Isbarn S. et al.: Inactivation of avian influenza virus by heat and high hydrostatic pressure; *Journal of Food Protection* 70, 2007, 667-673.

Shearer and Kniel. High Hydrostatic Pressure for Development of Vaccines. *Journal of Food Protection*. Vol. 72, No. 7, 2009, pages 1500-1508.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гипербарическое устройство для инактивации микроорганизмов или солюбилизации и рефолдинга белков, содержащее:

- (a) корпус,
- (b) по меньшей мере один компьютерный процессор,
- (c) средство для подачи сверхвысокого давления из окружающей среды, включающее изостатический пресс, включающий плунжер,

(d) средство для регулирования температуры и давления в передающей давление жидкости, где средство регулирования температуры включает местную подачу циркулирующей воды для точного управления температурой корпуса устройства,

(e) средство для дезактивации устройства в целях обычной очистки или в случае разрыва мешочка с образцом,

(f) средство для приема в устройство, передачи в устройстве и вывода из устройства лотков или сосудов, которые приспособлены для получения мешочков с образцами, содержащими либо микроорганизмы, которые подлежат инактивации, либо пептиды, которые подлежат солюбилизации и рефолдингу,

- (g) средство для мониторинга состояния инактивации микроорганизмов,

- (h) устройство усилителя давления,

- (i) камеру первичной жидкости, и

- (j) камеру жидкости под высоким давлением,

где гипербарическое устройство сконфигурировано для передачи контролируемых количеств давления в мешочки для образцов путем первоначального сообщения давления камере первичной жидкости через камеру усилителя давления, которая принимает жидкость высокого давления из устройства для усиления давления, и

где давление в камере первичной жидкости передается камере жидкости под высоким давлением через плунжер.

2. Устройство по п.1, где средство для мониторинга состояния инактивации включает иглу или другой подходящий зонд, который может асептически проколоть мешочки для удаления образца микроорганизмов для последующего тестирования жизнеспособности.

3. Устройство по п.2, изображенное на фиг. 2А, включающее:

- (a) камеру первичной жидкости (8),

- (b) устройство усилителя давления (9),

(c) камеру жидкости под высоким давлением (3), которая сконфигурирована для получения жидкости через выпускное отверстие (2),

(d) пневмоцилиндр/плунжер (5), который способен двигаться между выдвинутым положением и втянутым положением,

(e) уплотнение (6) и втулку (7), которые сконфигурированы для предотвращения выхода жидкости из камеры (3) жидкости под высоким давлением, когда плунжер (5) двигается из его втянутого положения в его выдвиннутое положение,

- (f) устройство усиления давления и

(g) средство для блокирования плунжера (5) от втягивания после того, как он выдвинулся достаточно далеко для закрытия камеры высокого давления от камеры первичной жидкости,

в котором давление передается из устройства усиления давления в камеру усиления давления (9) и из камеры усиления давления (9) в камеру первичной жидкости (8) через плунжер (5),

в котором давление из камеры (8) первичной жидкости сообщается с камерой (3) жидкости под высоким давлением при движении плунжера (5) из его втянутого положения в его выдвиннутое положение, и

в котором после завершения цикла(ов) повышения давления и сброса давления жидкость выходит через выпускное отверстие (4).

4. Способ гипербарической инактивации микроорганизмов с целью получения микроорганизмов, пригодных в качестве компонентов вакциновой композиции, содержащий стадии:

(а) подвергание микроорганизмов воздействию повышенного давления в течение определенных периодов времени,

(б) определение того, что микроорганизмы на 100% инактивированы,

(с) определение того, что 100% инактивированных микроорганизмов сохранили свой иммуногенный потенциал, таким образом, инактивируя микроорганизмы, и

который осуществляется с помощью устройства по п.1.

5. Способ гипербарической инактивации клеток суспензии *Bordetella pertussis*, содержащий стадии:

(а) получение суспензии клеток *Bordetella pertussis* в культуральной среде,

(б) концентрирование суспензии клеток, полученной на стадии а), в культуральной среде с добавлением раствора 0,9% NaCl или буферного раствора, объем которого не превышает 25% от конечного объема (об./об.),

(с) нагревание концентрированной суспензии клеток при температуре от 50 до 54°C (пределы включены) и

(д) инактивация термически обработанной и концентрированной суспензии клеток обработкой под высоким давлением, которое выше 2000 бар, но ниже 6000 бар,

который осуществляется с помощью устройства по п.1.

6. Способ по п.5, в котором нагревание при температуре от 50 до 54°C (пределы включены) длится около 30 мин и в котором давление составляет от 3000 до 5000 бар.

7. Способ изготовления цельноклеточной коклюшной вакцины, содержащий стадии:

(а) осуществление способа по п.5 или 6 для инактивации концентрированной суспензии клеток *Bordetella pertussis*,

(б) разбавление суспензии, полученной на стадии а), в фармацевтически приемлемом наполнителе с получением цельноклеточной коклюшной вакцины.

8. Способ по п.4, в котором микроорганизмы подвергают более чем одному циклу повышенного давления и дополнительно включающий стадию мониторинга степени инактивации микроорганизмов как функции времени с помощью средства автоматической проверки жизнеспособности и оценки их иммуногенности.

9. Композиция, содержащая белок, повторно свернутый под действием гипербарического устройства по п.1.

10. Композиция по п.9, в которой белок подвергают воздействию высокого давления в интервале от около 1000 до около 5000 бар, в которой высокое давление прикладывали в течение по меньшей мере 20 ч, в которой белок был солюбилизирован или повторно свернут из телец включения *E.coli*, в которой тельца включения *E.coli* готовили в буфере, не содержащем мочевины или с низким содержанием мочевины, в которой необязательно тельца включения *E.coli* готовили в буфере, содержащем ДТТ, в которой необязательно тельца включения *E.coli* дополнительно подвергали воздействию высокого давления в пределах от около 1000 до около 5000 бар.

11. Композиция по п.10, в которой давление, оказываемое на тельца включения *E.coli*, сбрасывали со скоростью, составлявшей от около 83 до около 125 бар/мин.

12. Способ получения растворимого белка, экспрессируемого в *E.coli*, содержащий стадии:

(а) получение телец включения *E.coli* в буфере, не содержащем мочевины или с низкой концентрацией мочевины, с образованием суспензии телец включения, и

(б) подвергание суспензии телец включения воздействию высокого давления, получая, таким образом, растворимый белок, и

который осуществляется с помощью устройства по п.1.

13. Способ по п.12, в котором буфер дополнительно содержит ДТТ.

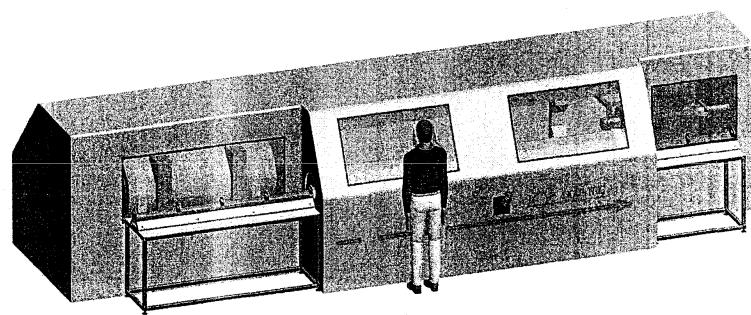
14. Способ по п.12, в котором высокое давление находится в диапазоне от около 2000 до около 5000 бар.

15. Способ по п.12, в котором тельца включения подвергают воздействию высокого давления в течение от около 20 до около 100 ч.

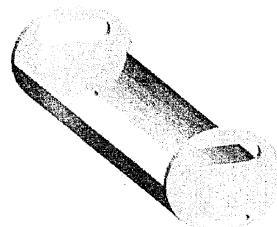
16. Способ по п.13, в котором концентрация ДТТ составляет от около 1 до около 100 мМ.

17. Способ по п.12, в котором концентрация мочевины составляет до 7 М.

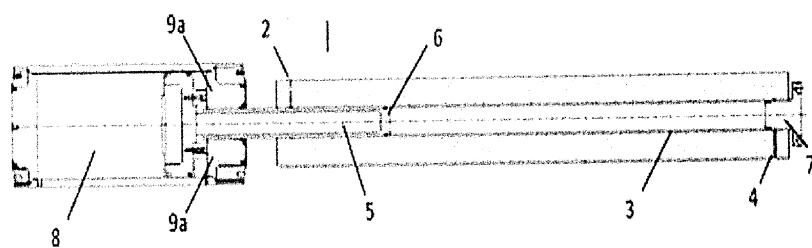
18. Способ по п.12, который дополнительно содержит стадию сброса давления.



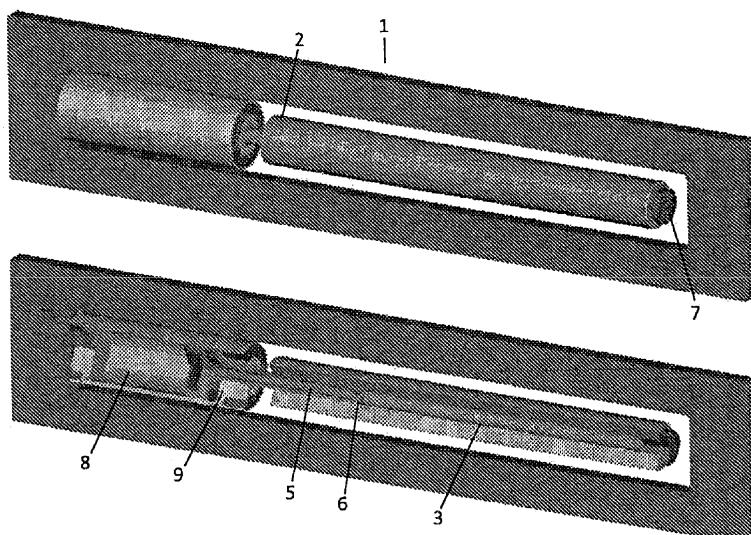
Фиг. 1А



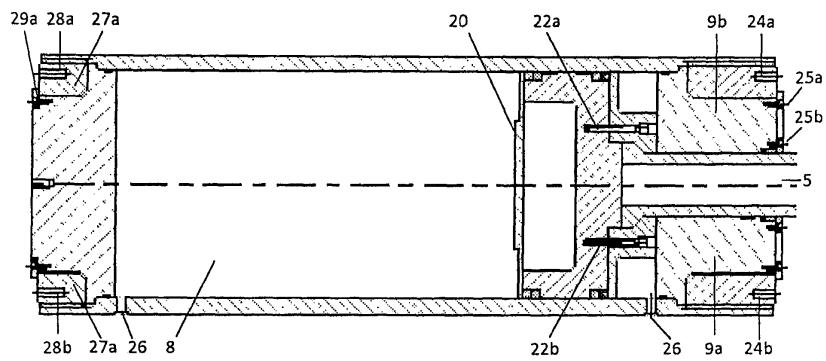
Фиг. 1В



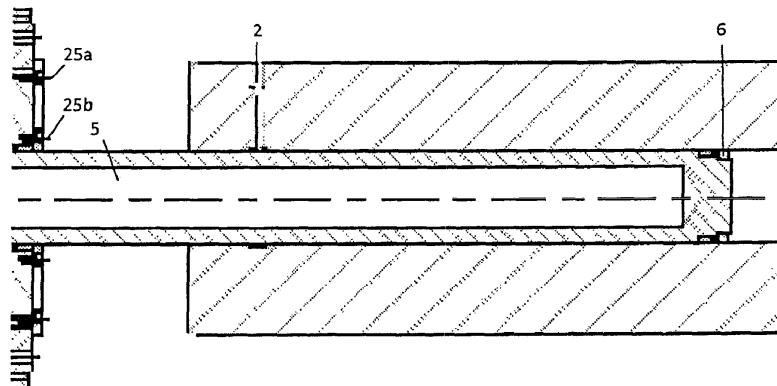
Фиг. 2А



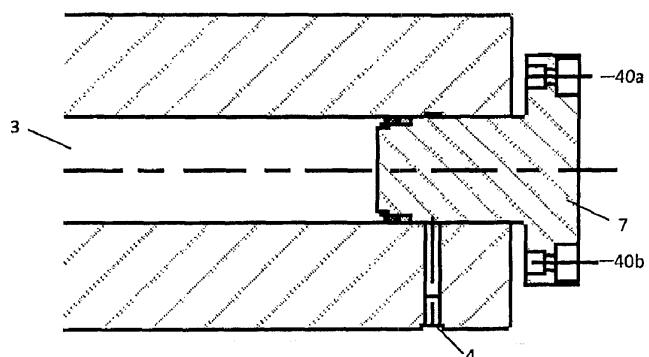
Фиг. 2В



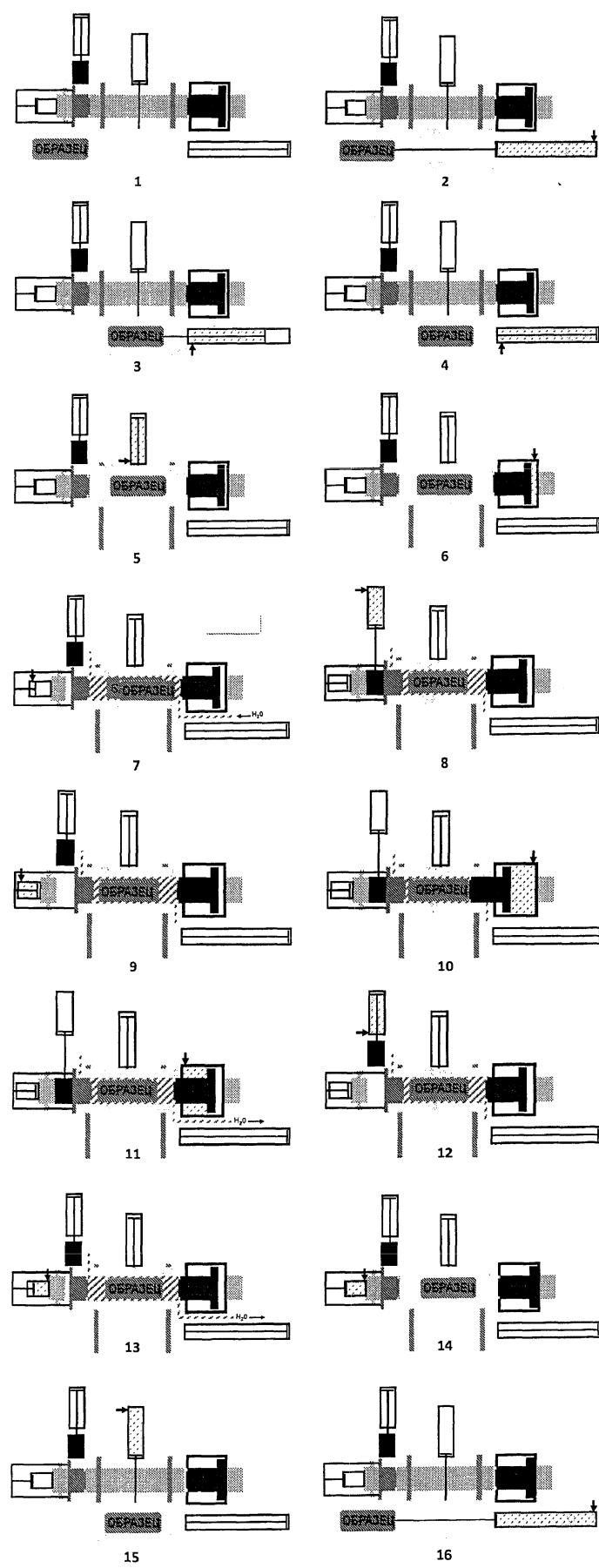
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

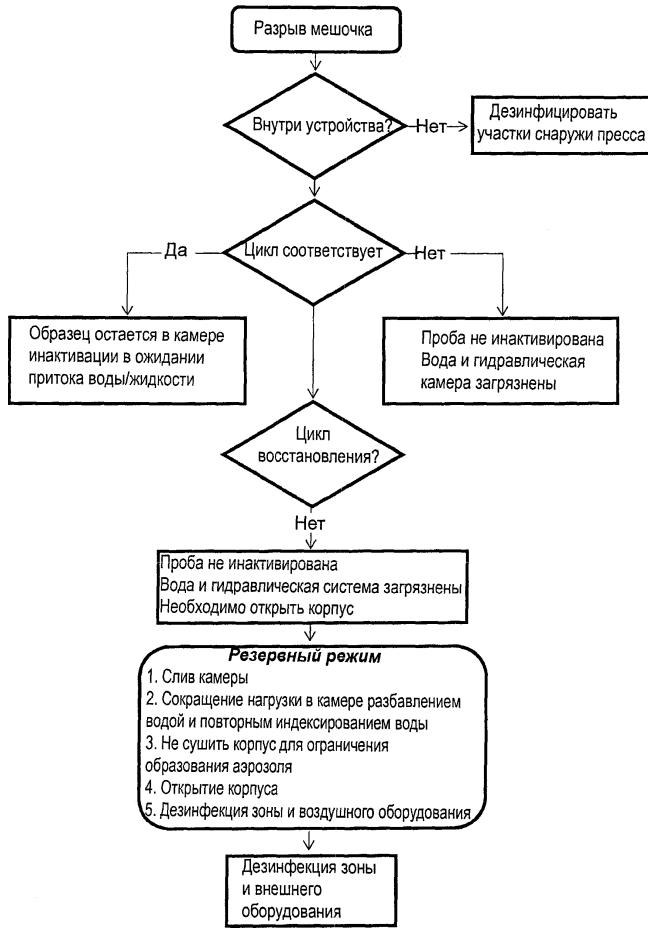


ФИГ. 6

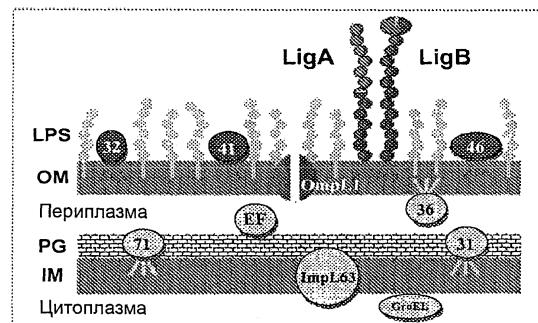
## Безопасная процедура работы гипербарического устройства



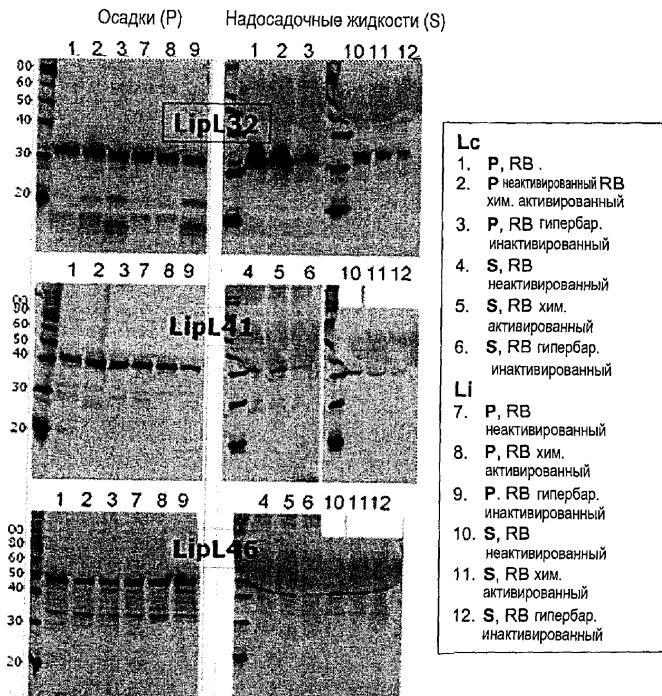
Фиг. 7



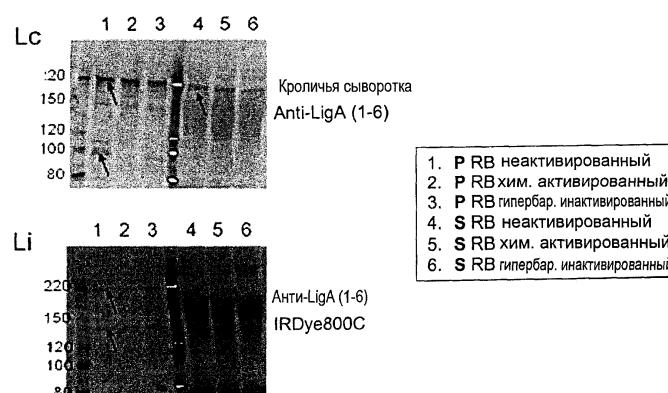
Фиг. 8



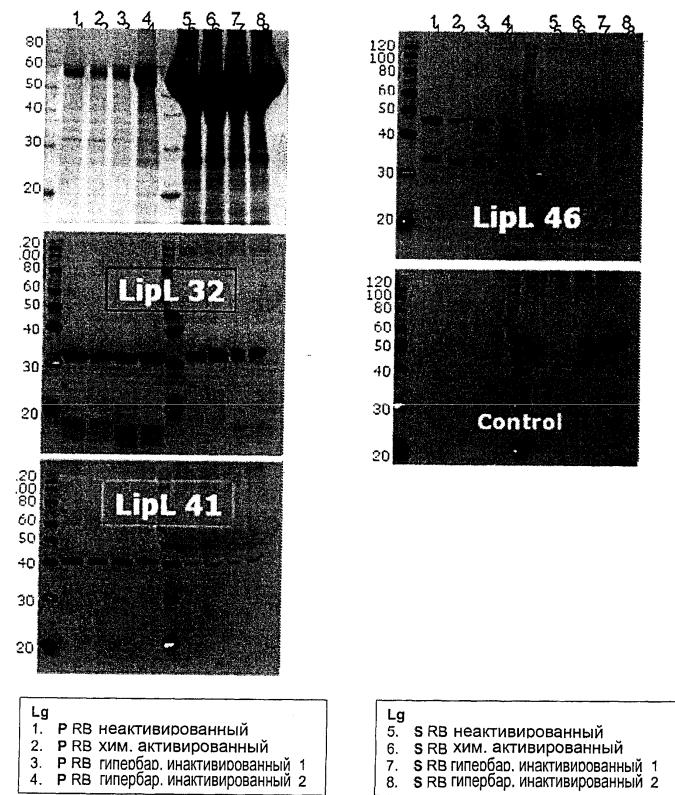
Фиг. 9



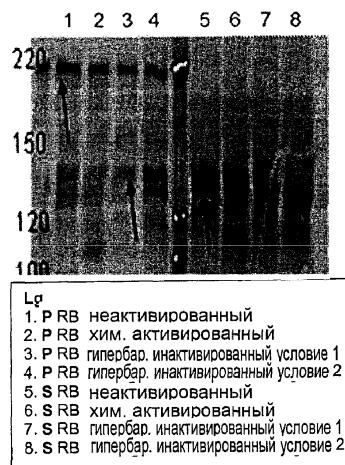
Фиг. 10



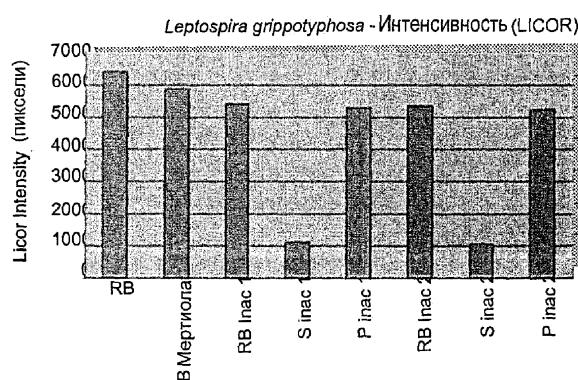
Фиг. 11



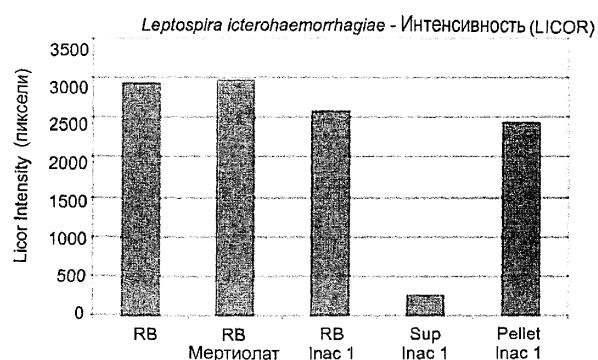
Фиг. 12



Фиг. 13

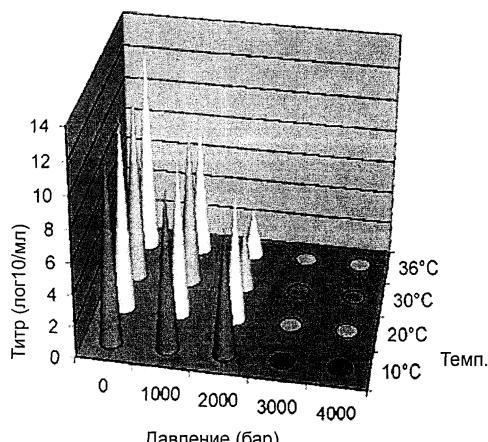


Фиг. 14А



Фиг. 14В

Титр ( $\log_{10}/\text{мл}$ ) после 60 мин обработки  
при различных температурах и давлениях



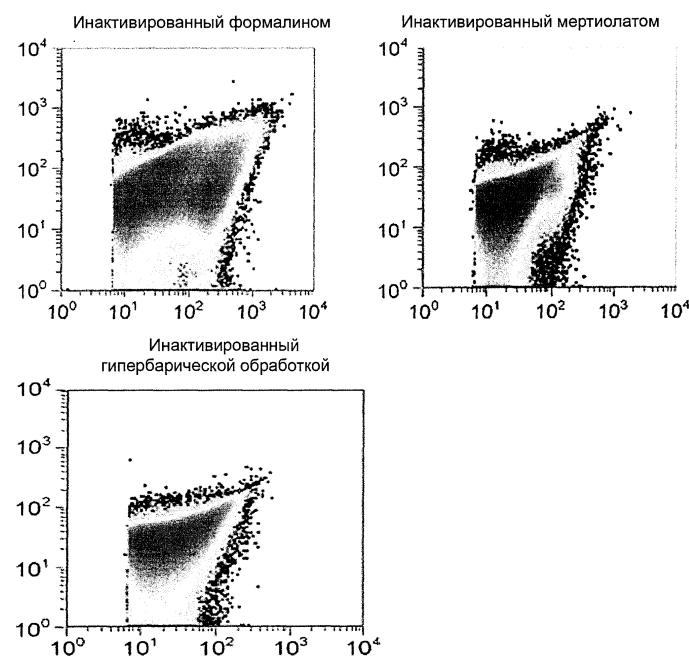
Фиг. 15

Подвергание бактерий конкретным условиям предотвращения  
"феномена восстановления"

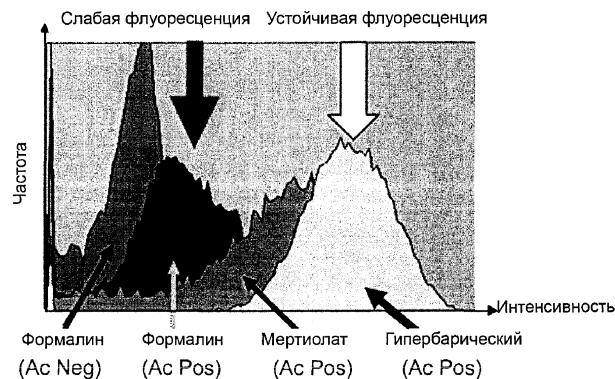
Условия инкубации	Условия инкубации	Инактивация после 11 дня инкубации
60 мин. 3500 бар 37°C	+5°C	+
	Среда	+
	37°C	+
30 мин. 4000 бар 37°C	+5°C	-
	Среда	+
	37°C	-
90 мин. 4000 бар 37°C	+5°C	-
	Среда	-
	37°C	-

Условия инкубации	Продолжительность стабильности инактивации	Условия инкубации	Инактивация контроль
90 мин. 4000 бар 37°C 20X	D0	37°C	-
	Нет восстановления (D5, D10, D17, D21)	+5°C	-
		Среда	-
		37°C	-

Фиг. 16

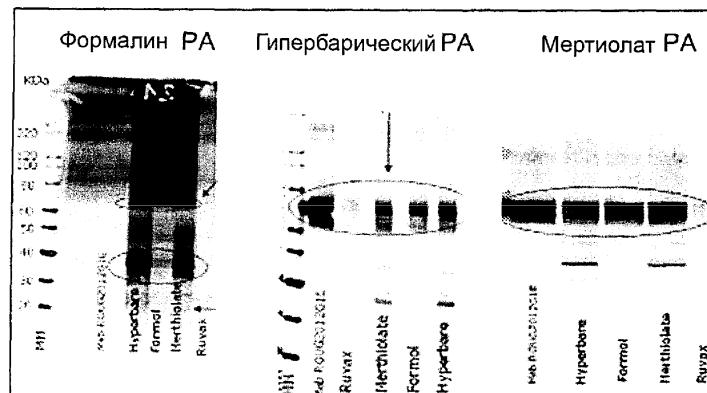


Фиг. 17



	% маркирования	Средняя интенсивность
Формалин	56	2
Мертиолат	79	7
Гиперб- арический	95	24

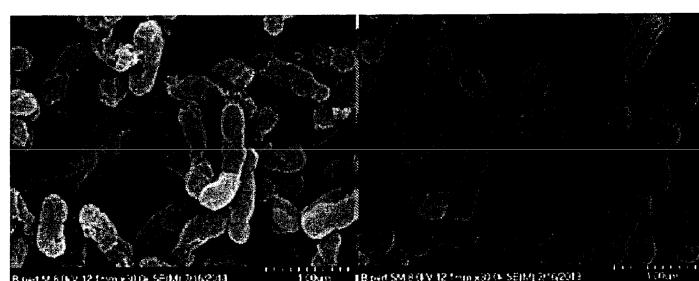
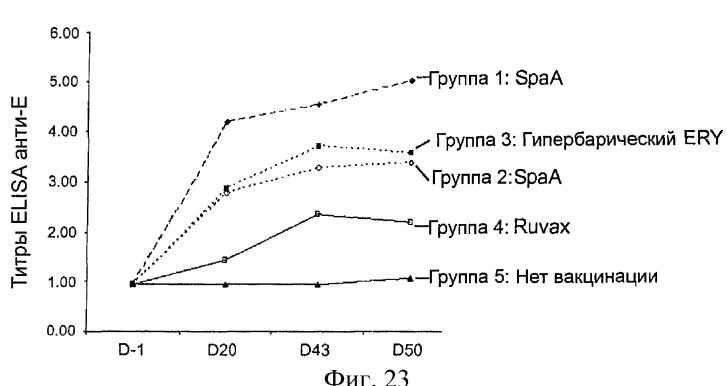
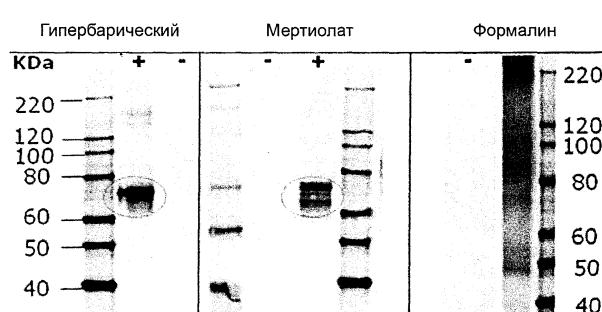
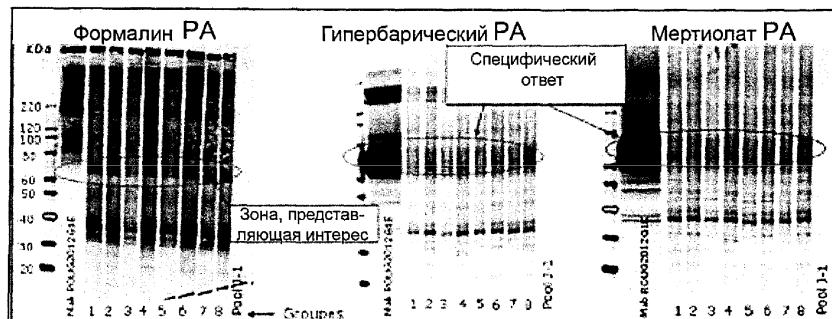
Фиг. 18

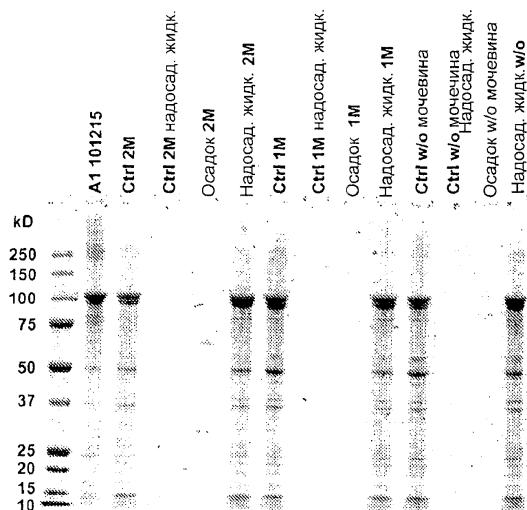


Фиг. 19

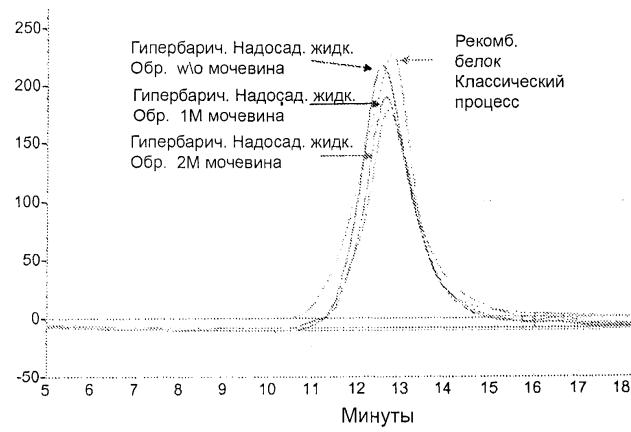
Группа	Но. мыши	Вакцина	Разведение	Степень защиты	ELISA титр
1	20	Инактивированный гипербарической обработкой	1/25	100%	3.35
2	20		1/50	90%	3.30
3	20		1/100	50%	3.09
4	20	Инактивированный формалином	1/25	90%	3.42
5	20		1/50	90%	3.19
6	20		1/100	20%	2.76
7	20	Инактивированный мертиолатом	1/25	90%	3.49
8	20		1/50	90%	3.10
9	20		1/100	60%	2.81
10	10		-	0%	-

Фиг. 20

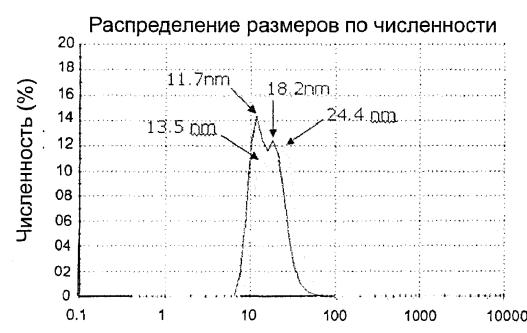
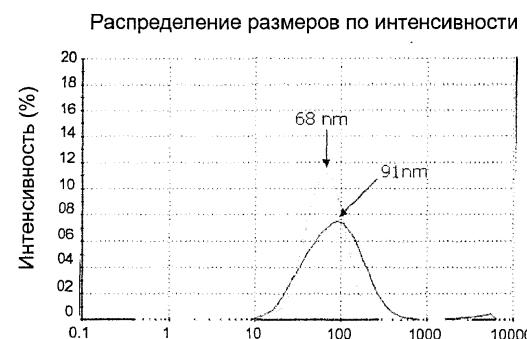




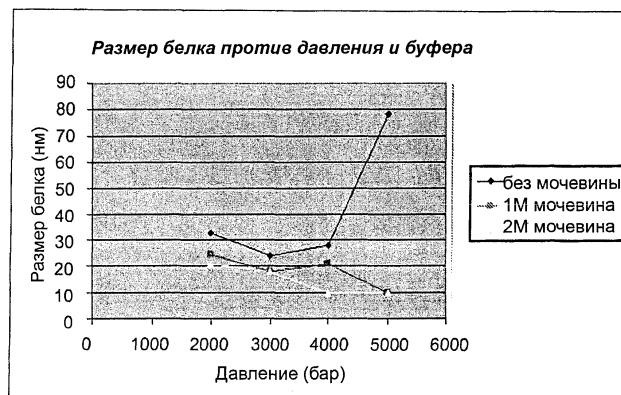
Фиг. 25



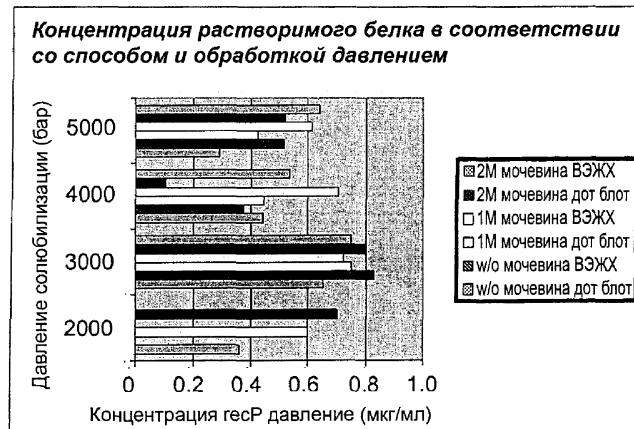
Фиг. 26



Фиг. 27

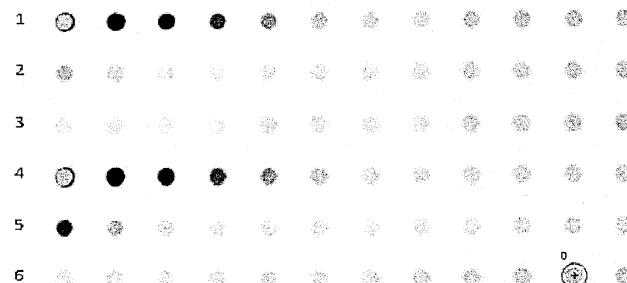


Фиг. 28



Фиг. 29

## QDot blot-анализ белка KSAC способом А



1: эталонный KSAC

2: способ А без ДТГ (образец 1)

3: контроль без ДТГ (образец 3)

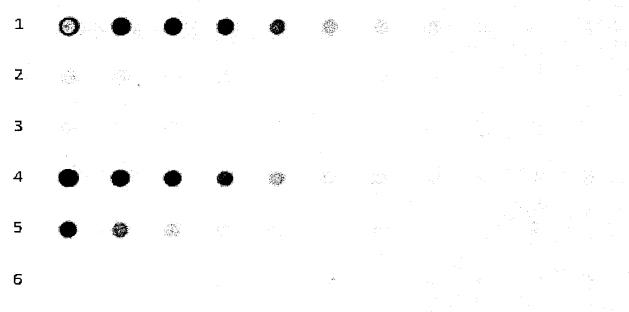
4: способ А с ДТГ (образец 2)

5: контроль с ДТГ (образец 4)

6: 20 ММ Трис-буфер

Фиг. 30А

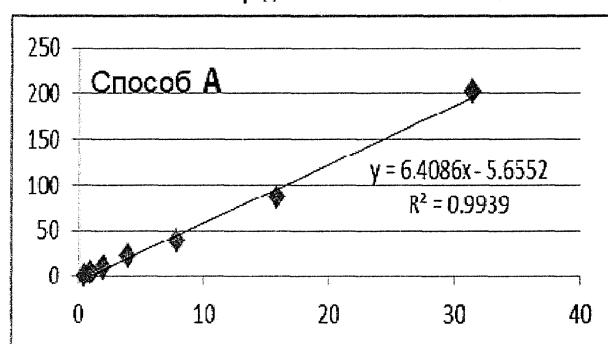
## QDot blot-анализ белка KSAC способом В



1: эталонный KSAC                  4: способ А с ДТТ (образец 6)  
 2: способ А без ДТТ (образец 5) 5: контроль с ДТТ (образец 8)  
 3: контроль без ДТТ (образец 7) 6: 20 мМ Трис-буфер

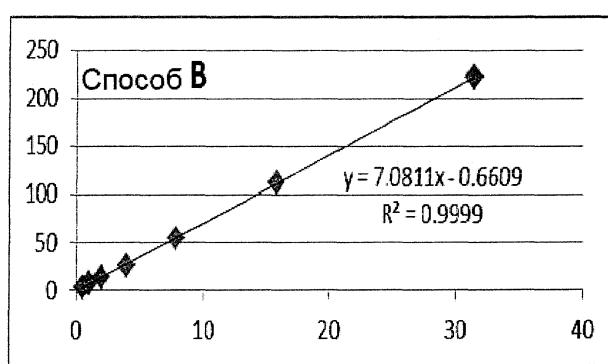
Фиг. 30В

## Количественное определение белка KSAC из QDot-блота

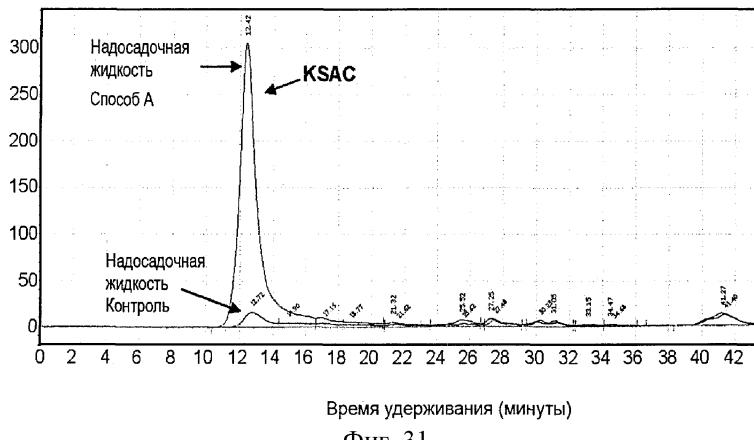


Фиг. 30С

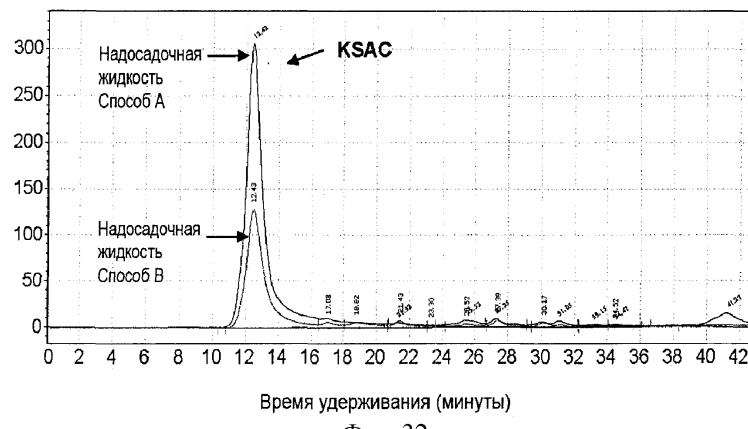
## Количественное определение белка KSAC из QDot-блота



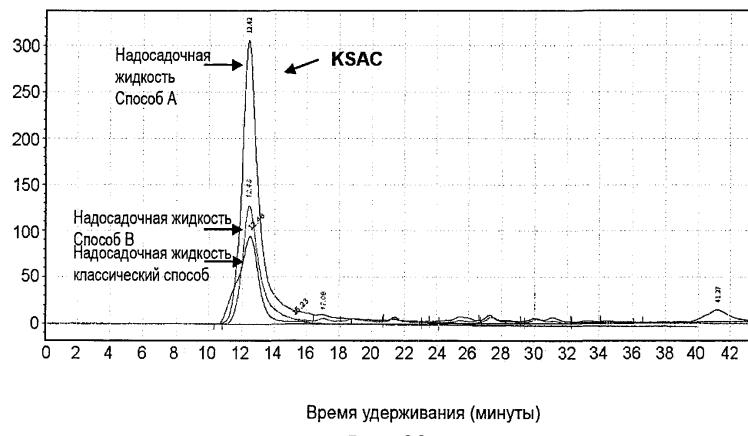
Фиг. 30Д



Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33



Евразийская патентная организация, ЕАПО

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