



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104768577 B

(45)授权公告日 2020.06.09

(21)申请号 201380054922.4

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(22)申请日 2013.08.30

利商标事务所 11038

(65)同一申请的已公布的文献号

代理人 殷骏

申请公布号 CN 104768577 A

(51)Int.Cl.

A61K 39/008(2006.01)

(43)申请公布日 2015.07.08

C07K 1/113(2006.01)

(30)优先权数据

C12N 15/62(2006.01)

61/694,968 2012.08.30 US

A23L 3/015(2006.01)

61/830,425 2013.06.03 US

(56)对比文件

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

CN 200945252 Y,2007.09.12,

2015.04.15

CN 201781934 U,2011.04.06,

(86)PCT国际申请的申请数据

CN 201781934 U,2011.04.06,

PCT/US2013/057426 2013.08.30

M. Walid Qoronfleh等.Confronting

(87)PCT国际申请的公布数据

high-throughput protein refolding using
high pressure and solution screens.

W02014/036345 EN 2014.03.06

《Protein Expression and Purification》

(73)专利权人 梅里亚有限公司

.2007,第55卷(第2期),

地址 美国佐治亚

M. Walid Qoronfleh等.Confronting

专利权人 顶尖工业简易股份公司

high-throughput protein refolding using
high pressure and solution screens.

(72)发明人 N·P·Y·卡波莱克 G·枚里安

《Protein Expression and Purification》

R·拉巴图特 L·格伦特斯

.2007,第55卷(第2期),

审查员 张彬

权利要求书2页 说明书28页 附图25页

(54)发明名称

特异性免疫反应。

高压设备和用于制备灭活疫苗和用于重折叠/增溶重组蛋白的方法

(57)摘要

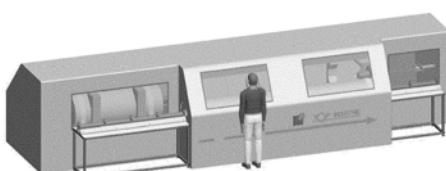


图1A

B
CN 104768577 B

本发明涉及用于在保留它们的免疫原性的同时灭活微生物和病毒、和用于由原核生物或真核生物产生的包涵体制造和制备可溶性、解聚的、重折叠的或活性的免疫原性或治疗性蛋白的高压设备。本发明包括用于灭活致病生物的高压方法,和使用灭活病原体制备疫苗组合物的方法。高压灭活的微生物比化学灭活的微生物更安全和免疫原性更强。类似地,与重力聚集的蛋白相比增溶的蛋白具有优良的性质,包括降低的非



图1B

1. 一种用于生产疫苗组合物的方法,其中包括以下步骤:
(a) 使微生物的样品小袋经受高压持续所定义的时间;
(b) 确定微生物被100%灭活;和
(c) 测定所述被100%灭活的微生物仍旧保留了它们用于所述疫苗组合物中的免疫潜能;

其中所述方法是用包含下述的高压设备实施的:
(i) 壳体;
(ii) 至少一个计算机处理器和为此可编程的用户界面;
(iii) 提供高于环境压力的装置,所述压力装置包括含活塞的等静压机;
(iv) 控制传递压力的流体的温度和压力的装置,其中所述控制温度的装置包含局部循环水供给以精确控制设备壳体的温度;
(v) 用于为常规清洗目的或在样品小袋破裂情形下对设备进行净化的装置;和
(vi) 用于接纳入该设备、在该设备内输送、和从该设备中排出的装置,适合接收至少一个样品小袋的盘子或容器,其中样品小袋包含所述微生物;
(vii) 监测微生物灭活状态的装置;
(viii) 增压器设备;
(ix) 主流体室;和
(x) 高压流体室;

其中所述高压设备被构造成通过经由增压器室初步将压力传递到所述主流体室而将控制量的压力传递到样品小袋,所述主流体室接收来自增压器设备的高压流体;并且其中主流体室中的压力通过活塞被传递到高压流体室。

2. 权利要求1的方法,其中所述监测灭活的装置包括针或其它适宜的探针,其能够无菌地穿透小袋以取出微生物样品用于随后的生存力测试。

3. 权利要求1或2的方法,其中所述微生物经受逐步升高的压力。

4. 权利要求3的方法,其中所述压力以200巴/分钟到1000巴/分钟的速率从第一压力升高到第二压力。

5. 权利要求3的方法,其中所述压力被维持在第二压力选定的时间间隔。

6. 权利要求3的方法,其中所述压力以83巴/分钟到200巴/分钟的速率降低。

7. 权利要求1—6中任一项的方法,其中最高的升高压力是1000巴到5000巴。

8. 权利要求1—6中任一项的方法,其中所述设备包含:

(a) 主流体室(8);
(b) 增压器室(9);
(c) 高压流体室(3),其构造成通过入口(2)接收流体;
(d) 压力活塞(5),其能在伸长位和缩回位之间移动;
(e) 密封件(6)和塞子(7),其构造成防止活塞(5)从缩回位向伸长位移动时流体从高压流体室(3)逸出;
(f) 增压器装置;和
(g) 用于在活塞已经伸长到足够远以将高压室从主流体室密封后阻止活塞(5)缩回的装置;

其中通过活塞(5),压力从所述增压器设备传递到增压器室(9),且从增压器室(9)传递到主流体室(8);

其中主流体室(8)中的压力通过活塞(5)从其缩回位向伸长位的移动传递到高压流体室(3);且

其中增压和降压循环结束之后,流体通过出口(4)排出。

9.一种制备全细胞百日咳博德特菌(*Bordetella pertussis*)疫苗的方法,包括步骤:

(a)在培养基中制备百日咳博德特菌的细胞悬浮液,

(b)将在所述培养基中制备的细胞悬浮液浓缩,任选地补充盐水或缓冲溶液,其不超过终体积的25% (V/V),

(c)将所浓缩的细胞悬浮液在从50°C至54°C的温度下加热,和

(d)通过高压处理灭活所述经热处理和浓缩的细胞悬浮液,其中最大压力高于2000巴但低于6000巴;

其中所述灭活方法是按照权利要求1-8中任一项所述实施的。

10.权利要求9的方法,其中在从50°C至54°C的温度下加热持续30分钟,且其中压力在3000巴至5000巴之间。

11.权利要求9或10的方法,其中还包括在药学可接受的赋形剂内稀释所得到的灭活的百日咳博德特菌浓缩细胞悬浮液。

12.权利要求9的方法,其中所述盐水是0.9%NaCl。

高压设备和用于制备灭活疫苗和用于重折叠/增溶重组蛋白的方法

[0001] 参考引入

[0002] 本申请要求以2012年8月30日提交的美国临时申请61/694,968和2013年6月3日提交的美国临时申请61/830,425为优先权，两者都在此全文引入作为参考。本申请中引用或参考的所有文献，与任何厂家的指导、说明、产品规格说明书、对本申请中或引入本申请中作为参考的任何文献中提及的任何产品的说明书一起，在此引入本文作为参考，并可在本发明的实施中应用。

发明领域

[0003] 本发明涉及高压设备和使用该高压设备以灭活用于致免疫/疫苗组合物的微生物和/或病毒、和重折叠和/或增溶在治疗性和致免疫/疫苗组合物中使用的重组蛋白的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 食物科学家长时间使用高压条件以减少食物的微生物负载。疫苗生物学家还对灭活用于疫苗制剂中的微生物非常感兴趣。然而，为了制备安全的、有效的疫苗，技术人员必须1)完全灭活病原微生物；和2)保留生物体的致免疫潜力(免疫原性)。在本发明作出之前，技术人员知道压力、温度、和时间的一定组合可用于减少活微生物的数量，然而，他或她没有普遍适用的方法生产“疫苗适合的”灭活微生物。对于食物中的生物学负载的高压降低，参见例如Isbarn, 2007(流感)；Ritz, 2000(沙门氏菌)；和Wilkinson, 2001(脊髓灰质炎病毒)。直到最近，微生物致免疫潜力的任何保留仅仅是减少微生物负载的目标的附带效应。

[0006] 关于高压灭活用于疫苗制备的应用，一个小组通过使微生物经受两千巴六十分钟实现了问号钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*)血清型hardjo的良好灭活(Silva, 2001)。灭活的钩端螺旋体能在兔中激发免疫应答，尽管它们能在目标动物如牛中激发保护性免疫应答没有得到证实。迄今为止，申请人知道没有公开的结果证实采用压力-灭活的细菌或原生动物寄生虫的完全保护性免疫。至于综述，请参见Shearer等, 2009。除尚未采用高压灭活方法提供有效的疫苗之外，该领域还必须生产必要的高压设备。现在开发的用于仅仅减少微生物负载的高静压(HHP)设备缺少完全灭活病原体的能力和使得它们用作疫苗组分。

[0007] 而且，当前的高压方法引入不能接受的、不均匀的温度分布，这导致用于蛋白质折叠/增溶和病原体灭活应用的产量降低。可利用的设备通过采用外部泵注射额外的液体到固定尺寸的容器中来影响压力升高。实质上，在容器外部的泵使水加压，且当将更多水注射入容器中，压力升高，且阀门的配置维持室内期望的压力。温度分布问题源自泵，因为当人升高泵内的压力时，水变得很热。注射高压时，热水产生高度的温度非均匀性。这些设备因此对于减少食物中的病原体负载可能是完全足够的，其中不需要温度和压力的精确调节，但这些设备不能在保持它们的致免疫潜力的同时有效地应用于重折叠/增溶蛋白或灭活病原体。在此方面工作的公司包括Barofold(例如参见US6489450、US7064192、US7538198、US7767795、US7829681、US8329878、和US20080161242A1)和制造用于食品加工业的设备的

Avure。

[0008] 由于先有技术设备不允许对温度和压力的最佳控制,因此需要设计成提供对这些变量精确控制的高压设备,以促进免疫原性保留的病原体灭活和蛋白重折叠/增溶/增溶。

[0009] 申请人因此开发了特定的高压方法和设备以生产疫苗就绪的灭活微生物和重折叠/增溶商业相关的治疗性和免疫原性蛋白。

[0010] 本申请中任何文献的引用或标识不是承认所述文献可作为先有技术为本发明获得。

发明概要

[0011] 本申请的公开涉及高压设备及其使用方法用于1) 在保持微生物的免疫原性的同时灭活微生物,和2) 重折叠/增溶重组蛋白。因此,本申请的公开的第一目的是提供用于灭活微生物和重折叠/增溶蛋白的高压设备。本申请的公开的另一目的是提供使用高压设备灭活微生物和重折叠/溶解蛋白的方法。本申请的公开的第三目的是提供包含高压灭活的微生物的致免疫组合物;本申请的公开的第四目的是提供使用高压设备制备的免疫原性和/或治疗性蛋白。

[0012] 理想地本申请公开的高压灭活的微生物在保留它们的致免疫潜力的同时被完全灭活,是安全的,且能在目标动物中诱发对抗强毒激发的保护性免疫应答。类似地,高压-制备的免疫原性和/或治疗性蛋白当给予人和非人动物时是安全和有效的。

[0013] 在本申请的公开中特别是在权利要求书中要注意的是,术语如“包含”及类似词可具有它们在美国专利法中的含义;例如,它们可指“包括”及类似词;术语如“基本上由…组成”具有它们在美国专利法中的含义,例如它们考虑到没有明确列举的要素,但不包括在先有技术中发现的或影响本发明基本特征的或新颖特征的要素。

[0014] 这些实施方案和其它实施方案被公开或根据以下的详细说明是显而易见的和被以下的详细说明包括。

[0015] 附图简述

[0016] 以下通过举例说明给出的详细说明,不是意图将本发明限定至所描述的具体实施方案,可结合作为参考引入本文的附图来理解,其中:

[0017] 附图1A描述根据本发明的高压设备;

[0018] 附图1B描述代表性样品小袋容器;

[0019] 附图2A描述用于将压力传送至样品的高压压力装置(1)。流体通过入口(2)进入高压流体室(3)同时压力柱塞/活塞(5)缩回。柱塞(5)然后延伸到所描述的位置中,且密封件(6)和塞子(7)防止流体从高压流体室(3)漏出。增压和降压周期完成后,流体通过出口(4)排出。压力通过增压器室(9)传递到主流体室(8),其接收来自增压器设备的高压空气/流体。主流体室(8)中的压力通过柱塞(5)传递到高压流体室(3);

[0020] 附图2B为根据本申请的压力机(1)的三维透视图;

[0021] 附图3为压力装置(1)的扩大版,聚焦于主流体室(8)。各个部件被标明并在下文的详细说明部分中有进一步的描述;

[0022] 附图4压力装置(1)的扩大版,聚焦于柱塞(5)。各个部件被标明并在下文中进一步描述;

[0023] 附图5为压力装置(1)的扩大版,聚焦于塞子(7)。各个部件被标明并在下文中进一步描述;

[0024] 附图6为根据本申请公开的高压设备的图示,在含有待灭活的病原体或来自细菌包涵体的待重折叠和/或增溶的肽的样品上实施增压/降压周期。1)室中的产物,准备装载的;2)装料筒的延伸;3)样品从存储(holding)室移去;4)装载筒的缩回;5)将样品定位进入壳体(enclosure)内;6)筒前进产生密封,使得压力放大器充填;7)左筒前进用于填料;8)左筒进一步前进将室密封;9)实施阻塞,防止左筒缩回;10)右筒向左进一步延伸以增加压力;11)压力释放;12)阻塞缩回;13)左筒缩回用于排水;14)对压力放大器开始定位;15)延伸主体以卸载样品;16)延伸加料筒。

[0025] 附图7为描绘高压设备安全操作的流程图;

[0026] 附图8为描绘在高压设备室内微生物小袋故障/破裂的情况下所采取行动的流程图;

[0027] 附图9为钩端螺旋体保护性抗原的图示;

[0028] 附图10描绘之前经受化学、高压、或者没有经受灭活的螺旋体悬浮液的蛋白质印迹的结果。菌株:犬钩端螺旋体(*L.canicola*)、黄疸出血型钩端螺旋体(*L.ictero.*)抗原:LipL32、LipL41和LipL46;

[0029] 附图11描绘之前经受化学、高压、或者没有灭活的钩端螺旋体悬浮液的蛋白质印迹的结果。菌株:犬钩端螺旋体、黄疸出血型钩端螺旋体抗原:LigA和LigB;

[0030] 附图12描绘之前经受化学、高压、或者没有灭活的钩端螺旋体悬浮液的蛋白质印迹的结果。菌株:感冒伤寒型钩端螺旋体抗原:LipL32,LipL41和LipL46;

[0031] 附图13描绘之前经受化学、高压、或者没有灭活的感冒伤寒型钩端螺旋体的蛋白质印迹的结果。抗原:LigA和LigB;

[0032] 附图14A&14B描绘蛋白质印迹数据的量化。如前所述,使感冒伤寒型钩端螺旋体(A)和黄疸出血型钩端螺旋体(B)之前经受化学、高压、或者没有灭活。抗原:脂多糖类(LPS)。采用象素量化印迹(技术LICOR);

[0033] 附图15为显示采用不同的温度和压力组合对细菌高压灭活的图。尽管最初有效地灭活,但各种条件下细菌能恢复生存力;

[0034] 附图16显示导致不能恢复生存力的高压灭活的细菌的温度和压力的实验条件;

[0035] 附图17通过福尔马林(两个离散的细菌的群)、硫柳汞(轻微的不均一性)、或高压条件(完全的均一性)灭活的细胞的FACS;

[0036] 附图18 p65荧光标记的福尔马林、硫柳汞、高压处理的丹毒杆菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)。几乎100%的高压-灭活的细胞被标记;

[0037] 附图19蛋白质印迹显示来自用福尔马林、高压、或硫柳汞灭活的成分活性物(PA)接种疫苗的小鼠的血清的体液识别。如所述,福尔马林-灭活的PA没有激发单克隆抗体的特异性反应,而高压-和硫柳汞-灭活的PA激发特异性反应;

[0038] 附图20标明用灭活的丹毒杆菌(*E.rhusiopathiae*)的稀释液接种疫苗的小鼠的存活百分率和血清学,其中丹毒杆菌用福尔马林、硫柳汞、或高压条件灭活;

[0039] 附图21来自用福尔马林-、高压-、或硫柳汞-灭活的PA丹毒杆菌接种疫苗的猪的血清的体液识别。如所述,显示60和75KDa的扩散带,与小鼠研究类似;

[0040] 附图22来自用重组SpaA蛋白接种疫苗的猪的血清的体液识别。如所述,对于接种(+)在65-75kDa周围有多条带,但对于阴性对照(-)没有带。结果表明高压-和硫柳汞-灭活的(但福尔马林-灭活的不)SpaA接种均使得猪产生针对P65的抗体特异性;

[0041] 附图23为图显示在以不同的疫苗制剂接种之后抗丹毒杆菌的抗体滴度;

[0042] 附图24为经受4000巴90分钟(右边)的热和高压灭活的百日咳博德特菌(*Bordetella pertussis*)的浓缩液和硫柳汞-灭活的百日咳博德特菌的浓缩液(左边)的扫描电子显微图片(X30000放大倍数)

[0043] 附图25描绘用3000巴处理的KSAC(得自利什曼原虫属(*Leishmania*)种的融合肽)样品的SDS-PAGE;

[0044] 附图26描绘3000巴处理的KSAC上清液的HPLC色谱图,该HPLC色谱图与采用传统的重折叠/增溶方法获得的KSAC蛋白的HPLC色谱图叠置;

[0045] 附图27显示以强度(上部)和数量(底部)表示的DLS粒径分布。3000巴加压的蛋白(较浅色线)和传统地重折叠的蛋白(较深色线);

[0046] 附图28显示压力和缓冲剂对蛋白尺寸的影响;

[0047] 附图29显示通过HPLC&Qdot-印迹测定的KSAC可溶性蛋白质含量的比较;

[0048] 附图30A-30D描绘高压处理之后KSAC样品的Q-Dot Blott分析;

[0049] 附图31描绘方法A处理之后KSAC样品的HPLC分析;

[0050] 附图32描绘方法B处理之后KSAC样品的HPLC分析。

[0051] 附图33描绘方法A、方法B和传统方法处理之后KSAC样品的HPLC分析。

[0052] 发明详述

[0053] 本申请的公开涉及用于1)在保持微生物的免疫原性的同时灭活微生物,和2)重折叠/增溶重组蛋白的高压设备。因此,本申请的公开的第一目的是提供用于在保留它们的免疫原性的同时灭活“微生物”(其,如本文中所使用的,定义为细菌、原生动物、任意其它单细胞真核生物、任意其它无核原生物(*monerans*)和病毒)的高压设备。根据本申请的公开的设备可具有精确控制温度的装置和精确控制压力的装置。

[0054] 在实施方案中,该设备具有用于接收袋或其它适宜的容器(其填充待灭活的微生物)的装置。该设备可在其中引入各种用于取样和评价微生物灭活状态的装置。该设备的所有功能可通过适宜的用户界面和计算机处理单元控制。除灭活微生物之外,该高压设备可有效地用于重折叠/增溶不正确折叠的和/或包涵体捕捉的重组蛋白。所公开的设备提供与先有技术相比的明显优点,部分是因为它允许蛋白重折叠和增溶同时完成。

[0055] 本公开进一步涉及计算机模型和将高压设备内的温度分布模型化的方法。保持均匀的或均匀的温度分布对需要应用诸如免疫原性保留的病原体灭活和蛋白重折叠/增溶是必要的。在当前高压设备的操作过程中进行精确的温度测量,且这些数据点用于产生温度分布模型,其对由在各种温度和压力条件下当前机器操作进行的实际测量是有效的。简而言之,该模型准确地预测当前容器内的温度分布,因此该模型应用于设计能将温度分布不均一性最小化的高压设备。因此在实施方案中,所公开的设备没有不能接受的温度变化。

[0056] 温度分布模型指导维度参数包括管长、厚度等的,目的是将高压室内的温度变化最小化。与先有技术固定尺寸的离压室不同,本申请的公开提供一种高压活塞压力设备,其中高压室尺寸由于杆或活塞压力的延伸和缩回不是恒定的。室尺寸因此随升高压力而减

小，并随降低压力而增大。

[0057] 在实施方案中，根据本申请公开的设备含有将压力传递至流体包括水、传递至高压室的活塞和密封件配置。升高的压力克服分子间的（例如H₂O与H₂O之间）排斥力，且在6000巴下，水体积相对于环境压力条件减小约百分之十。本公开的设备对灭活病原体特别有用，因为高可控制的温度和压力可用于稳定以它们的天然态形式存在的蛋白（即对保留免疫原性有益），同时破坏/阻断酶活性，时间长至足以使病原体不具有感染性。在具体的实施方案中，微生物或病原体永不从初始的高压-介导的分子损坏中恢复。

[0058] 同样地，压力和温度的精确协调可用于促进蛋白重折叠/增溶。蛋白具有特定的分子体积，其通过其三维结构来测定，其为其固有的氨基酸含量、其二级结构、和许多作用力互相作用包括范德华力和静电相互作用、疏水性相互作用、氢键合、二硫键、温度、压力等的函数。当蛋白错误折叠时，其比体积(specific volume)典型地比当相同的蛋白正确折叠时大。在实施方案中，精确地施加压力以促进蛋白质折叠，导致蛋白的比体积降低。

[0059] 本申请中所使用的，“正确折叠的”指蛋白质处于它的天然构型，其为与当它胜任发挥它的主要结构和/或功能作用时的蛋白质最相关的或对其最有贡献的构型。例如，细胞膜受体当它能与它的同源配体相互作用参与细胞信号传导活性时处于其天然构型。类似地，酶当它能与它的同源底物相互作用和催化相关的反应时处于它的天然构型。

[0060] 在实施方案中，受控制的蛋白重折叠/增溶通过首先施加压力以限制展开的蛋白的移动自由（例如分子振动和旋转）来实现。然而，降低压力太迅速可能限制移动太大以致蛋白不能呈其天然（正确折叠的）构型。因此，根据本申请公开的设备必须小心地控制压力，且压力变化的速率（和经此施加于生物样品），允许1)理想的/最佳的重折叠/增溶条件的初始确定；和2)实施将来等同样品的所述条件。

[0061] 在另一实施方案中，温度可升高以增强运动和能量（例如布朗运动，分子内振动，或原子间运动），减少它用于错误折叠蛋白花费的时间以呈现其天然构型。

[0062] 在优选的实施方案中，确定各种类型生物样品的温度和压力条件的精确组合以将产生最大百分比的正确折叠的蛋白需要的时间量减至最小。

[0063] 在另一实施方案中，该设备相比先前的高压设备是有利的，因为它提供受控制的压力降低、并保持在恒压下。与经受迅速和不受控制的压力降低的蛋白（即不受控制的减压赋予蛋白过多的能量，让它们运动或跳跃到能量稳定的、还是非天然的构型）相比较，经受这些可控压力条件的蛋白更有可能有效地重折叠成其天然构型。

[0064] 在几个实施方案中，所公开的高压设备包含活塞和筒配置，它们通过让压力降低至精确协调的和受控制的条件来降低或消除不希望的不正确的重折叠/增溶。

[0065] 在实施方案中，该设备是有利的，因为它可方便地和迅速地去污。在一具体的实施方案中，该设备完全符合GMP规定，可从两边打开，并可通过任何合理的方法包括但不限于蒸汽清洁法来清洁。

[0066] 本申请的公开因此提供活塞压力高压设备，它们允许精确地控制和管理压力和温度以确定（然后提供）获得最大蛋白重折叠/增溶的最佳压力和温度平衡并因此获得最大产率。

[0067] 这些相同的性质允许设备还能最佳化和施加压力和温度的有效组合以灭活微生物/病原体，同时保留它们的致免疫潜力。在一些实施方案中，高压设备改善其失活的微生物

物的致免疫潜力。

[0068] 在实施方案中,本申请公开提供用于罩住高压设备的壳体(参见附图1A)。对壳体进行设计考虑到高压的限制条件和清洗/去污的方便。该壳体可以适应任何商业上有用的容积和压力条件,包括但不仅仅为,最高4,000巴,最高5,000巴,最高6,000巴,最高7,000巴,最高8,000巴,最高9,000巴,或最高约10,000巴。有用的操作容积包括例如50升或更多。

[0069] 在实施方案中罩在壳体内的灭活设备可包含两个封装在金属框架内的筒。该设备根据本申请的公开采取任意有用的外形,并可采取附图2A、2B、3和4中描绘的一般形式。

[0070] 在实施方案中,如附图2A中描绘的实施方案,高压设备包含用于将压力传递至样品的压力组件(1)。流体通过入口(4)进入高压流体室(3),同时增压器柱塞(5)缩回。然后柱塞(5)延伸到所描述的位置中,且杆高压密封装置(6)和高压塞子(7)防止流体从高压流体室(3)漏出。增压和降压周期完成后,流体通过出口(2)排出。压力通过增压器(9)的上室传递到主流体室(8)。主流体室(8)中的压力通过柱塞(5)传递到高压流体室(3)。

[0071] 在实施方案中,压力装置可包括如附图3-5的扩大视图中所示的组件。该装置可包括:固定板的密封件(20);固定主杆的螺丝钉(22a&b);上室储存器拆卸器件(24a&b);上室拆卸器件(25a);上室密封件(25b);主流体输入端(26);下室储存器(27a);下室储存器拆卸器件;和下室拆卸器件(29a)。

[0072] 在实施方案中,可装载吸收活塞室和倍增器推力的金属框架使得尽管有压迫产生的作用力但这两个元件仍保持固定。

[0073] 在一具体的实施方案中,紧凑设计将万一发生破坏时污染的蔓延最小化,特别是当与要求一组独立的和外源的压力的更开放的设计比较时。另外,紧凑设计避免需要一系列高压管,其需要频繁的更换许多阀门,这是在易污染区域是不期望的。

[0074] 在实施方案中,增压器和活塞可与壳体分开以允许容易进入壳体的内部和万一污染时容易更换活塞密封件。压力放大器可优选适应较长的运行时间,例如最高约10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、或约20小时、或更长时间。

[0075] 在实施方案中,整体装置为约7.4米,高度为约1.6米,宽度为约2.2米。在实施方案中,装置重约12,700kg。任何其它合理的和商业上合理的装置尺度可通过本申请的公开进行预期,因此技术人员可不使出超过常规的工作就能改变尺度。

[0076] 在实施方案中,壳体被完全覆盖以限制尘土沉积。该装置可进行灭菌,例如通过将过氧化氢雾注射到壳体中。盖子可拆卸以确保彻底清洗,工作部件将允许进入该设备的内部,特别是使得能够更换密封件。

[0077] 在实施方案中,壳体由易去污的材料特别是不锈钢制造。作为4000巴的高压实例,钢理想地具有高机械强度/完整性。在实施方案中,材料可以是INCONEL 718。

[0078] 在实施方案中,室的内径可为150mm,而外径可为440mm。在该实施方案中,50升的内容积因此产生约2.8米的自由内长。在大约4000巴下,水的可压性为约13%。样品内的气泡(Air pockets)可加入到整体可压性计算中。在实施方案中,在大气压下的自由长度已采用20%压缩、或约3.4米进行计算。这得到约3.9米的总室长、和约4900kg的质量。

[0079] 在实施方案中,该装置可通过排空室内含有的水、然后再密封尾端件(end pieces)防止潜在污染水的释放。入口和出口通过垂直于壳体轴的孔来提供。在一具体的实

施方案中,壳体为单个部件。

[0080] 在另一实施方案中,活塞/筒的密封装置在一侧通过压力活塞密封件(6)提供,在另一侧通过塞子(7)提供。两种密封装置可以是具有高机械强度的不锈钢。密封装置还可涂覆任意适宜的材料,或由任意适宜的材料构成。

[0081] 在实施方案中,设备横向移动使得能够装卸含有微生物、待重折叠的蛋白等的样品袋。样品袋可装入容器中,其依次被送进设备中,如同小火车。室可位于在铁轨上运行的轮子上,其中整个过程由活塞驱动。

[0082] 在实施方案中,设备(apparatus)包含增压器(pressure booster),其可由不锈钢制造。然而,由于增压器没有经受与活塞/筒配置同样的严密(rigors),增压器可由设计的钢1.4418制造。在实施方案中,增压器具有筒的形式,其中筒的外径为620mm,长度为1750mm,重2200kg。内部是活塞。主部件的内径为540mm。它含有最高160升的油。该体积由液压单元310巴提供,其中流速为250升/小时,且被安装在该室(room)外部。主回路内的压力为310巴。

[0083] 活塞行程可为约940mm。在缩回的位置时,它可从壳体全部释放。然而,密封在罩内的密封件是容易接近的以允许容易更换或清洗,如同闸门(shutter)的密封件,当壳体在部分装载/卸载中进料时。

[0084] 活塞柱塞(5)的中心部分可以是空心且可含有磁体以允许连续和准确的移动和测量活塞的位置。万一密封件泄漏,可通过适当地推进活塞来维持压力以弥补泄漏和确保灭活。密封件在下一次打开室的过程中可更换。

[0085] 在实施方案中,促动器(actuator)允许倍增器横向移动以促进清洗。

[0086] 在另一实施方案中,可提供验证系统激光以确保室和倍增器筒的同心性。

[0087] 在另一实施方案中,对金属框架进行设计以保持室和倍增器在适当位置,当后者在壳体内施加4000巴的压力时。该框架可由几个结构钢穿孔的板构成。焊接精加工(Weld finishing)可用于阻止液体或烟雾在板间穿透。该装置可涂覆保护漆或其它适宜的保护涂层。

[0088] 在实施方案中,在框架的外部长度为约6.8米,其高度为约1.3米,且其重量为约5600kg。

[0089] 在另一实施方案中,管传递来自液压单元的液压能。该管可固定和可移去,为维修(maintenance)移动倍增器。

[0090] 在实施方案中,通过管或适宜的导管为壳体提供脱矿质水。该管可以是柔性的和/或可伸长,所以在将壳体平移(translation)至装载/卸载位置的过程中不必将其移去。还可以存在第二管或导管,以允许注射压缩空气用于在打开之前对室进行干燥。在壳体附近的排出管的一部分也可以柔性的以适应壳体的运动工作范围。.

[0091] 壳体的排空为建筑物的水处理系统。甚至在袋的破坏中,当遇到承受杆(bearing bar)4000时,水可排出而不需进一步处理。

[0092] 然而,在没有达到承载或静置时间低点的情况下,将水排出到独立的罐中,使得能够分析以确定是否污染是可能的袋破裂和特定的处理引起的。对于用于冲洗壳体的水将是相同的。

[0093] 在第一目的实施方案中,高压设备可位于具有如附图1A中图解的总体布置的罩

内。可对高压设备进行设计以容纳和接收样品存储设备，如附图1B中所示。该设备的重要特征之一是将经受高压的欲成为样品的微生物装入弹性小袋内，而不是“直接暴露”（例如，以浓缩的微生物浆液形式）于温度变化和流体静压。相反，可将浓缩的微生物浆液密封在样品小袋内，其被设计成适合小袋储存器或容器，如附图1B中描绘的。微生物的高压灭活方法产生多个益处，包括样品处理的一致性、设备去污的方便（万一一小袋破裂）、和批料污染的机会降低减小（例如即使小袋变得污染，批料的平衡可保持清洁）。

[0094] 在第一目的的另一实施方案中，该设备包含活塞压力设备，诸如附图2A中描绘的。高压设备(1)将受控制量的压力传递至样品。压力最初通过增压器室(9)传递到主流体室(8)，其接收来自增压器设备的高压空气/流体。主流体室(8)中的压力通过柱塞(5)传递到高压流体室(3)。在柱塞(5)延伸之前，流体通过入口(2)进入高压流体室(3)同时压力柱塞(5)缩回。柱塞(5)然后延伸到附图2A中描绘的位置中，且密封件(6)和塞子(7)防止流体从高压流体室(3)漏出。增压和降压周期完成后，流体通过出口(4)排出。在实施方案中，高压设备包含如附图3、4、5和6中所示的组件。

[0095] 在一具体的实施方案中，样品可通过根据附图7中描绘的流程图的高压设备处理。本申请公开因此提供一种用于重折叠/增溶或解聚蛋白、或在保持它们的免疫原性的同时灭活病原体的方法，包括步骤：

- [0096] 1) 将样品置入加载室中；
- [0097] 2) 延伸加料筒；
- [0098] 3) 从加载室中移出样品
- [0099] 4) 缩回加料筒；
- [0100] 5) 将样品定位到高压室中；
- [0101] 6) 延伸右筒前进获得密封，使得能够用流体填充压力放大器；
- [0102] 7) 延伸左筒；
- [0103] 8) 进一步延伸左筒以密封高压室；
- [0104] 9) 定位阻塞块，其防止左筒在压力施加时缩回；
- [0105] 10) 进一步向左延伸右筒以增加压力；
- [0106] 11) 释放压力；
- [0107] 12) 缩回阻塞块；
- [0108] 13) 缩回左筒以允许流体排出；
- [0109] 14) 让压力放大器返回至其起始位置；
- [0110] 15) 延伸主体以卸载样品；
- [0111] 16) 延伸加料筒。

[0112] 在实施方案中，该设备因此包括接收小袋储存器和输送或定位它们以暴露于高静压(HHP)的装置，其中高静压通过等静压机/活塞装置的作用下产生。该设备包含使小袋经受特定的温度和压力持续特定时间的装置。该设备可具有局部循环水供给以精确控制设备壳体的温度。壳体和循环水供给的温度可如表1中所述进行变化。该设备可施加宽范围的压力，最高例如7000巴、8000巴、9000巴、或10000巴。该设备可包含任意数量的组件以获得所需压力和温度。

[0113] 表1.作为对初始壳体温度和处理水温度的变化的反应50L壳体内的极值温度和平

均温度。Pmax=3500巴;V=1000巴/分钟,Tea 1h,1个循环过程:Pmax=3500巴,V=1000巴/mn,平稳阶段1小时,1个周期。

[0114]

T-水 (°C)	T-局部 (°C)	T-分钟 (°C)	T-max (°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

[0115] 在第一目的的另一个实施方案中,该设备还包含去污装置。去污装置可提供一般清洗,其为任何用于制备药物级的生物制品、和/或可用于万一样品小袋破裂时消毒该设备所要求的。

[0116] 在另一实施方案中,该设备还包含样品灭活状态监测(SISM)装置。SISM装置可包含针或其它适宜的探测设备,其中探测设备适于在高压灭活处理的整个过程中在适宜的时间无菌地除去所定义份的样品(来自样品小袋)。因此,当已经实现完全的微生物灭活时SISM装置可在测定中帮助设备使用者。SISM装置还可包括任意数量的用于测定微生物的灭活状态的自动化生存力试验。该设备可设计成基于SISM装置产生的数据自动调节温度和时间条件。

[0117] 在其中没有采用SISM装置的实施方案中,逐个测定灭活动力学,储存,并当需要时重新使用。在灭活后QC评价过程中,可确定样品没有充分地灭活,并使其经受额外的灭活周期。可存储QC数据以调节给定类型和浓度的微生物的灭活动力学。

[0118] 该设备必须具有至少一个使用者可编程的计算机接口。计算机接口允许该设备使用者控制所有的设备功能。该界面控制至少一个数据存储装置,其记录灭活周期中产生的所有数据,包括但不限于壳体温度、水温、和样品灭活状态。该接口可以图表的形式显示信息,输出到显示装置,和/或将数据输出到使用者方便的电子表格或其它适宜的数据处理软件应用。

[0119] 本申请的公开的第二目的是提供用于在保持微生物免疫原性的同时灭活微生物的方法。在实施方案中,该方法包括步骤:使微生物经受控制温度下的高压条件持续规定的

时间。该方法还可包括步骤：在较高的压力和较低的压力之间交替变化持续规定的时间并在规定的温度下进行。实施广泛的参数模型化，这在下文的详细说明中进一步描述。通常，室温为15°C至26°C且设备水温为15°C至27°C。

[0120] 在第二目的另一个实施方案中，微生物被完全灭活且不能产生感染，但能诱发对其敏感的动物中的免疫应答。在实施方案中，免疫应答为保护性免疫应答。在另一实施方案中，该微生物比已化学灭活的相同微生物具有更强的免疫原性。在另一实施方案中，该微生物免疫原性更强，因为高压处理已对免疫原性的表位去屏蔽。

[0121] 本申请公开的第三目的是提供用于在高压灭活方法的过程中和在高压灭活方法之后测定微生物灭活状态的方法。灭活状态可通过任意数量的生存力试验来测定并可用于调节和最佳化高压灭活参数（即压力、温度、时间）。还可监测和评价表位完整性和/或利用度以确定最佳的灭活参数。

[0122] 本申请公开的第四目的是提供包含高压灭活的微生物的致免疫组合物。在实施方案中，该致免疫组合物为疫苗组合物，其在动物中在体内激发保护性免疫应答。该组合物可比采用化学灭活的微生物制备的同等组合物安全和更有效。在实施方案中，疫苗包含高压-灭活的钩端螺旋体或丹毒杆菌。

[0123] 由于所公开的高压设备可用于灭活各种各样的微生物，所以通过本申请的公开可预见包含任何这样灭活的微生物的组合物。

[0124] 本申请的公开的第五目的是提供重折叠/增溶蛋白用于各种分子生物学应用的方法，包括采用高压设备。在实施方案中，本申请的公开提供一种用于制备在原核生物或真核生物中表达的可溶性的、解聚的、重折叠的或活性的蛋白的方法，包括步骤：(i) 在不含或含低浓度脲的缓冲液中配制包涵体以形成包涵体悬浮液；和(ii) 使包涵体悬浮液经受高压一段时间。

[0125] 在另一实施方案中，本申请的公开提供一种用于制备在原核生物或真核生物中表达的可溶性的、解聚的、重折叠的或活性的蛋白的方法，包括步骤：(i) 在不含或含低浓度脲的缓冲液中配制包涵体以形成包涵体悬浮液；(ii) 使包涵体悬浮液经受压力的逐步增加一段时间；和(iii) 将施加于包涵体的高压维持一段时间。

[0126] 一方面，缓冲液可含有二硫苏糖醇(DTT)。另一方面，DTT浓度可在约1mM至约100mM、约1mM至约90mM、约1mM至约70mM、约1mM至约60mM、约1mM至约50mM的范围内，或为约1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM。一方面，脲可不存在于缓冲液中。另一方面，脲可以约1M、约2M、约3M、约4M、约5M、约6M、约7M、约8M、约9M、和约10M的浓度存在于缓冲液中。

[0127] 另一方面，高压可在约1000巴至约5000巴、约2000巴至约4000巴的范围内。高压可以是在约2000巴至约4000巴的范围内的任意压力，例如但不限于2000巴、2100巴、2200巴、2300巴、2400巴、2500巴、2600巴、2700巴、2800巴、2900巴、3000巴、3100巴、3200巴、3300巴、3400巴、3500巴、3600巴、3700巴、3800巴、3900巴、和4000巴。

[0128] 另一方面，压力的逐渐增加可连续或逐步进行。一方面，通过在达到期望的最终高压的一段时间内连续地增加压力将压力的逐渐增加施加于包涵体悬浮液。例如，压力在约2分钟-10分钟内连续地以约200巴/分钟-1000巴/分钟的速率达到2000巴、在约3分钟-15分钟内连续地以约200巴/分钟-1000巴/分钟的速率达到3000巴、在约4分钟-20分钟内连续地

以约200巴/分钟-1000巴/分钟达到4000巴、在约5分钟-25分钟内连续地以约200巴/分钟-1000巴/分钟的速率达到5000巴增加。另一方面,压力的逐渐增加逐步施加。例如,将压力以1000巴/分钟增加一分钟达到1000巴,然后保持该1000巴压力一小时以松弛蛋白,在松弛期之后,将压力以1000巴/分钟再次增加一分钟达到2000巴的最终期望的高压。

[0129] 为了达到最终期望的3000巴、4000巴、和5000巴的高压,可应用同样的以1000巴/分钟一分钟的压力的逐步增加,其中让蛋白中间松弛一小时。例如,将压力以1000巴/分钟增加一分钟达到1000巴,然后保持1000巴压力一小时以松弛蛋白,将压力以1000巴/分钟再次增加一分钟达到2000巴的压力,然后保持2000巴压力一小时第二次松弛蛋白将压力以1000巴/分钟再次增加一分钟达到3000巴的最终期望的压力。为了达到4000巴的最终期望的压力,将压力以1000巴/分钟增加一分钟达到1000巴,然后保持1000巴压力一小时以松弛蛋白,将压力以1000巴/分钟再次增加一分钟达到2000巴的压力,然后保持2000巴压力一小时第二次松弛蛋白将压力以1000巴/分钟再次增加一分钟达到3000巴的最终期望的压力,然后保持3000巴压力一小时第三次松弛蛋白,将压力以1000巴/分钟再次增加一分钟达到4000巴的最终期望的压力。

[0130] 可将包涵体悬浮液在高压下处理约10小时至约100小时、约20小时至约100小时。高压处理优选24小时以上,例如,约25小时至约100小时、约25小时至约80小时、约25小时至约60小时、约25小时至约50小时、约25小时、约26小时、约27小时、约28小时、约29小时、约30小时、约31小时、约32小时、约33小时、约34小时、约35小时、约36小时、约37小时、约38小时、约39小时、约40小时、约41小时、约42小时、约43小时、约44小时、约45小时、约46小时、约47小时、约48小时、约49小时、约50小时。

[0131] 在另一实施方案中,本发明提供一种用于制备在原核生物或真核生物中表达的可溶性的、解聚的、重折叠的或活性的蛋白的方法,包括步骤:(i)在不含或含低浓度脲的缓冲液中配制包涵体以形成包涵体悬浮液;(ii)使包涵体悬浮液经受压力的逐渐增加一段时间;(iii)将施加于包涵体的高压维持一段时间;和(iv)通过降压使蛋白恢复。

[0132] 蛋白可选自膜蛋白质、表面抗原、或任意抗原性兴趣的蛋白,包括但不限于钩端螺旋体膜蛋白和博德特菌属表面蛋白。

[0133] 降压可以约83巴/分钟-200巴/分钟的速率进行。在本发明中考虑的原核生物可包括*Avibacterium*、布鲁杆菌属(*Bruceella*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、嗜血菌属(*Haemophilus*) (例如,猪嗜血杆菌(*Haemophilus suis*))、沙门氏菌属(*Salmonella*) (例如,肠炎沙氏杆菌(*Salmonella enteritidis*)、鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)、婴儿沙门氏菌(*Salmonella infantis*))、志贺菌属(*Shigella*)、巴斯德菌属(*Pasteurella*),和*Rimeirella*。

[0134] 在原核生物系统中,可选择许多表达载体。此种载体包括但不限于多功能的大肠杆菌(*E.coli*)克隆和表达载体诸如pBLUESCRIPT(Stratagene);pIN载体(Van Heeke&Schuster,J.Biol.Chem.264:55035509(1989));等;PGE载体(Promega,Madison,Wis.);在真核生物系统中,细胞系可为酵母菌(诸如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*),杆状病毒细胞、哺乳细胞、植物细胞)。真核生物系统的表达载体包括但不限于,pVR1020或pVT1012载体(Vical Inc.,San Diego,CA)、*Pichia*Pink载体(Invitrogen,CA,USA)、pFasBac TOP0载体(Invitrogen)。

[0135] 本发明中提供的用于制备在原核生物或真核生物中表达的可溶性的、解聚的、重折叠的或活性的蛋白的方法可用于增溶任意蛋白。蛋白可包括抗体和胰岛素。蛋白还可包括任意治疗性蛋白，包括凝血因子、肽类激素等。

[0136] 在另一实施方案中，本发明提供一种包含高压灭活的微生物包括病毒的组合物或疫苗。微生物可为例如原生动物（例如贾第虫属（giardia）、锥虫（trypanosome）、变形虫属（amoeba）、恶性疟原虫（falciparum）等）、病毒（例如PCV2、Rota、西尼罗（West Nile）、FMD、瘟热、狂犬病、流感、疱疹、牛腹泻、传染性粘液囊病、传染性鼻炎、腺病毒、痘病毒等）或细菌（丹毒杆菌、大肠杆菌、葡萄球菌属（staphylococcus）、葡萄球菌属（coccidia）、链球菌属（streptococcus）、猪肺炎支原体（mycoplasma hyopneumoniae）、螺杆菌属（helicobacter）等）、和药学或兽医可接受的载体、赋形剂、媒介物（vehicle）或助剂（adjuvant）。

[0137] 在另一实施方案中本发明提供一种用于高压灭活百日咳博德特菌（B.pertussis）的细胞悬浮液的方法，包括步骤：

[0138] (a) 在培养基中制备百日咳博德特菌的细胞悬浮液，

[0139] (b) 将在所述培养基中制备的细胞悬浮液浓缩，任选地补充盐水（0.9%NaCl）或缓冲溶液，不超过终体积的25%（V/V），

[0140] (c) 将所浓缩的细胞悬浮液在包含在50°C至54°C之间的温度下加热，和

[0141] (d) 通过高压处理灭活热处理的浓缩的细胞悬浮液，其中高压高于2000巴但低于6000巴。

[0142] 任何便于百日咳博德特菌培养的液体培养基都可以使用。它可以是，特别是，Cohen Wheeler培养基（American Journal of Public health, 1946, 36, 371-376）、Verwey培养基（J.Bacteriol. 1949; 58:127-134）或如Stainer D.W.等描述的化学地定义的培养基（Journal of General Microbiology 1971, 63, 211-220）。优选地液体培养基为衍生自Horni-brooks原始液体培养基的Cohen Wheeler培养基且已经被证明尤其适合于百日咳博德特菌的大规模培养。Cohen Wheeler培养基的组合物包含氮源如酪蛋白氨基酸或酪蛋白水解产物、无机盐（磷酸一钾、氯化镁、氯化钙、硫酸亚铁、硫酸铜）、可溶性淀粉、酵母提取物、和半胱氨酸衍生物的混合物，其中半胱氨酸衍生物选自半胱氨酸、半胱氨酸的盐如盐酸半胱氨酸、胱氨酸和盐酸谷胱甘肽。任选地Cohen wheeler组合物可含有一些其它组分诸如氨基酸和/或氯化钠。通常酵母提取物为水解的酵母提取物或自溶解的酵母提取物的形式且已经渗析或超过滤过。

[0143] 将制备的百日咳博德特菌悬浮液收获并浓缩，例如通过用减少体积的培养物上清液离心和再悬浮细胞沉淀，任选地补充盐水（0.9%NaCl）或缓冲溶液诸如磷酸盐缓冲液，其不超过终体积的25%（V/V），或通过切向流过滤（tangential flow filtration），使得最终的细胞浓度通常在 10^9 至 10^{13} CFU/ml之间。通常，浓缩的细胞悬浮液的终体积比收获物的体积小10至20倍。然后将百日咳博德特菌的浓缩的悬浮液在包含在50°C至54°C之间（边界值包括在内）的受控温度下加热一段时间，这降低细胞生存力，因子为约 10^4 至 10^6 （以CFU/ml测量），和在防止蛋白热变性的同时降低百日咳毒素的毒性。这种效果可通过将浓缩的悬浮液在50°C至54°C之间的受控温度下加热30分钟来实现。优选地，在加热浓缩的悬浮液中也考虑其中温度在38°C至54°C之间的时间段。例如，其中浓缩的悬浮液在38°C至54°C之间加热的时间段，其包括其中温度在50至54°C之间的30分钟时间，可持续40至90分钟、或50至80分

钟或甚至55至70分钟(边界值包括在内)。这些温度参数的设置可通过自动受控加热程序容易监测,根据该程序浓缩的细胞悬浮液的温度在所定义的时间段内(例如10至20分钟)自38℃至50℃逐步增加,继之以其中温度保持在50至54℃之间(边界值包括在内)的30分钟时间段和最后是其中浓缩的细胞悬浮液的温度自50℃至38℃逐步降低的所定义的时间段(例如10至20分钟)。

[0144] 最后将热处理的和浓缩的百日咳博德特菌细胞悬浮液通过在保存整体灭活的细菌的免疫原性的条件下高压处理完全灭活。该效果通过采用特别是本发明的高压设备使热处理的和浓缩的细胞悬浮液经受高压来实现,其中高压高于2000巴但低于6000巴。它可以是例如但不限于2500巴、3000巴、3500巴、4000巴、4500巴、5000巴、5500巴。压力越高,需要高压处理的时间越短。更具体地,高压可以是在3000巴至5000巴的范围内(边界值包括在内)的任意压力,例如但不限于3000巴、3100巴、3200巴、3300巴、3400巴、3500巴、3600巴、3700巴、3800巴、3900巴、4000巴、4100巴、4200巴、4300巴、4400巴、4500巴、4600巴、4700巴、4800巴、4900巴、5000巴。在此高压范围内,高压处理为至少15分钟长,但通常持续时间在15分钟至180分钟的范围之内并根据施加于热处理的和浓缩的细胞悬浮液的高压的强度进行调节。当要施加的高压为3000巴时,高压处理将持续30分钟以上,例如90分钟、100分钟、110分钟、120分钟、130分钟、140分钟、150分钟、160分钟、170分钟、或180分钟。另一方面,当要施加的高压在4000巴至5000巴的范围内(边界值包括在内)时高压处理的持续时间可以缩短,例如30分钟或更少但为小心起见建议处理30分钟至180分钟的时间。它可以是例如但不限于30分钟、40分钟、50分钟、60分钟、70分钟、80分钟、90分钟、100分钟、110分钟、120分钟、130分钟、140分钟、150分钟、160分钟、170分钟、或180分钟,例如在4000巴下处理90分钟。在此高压和时间段的范围内,发现不存在恢复现象,这意味着细菌的灭活是不可逆的和定形的(definitive),因为在休眠期之后不再有能存活的细菌。

[0145] 通过根据本发明方法的热处理和高压处理的组合获得的完全灭活的百日咳博德特菌的浓缩悬浮液保留良好的免疫原性质,因为其效力很好地保存且比得上依照关于百日咳菌疫苗的国际标准校准的参比疫苗或被国际管理当局批准的等同标准疫苗的效力。制备物中的毒素被很好地中和,因为小鼠增重试验得到满意的结果。通过扫描电子显微镜的观察揭示在热处理和高压处理之后没有可见的灭活的细菌群的形态学变化。它基本上由整体灭活的细菌制成,不含显著比例的溶解细菌,且看起来象通过用硫柳汞化学处理灭活的细菌群。此外,本发明的方法可以工业规模进行,本发明的高压设备已经设计成处理重量大量的生物材料(50升或更多)。本发明的方法代表通过硫柳汞进行百日咳博德特菌的传统化学灭活的好的替代方案,并代表一种制备灭活的全细胞百日咳菌疫苗的新的可能。因此,本发明的其它目的涉及一种制备全细胞百日咳菌疫苗的方法,包括步骤:1)通过如本发明中描述的热处理和高压处理灭活百日咳博德特菌的浓缩细胞悬浮液,和2)在分入包装设备中之前在药学上可接受的赋形剂中稀释灭活的百日咳博德特菌浓缩细胞悬浮液。.

[0146] 药学或兽医可接受的载体或助剂或媒介物(vehicles)或赋形剂为本领域技术人员熟知。可用于本发明方法中的药学或兽医可接受的载体或助剂或媒介物或赋形剂包括但不限于,0.9%NaCl(例如,盐水)溶液或磷酸盐缓冲液、聚-(L-谷氨酸盐)或聚乙烯吡咯烷酮。药学或兽医可接受的载体(carrier)或媒介物或赋形剂可以是促进载体(vector)(或由发明的载体体外表达的蛋白)给药的、或促进载体(或蛋白)转染或感染和/或改善的保存的

任意化合物或化合物的组合。剂量和剂量体积在本申请中在一般说明中进行了讨论,且也可通过技术人员由本申请公开的阅读结合技术上的知识来测定,不需任何过度的实验。

[0147] 亚单位(蛋白)疫苗可与助剂组合,如基于矿物油和/或植物油和非离子型表面活性剂诸如嵌段共聚物**TWEEN®**、**SPAN®**的水包油、水包油包水型乳液。此种乳液尤其是描述于“Vaccine Design-The Subunit and Adjuvant Approach”,Pharmaceutical Biotechnology,1995的第147页中的那些,或TS乳液尤其是TS6乳液,和LF乳液尤其是LF2乳液(关于TS和LF两种乳液,参见WO 04/024027)。其它适宜的助剂为例如维生素E、皂昔类、和**Carbopol1®**(Noveon;参见W099/51269;W0 99/44633)、氢氧化铝或磷酸铝(“Vaccine Design,The subunit and adjuvant approach,”Pharmaceutical Biotechnology,第6卷,1995)、生物助剂(即C4b,尤其是鼠C4b(Ogata R T等)或马C4b,GM-CSF,尤其是马GM-CSF(US 6,645,740))、毒素(即霍乱毒素CTA或CTB,大肠埃希氏菌(大肠杆菌)不耐热毒素LTA或LTB(Olsen C W等;Fingerut E等;Zurbriggen R等Peppoloni S等),和CpG(即CpG#2395(参见Jurk M等),CpG#2142(参见EP 1,221,955中的SEQ.ID.N0:890))。其它助剂包括聚腺苷酸-聚尿苷酸,二甲基双十八烷基溴化铵(DDA)(“Vaccine Design The Subunit and Adjuvant Approach”,由Powell and Newman编辑,Pharm.Biotech.,6:第03页,第157页);N,N-双十八烷基-N’,N’-双(2-羟乙基)丙二胺(诸如**AVRIDINE®**)(同前,第148页);和卡波姆、壳聚糖(例如参见美国专利号5,980,912);丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物,马来酸酐和链烯基衍生的聚合物,含有季铵盐的阳离子型脂质,细胞因子。也可使用任意助剂的组合。

[0148] 在一实施方案中,助剂的溶液尤其是卡波姆的溶液(Pharmeuropa,第8卷,第2期,1996年6月)在蒸馏水中制备,有利地在氯化钠的存在下制备,所得溶液处于酸性pH下。此原液通过将其加入到期望量的(为了获得期望的终浓度)、或其相当的一部分、加有NaCl的水中,有利地为生理盐水(NaCl 9g/l),立即以若干份加入,伴随或随后中和(pH 7.3至7.4),有利地用NaOH中和。在生理pH下的此溶液用于与疫苗混合,可将其尤其以冷冻干燥、液体或冷冻形式储存。最终疫苗组合物中的聚合物浓度可为0.01%至2%w/v、0.06至1%w/v、或0.1至0.6%w/v。

[0149] 本发明的另一方面涉及一种用于诱导动物中抗一种或多种抗原的免疫应答或动物中抗一种或多种病原体的保护性反应的方法,该方法包括用本发明的疫苗或药物组合物接种动物至少一次。还有本发明的另一方面涉及一种以初免-加强的给药方式用于诱导动物体内针对一种或多种抗原的免疫应答或动物体内抗一种或多种利什曼原虫属病原体的保护性反应的方法,该方法包括至少一剂主(primary)给药和至少一剂用普通多肽、抗原、表位或免疫原的加强给药。用于主给药的免疫组合物或疫苗与用作加强给药的那些在性质上可以相同,可以不同。初始-给药可包含一剂或多剂给药。类似地,加强给药可包含一剂或多剂给药。初免-加强给药可相隔2至6周进行,例如相隔约3周。根据一个实施方案,还考虑半年一次的加强或一年一次的加强药,有利地使用亚单位(蛋白)疫苗。

[0150] 除皮下或肌内之外可以使用各种给药途径,如皮内或透皮。

[0151] 根据本发明的组合物或疫苗包含激发治疗反应有效量的一种或多种在本申请中讨论的多肽或基本上由其组成或由其组成;且有效量可由本申请的公开包括在本申请中引入的文献、和本领域的知识来确定,不需过度的实验。

[0152] 对于包含本发明的表达的蛋白的组合物或疫苗，剂量可包括、约1 μ g至约2000 μ g、约5 μ g至约1000 μ g、约10 μ g至约100 μ g、约20 μ g至约1000 μ g、约30 μ g至约500 μ g、或约50 μ g至约500 μ g。剂量体积可在约0.1ml至约10ml之间、或在约0.2ml至约5ml之间。

[0153] “抗原”或“免疫原”指诱导宿主动物体内特异性免疫应答的物质。抗原可包括整个机体、灭活的、减毒的或活的机体；亚单位或机体的一部分；含有具有免疫原性性质的嵌入物的重组载体；在呈递给宿主动物时能诱导免疫应答的DNA片或片段；多肽、表位、半抗原、或它们的任意组合。作为替代，免疫原或抗原可包括毒素或抗毒素。

[0154] 术语“蛋白”、“肽”、“多肽”和“多肽片段”可在本申请中互换使用，指任意长度的氨基酸残基的聚合物。聚合物可以是直链或分支的，它可包含改性氨基酸或氨基酸类似物，且它可被除氨基酸之外的化学部分间隔。该术语还包括天然修饰的或通过干预修饰的氨基酸聚合物；例如二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化、或任何其它操作或修饰，如与标记组分或生物活性组分缀合。

[0155] 本申请中所使用的术语“免疫原性的或抗原性多肽”包括多肽在一定意义上(一旦给予宿主)是免疫活性的多肽，它能激起针对该蛋白的体液和/或细胞类型的免疫应答。优选地蛋白片段使得它与总蛋白具有基本上相同的免疫活性。因此，根据本发明的蛋白片段包含至少一个表位或抗原决定簇或基本上由其组成或由其构成。本申请中所使用的“免疫原性”蛋白或多肽，包括该蛋白的全长的序列、其类似物、或其免疫原性片段。“免疫原性片段”指包含一个或多个表位因此激发上述免疫应答蛋白的片段。此种片段可采用本领域熟知的任意数量的表位作图技术鉴定。参见，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第66卷(Glenn E.Morris, Ed., 1996)。例如，线性表位可测定通过例如以下方法来测定：在固体载体上同时合成大量的肽，该肽相当于蛋白质分子的一部分，和当该肽还与载体连接时使该肽与抗体反应。这种技术是本领域已知的并描述于例如美国专利4,708,871; Geysen等, 1984; Geysen等, 1986中。类似地，构象表位容易通过诸如通过例如x射线晶体学和二维核磁共振测定氨基酸的空间构象来鉴定。参见，例如，Epitope Mapping Protocols, 上文。尤其适用于T.parva的蛋白的方法完整地描述于PCT/US2004/022605中，全文引入本文中作为参考。

[0156] 如本申请中讨论的，本发明包括抗原性多肽的活性片段和变体。因此，术语“免疫原性或抗原性多肽”还考虑序列的缺失、添加和取代，只要多肽功能产生如本文中定义的免疫应答。术语“保守性变异”表示氨基酸残基被另一个生物学相似的残基置换，或核酸序列中核苷酸的置换使得所编码的氨基酸残基不变化或为另一个生物学相似的残基。在这方面，特别优选的取代在性质上通常在性质上是保守的，即，那些在氨基酸族内进行的取代。例如，氨基酸通常分成四族：(1) 酸性的—天冬氨酸和谷氨酸盐；(2) 碱性的—赖氨酸、精氨酸、组氨酸；(3) 非极性的—丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；和(4) 不带电的极性的—甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、和酪氨酸有时候归类为芳族氨基酸。保守性变异的实例包括一个疏水性残基诸如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸取代另一个疏水性残基，或一个极性残基取代另一个极性残基，诸如精氨酸取代赖氨酸、谷氨酸取代天冬氨酸、或谷氨酰胺取代天冬酰胺等；或以将不会对生物学活性有重大影响的结构相关的氨基酸进行类似的氨基酸的保守性置换。因此，与参比分子有基本上相同氨基酸序列但具有较少的氨基酸置换的

蛋白在参比多肽的定义范围内，其中较少的氨基酸置换基本上不影响蛋白的免疫原性。所有通过这些改性制备的多肽都包括在本发明中。术语“保守性变异”还包括使用取代的氨基酸代替未取代的母体氨基酸，条件是针对取代的多肽产生的抗体也与未取代的多肽发生免疫反应。

[0157] 术语“表位”指特异性B细胞和/或T细胞对其作出响应的在抗原或半抗原上的位点。该术语还可与“抗原决定簇”或“抗原决定簇位点”互换使用。识别相同表位的抗体可在简易免疫测定中鉴定，其中简易免疫测定显示一个抗体阻断另一抗体与靶抗原结合的能力。

[0158] 对组合物或疫苗的“免疫应答”为细胞和/或抗体-介导的对感兴趣的组合物或疫苗的免疫应答在宿主中发生。通常，“免疫应答”包括但不限于以下效应中的一种或多种：特异地针对包含在感兴趣的组合物或疫苗中的抗原，产生抗体、B细胞、辅助T细胞、和/或细胞毒性T细胞。优选地，宿主将显示治疗性或者保护性免疫应答使得对新感染的抗性将增强和/或疾病的临床严重程度降低。这种保护将通过受感染宿主通常表现的病征和/或临床疾病体征的减少或者缺少、较快的恢复时间和/或受感染宿主中降低的病毒滴度得到证实。

[0159] “动物”指哺乳动物、鸟类等。本申请中所使用的动物或宿主包括哺乳动物和人。动物可选自马科动物(例如马)、犬科动物(例如狗、狼、狐狸、草原狼、豺)、猫科动物(例如狮、虎、家猫、野猫、其它大猫、及其它猫科动物包括猎豹和山猫)、绵羊科动物(例如绵羊)、牛科动物(例如牛)、猪科动物(例如猪)、禽(例如鸡、鸭、鹅、火鸡、鹌鹑、野鸡、鹦鹉、雀类、鹰、鸦、鸵鸟、鸸鹋和食火鸡)、灵长类动物(例如原猴亚目的猴、跗猴、猴、长臂猿、猿)、白鼬、海豹、和鱼。术语“动物”还包括在所有发育阶段的个体动物，包括新生、胚胎和胎儿期。

[0160] 除非另有解释，本申请中使用的所有技术和科学术语与本申请公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。单数术语“一种”、“和”“该”包括复数的所指对象，除非上下文明确地另有所指。类似地，单词“或”是指包括“和”，除非上下文明确地另有所指。

[0161] 组合物

[0162] 本发明涉及高压灭活的微生物疫苗或组合物，其可包含高压灭活的微生物和药学或兽医可接受的载体、赋形剂、或媒介物(vehicle)，其激发、诱导或刺激动物体内的应答。

[0163] 术语“核酸”和“多聚核苷酸”指直链或分支的、单链或双链的、或其杂化物的RNA或DNA。术语还包括RNA/DNA杂化物。以下为多聚核苷酸的非限制性实例：基因或基因片段、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、核酶、cDNA、重组多聚核苷酸、分支的多聚核苷酸、质粒、载体(vectors)、任意序列中分离的DNA、任意序列中分离的RNA、核酸探针和引物。多聚核苷酸可包括修饰的核苷酸，如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物、uracyl、其它糖和连接基团如fluororibose和硫醇盐、和核苷酸支链。核苷酸的序列可在聚合之后用标记组分进一步修饰，如通过缀合修饰。包括在本申请的定义内的其它类型的修饰为帽、一个或多个天然存在的核苷酸用类似物取代、和引入将多聚核苷酸与蛋白、金属离子、标记组分、其它多聚核苷酸或固体载体连接的方式。多聚核苷酸可通过化学合成获得或者由微生物产生。

[0164] 术语“基因”被广泛使用指与生物功能相关的多聚核苷酸的任意片段。因此，基因包括基因组序列中的内含子和外显子、或仅仅cDNAs中的编码序列和/或它们的表达所需要的调节序列。例如，基因还指表达mRNA或功能性RNA、或编码特定蛋白的核酸片段，其包括调节序列。

[0165] “分离的”生物组分(如核酸或蛋白或细胞器)指已经从机体细胞中的其它生物组分基本上分离或纯化的组分,其中该组分天然存在,例如,其它染色体和外染色体DNA和RNA、蛋白质、和细胞器。已经“分离的”核酸和蛋白质包括通过标准的纯化方法纯化的核酸和蛋白质。术语还包括通过重组技术以及化学合成制备的核酸和蛋白质。

[0166] 术语“保守性变异”表示氨基酸残基被另一个生物学相似的残基置换,或核酸序列中核苷酸的置换使得所编码的氨基酸残基不变化或为另一个生物学相似的残基。在这方面,特别优选的取代通常在性质上保守的,如上所述。

[0167] 术语“重组”指具有半合成、或合成来源的多聚核苷酸,其在自然界中不存在或者与以在自然界中没有发现的排列的另一多聚核苷酸连接。

[0168] “异源的”指由与它被正比较的其余的实体在基因上不同的实体获得的。例如,多聚核苷酸通过遗传工程技术置入由不同来源获得的质粒或载体之中,且为异种的多聚核苷酸。从其天然编码的序列中取出的并与非天然序列的编码的序列经操作(operatively)连接的启动子为异种启动子。

[0169] 本发明的多聚核苷酸可包括其它序列,如相同转录单位内的其它编码序列、控制元素如启动子、核糖体结合位点、5' UTR、3' UTR、转录终止子、聚腺苷酸化位点、在相同或不同启动子控制下的其它转录单位、允许克隆、表达、同源重组、和宿主细胞转化的序列、和可期望提供本发明实施方案的任何此种构造。

[0170] 使用方法和制造的产品

[0171] 本发明包括以下方法实施方案。在实施方案中,公开了一种接种动物的方法,包括将包含高压-灭活的微生物和药学或兽医可接受的载体、赋形剂、或媒介物的组合物施用于动物。该实施方案的一方面,动物为猪科动物。

[0172] 在本发明的一实施方案中,可运用初免-加强方案,其包括至少一剂主给药和至少一剂采用至少一种普通多肽、抗原、表位或免疫原的加强给药。典型地用于主给药的免疫组合物或疫苗与用作加强给药的那些在性质上不同。然而,值得注意的是相同的组合物可用作主给药和加强给药。这种给药方案称为“初免-加强”。

[0173] 初免-加强方案包括至少一剂初始-给药和至少一剂采用至少一种普通的多肽和/或其变体或片段的加强给药。用于初始-给药的疫苗可以在性质上不同于用作后者加强疫苗的那些。初始-给药可包含一剂或多剂给药。类似地,加强给药可包含一剂或多剂给药。

[0174] 对于哺乳动物靶物种的剂量体积,例如,猪(pig)或猪(swine)组合物的剂量体积,基于细菌抗原,通常在约0.1至约2.0ml之间、在约0.1至约1.0ml之间、和在约0.5ml至约1.0ml之间。

[0175] 疫苗的效力可以通过用丹毒杆菌的强毒菌株激发动物如猪科动物在最后的免疫之后约2至4周进行试验。同源和异源两种菌株均用于激发以试验疫苗的效力。动物可通过IM或SC注射、喷雾、鼻内、眼内、气管内、和/或经口激发。可在激发前和激发后收集来自关节、肺、脑、和/或口腔的样品并可分析丹毒杆菌-特异性抗体的存在。

[0176] 用于初免-加强方案中的包含本发明灭活的微生物的组合物含在药学或兽医可接受的中媒介物、稀释剂或赋形剂。本发明的方案保护动物不受微生物强毒形式的感染和/或预防感染的动物中的疾病进展。

[0177] 各个给药优选相隔1至6周进行。根据一个实施方案优选的时间间隔为3至5周,且

最好是4周,一年一次的加强也可考虑。动物,例如猪,在第一次给药的时候可以是至少3-4周的年龄。

[0178] 本领域技术人员应当理解在本申请中的公开作为例子提供而本发明不限于此。根据在本申请中的公开和本领域中的知识,技术人员可确定给药的量、给药途径、和用于各个注射方案的剂量,不需任何过度的实验。

[0179] 本发明的另一实施方案为一种实施激发或诱导抗动物体内微生物免疫应答或保护性反应的方法的试剂盒,包含高压灭活的免疫组合物或疫苗和实施以激发动物体内免疫应答的有效量递送的方法的说明书。

[0180] 本发明的另一实施方案为一种实施诱导抗动物体内强毒微生物的免疫应答或保护性反应的方法的试剂盒,包含含本发明高压-灭活的微生物的组合物或疫苗、和实施以激发动物体内免疫应答的有效量递送的方法的说明书。

[0181] 还有本发明的另一方面涉及一种用于如上所述的根据本发明的初免-加强接种的试剂盒。试剂盒可包含至少两个小瓶:含有用于根据本发明的初始-接种的疫苗或组合物的第一小瓶、和含有用于根据本发明加强-接种的疫苗或组合物的第二小瓶。试剂盒可有利地含有用于另外的初始-接种或另外的加强-接种的另外的第一或第二小瓶。

[0182] 在实施方案中,助剂包括促进通过粘膜内层的改善的吸收的那些。一些实例包括MPL、LTK63、毒素、PLG微粒和一些其它物质(Vajdy, M. Immunology and Cell Biology (2004) 82, 617-627)。在实施方案中,助剂可以是壳聚糖(Van der Lubben等2001; Patel等2005; Majithiya等2008; 美国专利序号5,980.912)。在实施方案中,助剂可以是灭活的细菌、灭活的病毒、灭活的细菌的部分、细菌脂多糖、细菌毒素、或衍生物或组合。

[0183] 在实施方案中,助剂包括整体细菌和/或病毒,包括*H. parasuis*、梭菌属(*clostridium*)、猪免疫缺陷病毒(SIV)、猪环状病毒(*porcine circovirus*) (PCV)、猪生殖和呼吸系统综合征病毒(*porcine reproductive and respiratory syndrome virus*) (PRRSV)、曼氏杆菌属(*Mannheimia*)、巴斯德菌属(*Pasteurella*)、*Histophilus*、沙门氏菌属、大肠杆菌,或它们的组合和/或变体。在几个实施方案中,助剂增加动物IgM、IgG、IgA、和/或它们的组合的产生。

[0184] 现在本发明将通过以下非限制性的实施例进一步描述。

[0185] 实施例1:设备参数形成

[0186] 本申请的公开提供,部分提供,一种高压设备,其1)完全灭活微生物(致使它们不感染);和2)保留和/或改善微生物的致免疫潜力(免疫原性)。设计成减少食物(例如汁液)或生物制剂(例如血液产品或重组因子VIII)中的微生物负载的先前设备,缺乏这些特征,这些特征对制备安全的、有效的、高压-灭活的疫苗组分是至关重要的。在建立微生物灭活动力学的过程中,对边界条件进行了评价,包括温度和压力的极值、和压力梯度的极值。还评价了高压灭活的微生物的抗原性和免疫原性以帮助定义设备要求,对设备加热/冷却机制也进行了评价。还对设备的操作温度的均一性做模型,以形成最佳的高压灭活条件。通过模型化测定设备中入口温度的极值允许进行灭活参数(压力、时间和温度)验证。

[0187] 参数模型化。开发了采用计算代码Cats3M的有限元法并用于评价关于病毒和/或细菌灭活的高压(几百MPa)室中的热交换。对若干2D轴对称的壳体几何形状进行计算以更好地认识壳体的机械构形对后者的热响应的影响。研究的目的是设计一种大壳体体积(约

100L),目的是限制温度的不均一性,和满足生物灭活机制的限制条件。发展和研究了几个在高压下和在零压力下有松弛时间的压缩-减压周期内的高压过程。

[0188] 所开发的算法可以将整个处理过程中的等温线形象化。平均温度和温度对时间的不均一性从这些计算中提取。该算法的有效性通过与若干实验研究比较得到证实。我们已经试验了传递压力的不同流体,并已经评价了诸如压缩和减压速率、压力传递流体的初始温度、和所达到的最大压力的因素的影响。

[0189] 结果表明很好地拟合实验测量并可以描绘实验方案和采用算法设置壳体的几何形状以指导其设计(对等静压机、1/4升体积活塞模式的实验和模型化的温度曲线图之间的比较)。两种测量都聚焦于约0.16%至在13°C的温度下的Cp(4236Jg-1.K-1和4243Jg-1.K-1)的值。这为我们提供在此温度下 4240 ± 0.004 Jg-1.K-1的热容量。在20°C下水的比热为4.1813Jg-1.K-1[4],其与对通过压法处理的生物产品的测量有1.4%的差别。假使生物流体和水之间的物理性质差别小,那么这些结果非常一致并且还证实了该模式对微生物的高压灭活的适用性。因此,通过变化压缩和减压的速率、压力传递流体的初始温度、和所达到的最大压力对水进行的循环的模型化,代表处理生物流体的实际情形。

[0190] 既然发明人已经提供了本申请的公开,技术人员将能通过对本申请中讨论的参数的常规优化成功地灭活任意数量的微生物。

[0191] 实施例2:高压灭活的丹毒杆菌在猪中的效力

[0192] 采用本申请的公开的设备对丹毒杆菌灭活。在高压灭活丹毒杆菌的努力过程中,令人惊奇地发现,存在“恢复现象”,由此细菌显示在于室温几天的储存之后修复了它们的酶系统的能力。因此,必须调节高压设备压力、温度、和时间参数以对此现象进行弥补。研究了若干灭活条件,包括在37°C下4000巴90分钟。

[0193] 通过三种不同的方法对一百升的丹毒杆菌细菌培养物进行灭活以制备活性成分(PA):1)硫柳汞;2)甲醛钠(sodium formaldehyde);和3)高压(4000巴,90分钟,37°C)。对各灭活的部分的样品进行表征,在所有三个部分包括高压灭活的部分(单克隆Ab,蛋白质印迹法,数据没有显示)中检测SpaA蛋白(表面蛋白抗原A),一种已知为丹毒杆菌的保护性抗原的蛋白。来自用PA免疫的小鼠的血清含有三种抗此蛋白的多克隆抗体。进一步地,来自用重组蛋白SpaA接种的猪的血清具有识别硫柳汞-和高压-灭活的PA中的蛋白SpaA的抗体。最后,将三种PA通过荧光单克隆SpaA抗体进行染色,标记的/未标记的细菌群体随灭活的方式显著变化:95%的高压灭活的细菌被标记,其中平均荧光强度为24任意单位,而只有79%的硫柳汞灭活的细菌被标记,其中平均强度只有7单位(附图18)。该结果表明化学灭活破坏了细菌中存在的抗原性蛋白。

[0194] 对实验动物的接种试验。用三种灭活的丹毒杆菌(硫柳汞、甲醛、和高压)接种小鼠,然后通过IP注射用活的/强毒的丹毒杆菌攻击。百分之一百的用高压灭活的接种的小鼠经历攻击之后仍然存活(附图20)。

[0195] 接种目标动物:猪。7头猪的小组用化学-灭活的或高压-灭活的细菌、或重组SpaA蛋白接种,然后用皮内注射的活细菌攻击(附图23中提供的血清学数据)。对皮肤损害的外观进行监测,如果它被完全保护没有损伤形成则认为疫苗有效。所有接种的动物被完全保护不受两种丹毒杆菌菌株(血清型1和2)感染。

[0196] 由高压灭活的丹毒杆菌诱导的T细胞应答。增加在猪的外周血单核细胞(PBMCs)的

存在下放置的三种丹毒杆菌的稀释度显示IFN，其中猪用重组蛋白和T细胞应答SpaA特异性细菌抗原接种，细菌抗原采用ELISpot试验进行量化。该研究显示在所有测试的稀释中更好的体外T细胞对高压-灭活的抗原特异性的再活化反应。另外，接种之后42天，当特异性T细胞的频率衰弱时，该效果更加显著，清楚地表明抗原的较好质量(对于高压灭活的部分)。

[0197] 对T细胞表位绘图。蛋白LOG的重叠肽的库用于确定哪一个T细胞表位被各种灭活的细菌(活性成分，PA)激活。该研究显示用高压灭活的PA接种的动物比用化学灭活的PA接种的动物更好地识别一些表位。

[0198] 最后，对来自用不同疫苗制剂接种的猪的血清针对抗红斑丹毒丝菌的特异性抗体的水平进行试验。IgG1和IgG2被诱导，且在3种灭活方法中，与用化学-灭活的细菌接种的动物相比用高压-灭活的细菌接种的动物的IgG1和IgG2的滴度较高。

[0199] 实施例3：钩端螺旋体的高压灭活

[0200] 关于高压灭活评价了三种钩端螺旋体的疫苗株：犬钩端螺旋体(*Leptospira canicola*)、感冒伤寒型钩端螺旋体(*Leptospira grippotyphosa*)和黄疸出血型钩端螺旋体(*Leptospira Icterohaemorrhagiae*)。初步试验显示对于三个试验灭活温度(10°C、20°C和30°C)钩端螺旋体细菌在2500巴的压力下被成功地灭活。这些结果证实了Carla Silva于2000年(C.Silva等,2001)得到的那些结论。许多出版物已经聚焦于钩端螺旋体的不同菌株中保护性抗原的研究和鉴定(P.Cullen等,Infection And Immunity,2005)：脂多糖或LPS，一种负责抗原和凝集试验的细菌表面的主要组分；跨膜蛋白OmpL1；和被它们的N-端在膜中锚固的和在实验动物中提供部分保护的脂蛋白:LipL32、LipL36和LipL41

[0201] 近来，具有与免疫球蛋白90个氨基酸重复相似的表面蛋白(LigB和LigA)赋予试验配对的实验动物的部分保护(W.Yan等,Microbes and Infections,2009)。附图9提供推测的钩端螺旋体中的保护性抗原的图示。为了表征高压灭活之后不同细菌悬浮液的抗原性，对LPS、锚固在外膜中的脂蛋白(LipL32/41/46)、和致病因子(LigA/B)的研究在三个Lepto血清型上进行。处理条件包括未灭活的、通过化学灭活的硫柳汞钠(0.1g/l,24°C至29°C)、和根据表2的在20°C下高压灭活。

[0202] 表2.不同的钩端螺旋体悬浮液和灭活条件的描述。FTU:浊度单位。FACS:荧光激活细胞分选。

	黄疸出血型钩端螺旋体	犬钩端螺旋体	感冒伤寒型钩端螺旋体
ID	Lc84	Lc87	ATCC 23604
O. D. 450nm	0.709	0.53	0.73
FTU	341	256	400
FACS	1.8*10E9 U/ml	1.2*10E9 U/ml	2.4*10E9 U/ml
灭活 高压	2500b/60' (灭活1)	2500b/60' (灭活1)	2500b/60' (灭活1) - 2500b/30' (灭活2)
灭活对照	-	-	-
灭活 化学	硫柳汞 0.1g/L		
灭活对照	-	-	-

[0204] 所有条件试验的灭活都导致钩端螺旋体的灭活。灭活对照为常规使用的那些且它

们的检测阀是已知的并对检测存活在几毫升中的细菌足够敏感。简而言之,将样品离心,控制产物以收集丸剂中的灭活细菌并尽可能多除去上清液中的灭活试剂然后递送新鲜培养基中的沉淀培养物。同样的培养基通过生存力试验验证并通过10个钩端螺旋体细菌多的接种鉴别生长。灭活之后,用三个类型的血清进行抗原性研究:1)单克隆的抗LPS,不同的血清型之间不交叉;2)单特异性的多克隆抗体脂蛋白(LIPL);和3)对非LigA/B特异性的多克隆抗体(识别共同的表位)。表3详述了不同抗体的特性。

[0205] 表3:用于Lepto抗原性研究的抗体。M:单克隆的Ab;P:多克隆的Ab。

M (单克隆的) /P (多克隆的)	LPS	LipL32	LipL41	LipL46	LigA	LigB
LI	M	P	P	P	P	
LC	M	P	P	P	P	
LG	M	P	P	P	P	

[0206] [0207] 提及高压处理之后某些膜蛋白消失的出版物(M.Ritz等,International Journal Of Food Microbiology,2000)-这些抗原将在整个细菌悬浮液(或Brutes Crops-RB)、离心之后、灭活之前和之后这些细菌悬浮液的沉淀或上清液中寻找。对于三个菌株这些抗原的蛋白质印迹呈现在附图10-13中。对于全部三种处理,抗原LipL32、LipL41和LipL46(附图10和12),被多克隆抗体识别。高压灭活没有改变抗原性;然而,注意到当与未灭活的或化学灭活的小组相比时高压处理之后LipL32和LipL46抗原的一些降解(尤其是对于感冒伤寒型钩端螺旋体,附图12)。

[0208] 对于全部三种处理抗原LigB和LigA(附图11和13)被多克隆抗体识别。高压灭活不改变这些抗原的抗原性,且对于所考虑的所有处理上清液分配/沉淀不变。最后,对于Li和Lg的LPS分析的结果呈现在附图14A和B中。高压灭活之后LPS被识别且检测到的量在灭活之前和之后相同。总之,钩端螺旋体的高压灭活是高效的且不导致它们的抗原性变化。

[0209] 实施例4:百日咳博德特菌的热灭活和高压灭活

[0210] 1)浓缩的百日咳博德特菌悬浮液的制备

[0211] 将衍生自百日咳博德特菌菌株(由Boston Public Health Department (Massachusetts-USA) 提供)(Ref 214873M1)的冷冻干燥的样品收纳在Verwey培养基(J.Bacteriol.1949;58:127-34)中并用于接种Bordet-gengou固体培养基,补充25%去纤维蛋白的绵羊血液。在温育后(在36°C下72小时),然后将细菌转入Verwey液体培养基中并在36°C下培养约24小时,其中Verwey液体培养基用1g/1的超过滤的自溶的酵母提取物(Ref:springer 0701)补充。然后将细菌转入装有4.5l的Cohen Wheeler培养基(American Journal of Public health,1946,36,371-376)的生物反应器中,并在35°C下培养,p02设定点在26%,其中Cohen Wheeler培养基的初始pH=7.3,用1g/1的超过滤的自溶的酵母提取物补充。当细胞悬浮液的光密度在650nm达到0.4时,该培养物的一部分用于接种第二生物反应器。将此制备生物反应器填充4.5l的Cohen Wheeler培养基,补充1g/1的超过滤的自溶的酵母提取物。将此培养物于35°C温育,溶解的氧设定值在26%,初始pH在7.3,并在接种后大约20小时停止。将细胞悬浮液通过1)于+5°C在约21000g下离心培养物体积约30分钟和2)在约14倍减少体积的培养物上清液中再悬浮细胞沉淀进行浓缩

[0212] 2)浓缩的百日咳博德特菌悬浮液的热处理

[0213] 培养物上清液中的浓缩的细胞悬浮液的热处理在有温度监测系统的水浴中进行，其中温度监测系统监测温度参数设置使得水浴的温度在38°C至50°C之间逐步增加持续15分钟的时间段，之后是温度保持在50°C至54°C之间的30分钟的时间段，最后是温度自50°C至38°C逐步降低的15分钟的时间段。

[0214] 通过将0.5ml等分试样散布在3个含有Bordet-gengou固体培养基(Merck;Ref AX029167)的陪替氏培养皿上在热处理之前和之后评价浓缩的细胞悬浮液的生存力，其中Bordet-gengou固体培养基用25%绵羊血液(BioMerieux;Ref:55822)补充。在于36.5°C陪替氏培养皿温育5天之后对细菌计数(表4)。

[0215] 表4.在热处理之前和之后,浓缩的百日咳博德特菌悬浮液的生存力。

[0216]		菌落的数量 (以 CFU/ml 为单位)
	14 倍浓缩的细胞悬浮液	6.5×10^{10}
	14 倍浓缩的和热处理的细胞悬浮液	1.4×10^6

[0217] 还评价了与用于在38°C至50°C之间逐步升高和逐步降低温度的时间段、特别是对于在5分钟至30分钟之间变化的时间段有关的其它温度参数设置。这些变化被证明是对灭活处理没有影响。

[0218] 3)热处理的百日咳博德特菌的浓缩液的高压处理

[0219] 对高压处理的不同条件进行试验:2000巴30分钟,3000巴30或90分钟,4000巴30或90分钟和5000巴30至90分钟。对一些条件重复几次

[0220] 在采用与前一段中描述的相同方案进行高压处理之后浓缩的细胞悬浮液的生存力受到控制。结果显示在表5中。

[0221] 表5.在各种高压处理条件之后百日咳博德特菌残余的生存力。

[0222]	压力(以巴为单位)	时间(以分钟为单位)	残余的生存力
	2000	30	+
	3000	30	+/-
	3000	90	-
	4000	30	-
	4000	90	-
	5000	30	-
	5000	90	-

[0223] +:至少在3个用于控制细胞生长的陪替氏培养皿中的一个上观察到残余的细菌生长

[0224] +/-:当重复相同的高压条件时至少在3个用于控制细胞生长的陪替氏培养皿中的一个上有时候观察到残余的细菌生长

[0225] -:在3个用控制细胞生长的陪替氏培养皿上观察到没有残余的细菌生长

[0226] 这些结果显示当施加3000巴的高压处理30分钟以上时热和高压处理的浓缩液被完全灭活(没有残余的细菌生长)。当施加高于3000巴(例如4000巴或5000巴)的高压处理时,30分钟的时间段、或更少时间足以完全灭活热和高压处理的浓缩液。

[0227] 还在“恢复试验”中试验了被完全灭活的热和高压处理的浓缩液。此试验用于评价刚在高压处理步骤之后观察到的灭活结果在15天的休眠期之后是否得到证实。将所发现的灭活的热和高压处理的浓缩液于室温存储15天。然后从浓缩液中取出3份0.5ml的样品并平铺在3个含有Bordet-gengou固体培养基的培氏培养皿上，补充25%绵羊血液。将培氏培养皿于36.5°C温育6天且为了菌落的存在受到控制。没有检测到菌落，这意味着没有恢复现象，因为在所试验的完全灭活的浓缩液中，特别是在经受4000巴90分钟的热处理和高压处理的浓缩液中，再也没有观察到能存活的细菌。

[0228] 4) 百日咳博德特菌的热和高压-灭活的浓缩液的表征

[0229] 将热和高压-灭活的浓缩液、特别是经受4000巴90分钟的细胞浓缩液的生物学特征和分析特征与百日咳博德特菌的硫柳汞-灭活的浓缩液的那些进行比较，其中百日咳博德特菌的硫柳汞-灭活的浓缩液通常用作制备全细胞百日咳菌疫苗的单价体(monovalent bulk)。根据描述于段落1)中的方案制备经硫柳汞处理灭活的百日咳博德特菌的浓缩液。

[0230] 4.1) 扫描电子显微镜法

[0231] 通过扫描电子显微镜法(SEM)检验热和高压-灭活的浓缩液和作为对照的硫柳汞-灭活的浓缩液的形态特征。将细胞浓缩液固定于2.5%在PBS中的戊二醛中，继之以在1%含水的四氧化锇中的后固定(post fixation)。然后将物料在乙醇中脱水然后在六甲基二硅胺烷中脱水。然后将两个样品放置在云母板上用于随后通过SEM(Hitachi S4700, 8KV)以不同的放大倍数观察。经受4000巴90分钟(右边)的热和高压-灭活的浓缩液和硫柳汞-灭活的浓缩液(左边)的电子显微镜图片(X30000放大倍数)显示在图…中。在源自两种灭活处理的两个样品之间没有观察到显著的形态变化。特别地，在源自热和高压-灭活的浓缩液的样品中没有观察到细菌溶解或细菌细胞壁的畸变。

[0232] 4.2) 热和高压-灭活的浓缩液的效力

[0233] 通过测定保护50%的小鼠(ED 50)免受大脑内给药的致死剂量的百日咳博德特菌菌株影响的剂量来评价经受4000巴90分钟的热和高压-灭活的浓缩液的效力。将此剂量与以国际单位校准的参比百日咳菌疫苗的ED 50比较。根据WHO TRS n°941中提及的WHO推荐进行效力试验。所得到的结果是令人满意的，这意味着热处理和高压处理的结合不降低灭活的制备物的效力。

[0234] 4.3) 特异性毒性

[0235] 采用小鼠增重试验针对毒性试验经受4000巴90分钟的热和高压处理的浓缩液的毒性，其中小鼠增重试验按照WHO TRS n°941中提及的WHO的推荐。所得到的结果是令人满意的，没有毒性的体征。

[0236] 4.4) 内毒素含量

[0237] 全细胞百日咳菌疫苗含有脂质-寡聚糖内毒素，其通过鲎变形细胞溶胞产物试验进行量化。热和高压-灭活的浓缩液的内毒素含量在硫柳汞-灭活的百日咳博德特菌浓缩液的内毒素含量的相同数量级范围之内。

[0238] 实施例4：在大肠杆菌包涵体中表达的KSAC蛋白的增溶

[0239] 在以下三种缓冲液中制备KSAC(参见由USSN 61/694, 968产生的申请)包涵体：1) Tris 20mM, 50mM DTT, pH8; 2) Tris 20mM, 50mM DTT, pH8, 脲1M; 3) Tris 20mM, 50mM DTT, pH8, 脲2M。在相同的缓冲液中于室温在整个处理期间中没有压力的情况下制备的KSAC包涵

体用作对照。

[0240] 施加目标压力下的增压48小时,然后将样品降压24小时。附图25描绘以3000巴处理的KSAC样品的SDS-PAGE。附图26描绘3000巴处理的KSAC样品的上清液和采用传统的重折叠/增溶方法得到的KSAC蛋白的叠置的HPLC色谱图。结果表明峰相似且由高压处理获得的可溶性蛋白以三聚体组织。

[0241] 表6.3000巴处理之后的KSAC蛋白通过qDot-blot和HPLC的量化。

		2M 脳		
		对照	试验沉淀	试验上清液
[0242]	斑点印迹 $\mu\text{g}/\text{ml}$	347	10	797
	HPLC $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	-	723
		1M 脳		
		对照	试验沉淀	试验上清液
斑点印迹 $\mu\text{g}/\text{ml}$	328	10	750	
HPLC $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	-	746	
		不含脲		
		对照	试验沉淀	试验上清液
斑点印迹 $\mu\text{g}/\text{ml}$	123	15	649	
HPLC $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	-	825	

[0243] 增溶蛋白的量为约800 $\mu\text{g}/\text{ml}$,其非常接近于以包涵体形式的初始KSAC蛋白的估算量(1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。产率因此很高(75–100%)。

[0244] 附图27显示由在不含脲的缓冲液中3000巴加压的蛋白(较浅色线)和由传统的重折叠/增溶方法得到的蛋白(较深色线)获得的DLS数据的叠置。详尽的尺寸范围(上画面)显示在加压样品中检测到较大尺寸的较少对象(objects)。按数量的分布(下画面)显示大部分压力-重折叠的群体具有与通过传统方法重折叠的群体相似的尺寸且折叠似乎很相似。

[0245] 附图28显示对于所有这些使用的缓冲液在3000巴下获得的蛋白尺寸与由传统的色谱重折叠/增溶获得的蛋白尺寸相同。当在2000巴下处理时,蛋白尺寸与当在缓冲液中使用脲时由传统的色谱重折叠/增溶得到的蛋白尺寸相同。在高于3000巴的压力下,当不使用脲时高压聚集物出现。在脲存在于缓冲液中的情况下,蛋白似乎塌陷(尺寸为10nm),这表明已发生变性。

[0246] 附图29显示通过HPLC和Qdot-blot测定的KSAC可溶性蛋白含量的比较。结果表明增溶的蛋白的最大浓度由3000巴处理的样品得到,在HPLC和Qdot-blot技术之间具有良好的一致性。对于2000巴处理的样品,脲的存在有助于增加增溶产率。对于4000巴处理的样品,HPLC得到比Qdot-blot高的产率,表示抗原识别丧失。

[0247] 实施例3:不同高压的增溶方法的比较-KSAC蛋白

[0248] 研究目的是比较通过不同的方法增溶来自包涵体的蛋白的效率。

[0249] 在以下缓冲液中配制由大肠杆菌产生的KSAC包涵体形成包涵体悬浮液:a) 20mM Tris缓冲液,50mM二硫苏糖醇(DTT),pH=8.0;b) 20mM Tris缓冲液,pH=8.0。

[0250] 将包涵体悬浮液储存在Quick Seal管中用于如下所述的高压处理。在方法A中,对

包涵体悬浮液施加逐步的增压,将压力自0巴至3000巴以1000巴/分钟增加,其中具有在各自500巴下1小时持续的平稳阶段(在5小时之后达到3000巴的目标压力)。保持3000巴压力48小时。然后将样品自3000巴至0巴以125巴/小时的恒速降压24小时。在方法B中,将包涵体悬浮液根据US 6,489,450中描述的方法处理。使样品经受在1小时内以恒速增压直至2500巴。保持2500巴压力6小时。降压以恒速进行1小时,将压力自2500巴降低至0巴。如下面的表7中所示制备样品。

[0251] 表7. 包涵体悬浮液处理

[0252]

样品 (1mg/mL KSAC包涵体)	缓冲液	高压处理方法
1	Tris 20mM	方法A
2	Tris 20mM+DTT 50mM	方法A
3	Tris 20mM	对照*
4	Tris 20mM+DTT 50mM	对照
5	Tris 20mM	方法B
6	Tris 20mM+DTT 50mM	方法B
7	Tris 20mM	对照
8	Tris 20mM+DTT 50mM	对照

[0253] 对照*:没有高压处理,于室温储存。

[0254] SDS-PAGE分析

[0255] 高压处理之后,将样品离心以分离上清液和沉淀,并处理用于在SDS-PAGE上的蛋白质分析。SDS-PAGE分析如附图18A和18B中所示。每个孔载有5μl的样品(粗品)、5μl的上清液、5μl的再悬浮于Tris缓冲液中的沉淀之一。

[0256] 由SDS-PAGE上的谱带强度计算的KSAC蛋白量呈现在下面的表8中。

[0257] 表8. 在SDS凝胶上测得的带的强度的比较积分

		方法 A				方法 B			
样品		I. I. KSAC 带	总蛋 白 I. I.	%KSAC /总蛋白	%KSAC-S /%KSAC-P*	I. I. KSAC 带	总蛋 白 I. I.	%KSAC /总蛋白	%KSAC-S /%KSAC-P
KSAC 参比剂		36	49	73%		29	47	62%	
[0258] 对照-不含 DTT	S ¹	0	0	0%	-	0	0	0%	-
	P ²	13	26	50%		4	5	80%	
	C ³	3	21	14%		6	16	38%	
方法-不含 DTT	S	0	9	0%	0%	0	2	0%	0%
	P	43	76	57%		28	39	72%	
	C	27	86	31%		14	41	34%	
对照-含 DTT	S	1	8	13%	-	0	0	0%	-
	P	20	40	50%		24	36	67%	
	C	16	31	52%		22	37	59%	
方法-含 DTT	S	55	127	43%	75%	18	29	62%	69%
	P	8	14	57%		8	9	89%	
	C	45	106	42%		28	47	60%	
KSAC 参比剂		38	52	73%		29	45	64%	

[0259] S¹:上清液

[0260] P²:沉淀

[0261] C³:粗品,离心前

[0262] %KSAC-S/%KSAC-P*: [上清液中%KSAC/总蛋白]/[沉淀中%KSAC/总蛋白]

[0263] 结果表明在对照的上清液或当使用不含DTT的缓冲液时用方法A和B处理的样品中没有检测到显著量的KSAC。在当使用含有DTT的缓冲液时用高压处理(两种方法A和B)的样品的上清液中发现可溶性KSAC蛋白。令人惊奇的是,自SAS-PAGE的蛋白量化的结果还表明当与方法B比较时方法A提供更好的增溶。该令人吃惊的结果通过采用Q-Dot Blot和HPLC更准确地计算各个高压过程的增溶产率进一步得到证实。

[0264] Q-Dot Blot分析

[0265] 通过Q-Dot Blot分析样品的上清液以估算通过处理增溶的KSAC蛋白的量。结果显示于附图30A-30D和表11中。

[0266] 表11.在对照和高压处理的样品的上清液中发现的增溶的KSAC的浓度

标识	方法A	方法B
不含DTT的处理	26.0g/ml	12.7g/ml
不含DTT的对照	0	9.9g/ml
含DTT的处理	632.1g/ml	368.9g/ml
不含DTT的对照	61.7g/ml	63.9g/ml

[0268] 观察到在含和不含DTT的对照样品(没有高压处理)之间没有显著差别。在上清液中没有发现可溶性KSAC。该Q-Dot Blot结果证实了SDS-PAGE结果。

[0269] 采用含DTT的方法A进行的处理允许增溶和重折叠KSAC蛋白(通过Q-Dot Blot检测)。发现采用方法A可溶性KSAC蛋白的浓度为632μg/mL,而采用方法B得到的KSAC蛋白的浓

度仅为约369g/mL。所得到的增溶产率对于方法A为63%而对于方法B为37%。Q-Dot Blot结果进一步证实了方法A在制备可溶性和重折叠的蛋白方面更有效。

[0270] HPLC分析

[0271] 附图20显示对照品和方法A处理的样品的上清液HPLC色谱图的叠置。对于方法A处理的样品所得到的保留时间、保留体积和估算的纯度显示于下面的表11中。

[0272] 表11对于方法A处理的样品所得到的保留时间、保留体积和估算的纯度

[0273]	检测	信息	对照-没有 处理	方法 A 之后
[0274]	UV	RT (保留时间-分钟) VR (保留体积-mL) 估算的纯度 (%)	12.7 6.64 17.3	12.4 6.46 85.5

[0275] 附图21显示方法A处理的样品和方法B处理的样品的上清液的HPLC色谱图的叠置。对于方法A处理的样品所得到的保留时间、保留体积和估算的纯度显示于下面的表12中。

[0276] 表12对于方法A和B处理的样品所得到的保留时间、保留体积和估算的纯度

[0277]	检测	信息	方法 A	方法 B
[0277]	UV	RT (保留时间-分钟) VR (保留体积-mL) 估算的纯度 (%)	12.4 6.46 85.5	12.4 6.47 74.2

[0278] 附图22显示方法A处理的样品、方法B处理的样品和传统方法处理的样品(通过脲和DTT处理获得的变性和重折叠)的上清液的HPLC色谱图的叠置。对于方法A处理的样品所得到的保留时间、保留体积和估算的纯度显示于下面的表13中。

[0279] 表13对于方法A、方法B和传统方法处理的样品所得到的保留时间、保留体积和估算的纯度

[0280]	检测	信息	传统方法	方法 A	方法 B
[0280]	UV	RT (保留时间-分钟) VR (保留体积-mL) 峰面积 (mAU) 估算的纯度 (%)	12.5 6.50 8628 94.7	12.4 6.46 25251 85.5	12.4 6.47 10506 74.2

[0281] 根据峰面积判断(方法A的峰面积25251mAU对方法B的峰面积10506mAU) HPLC结果进一步证实了方法A比方法B提供更好的KSAC蛋白的增溶。方法A和B均可以获得KSAC蛋白的重折叠,非常接近于技术人员采用传统方法(采用脲+DTT处理的增溶和通过SEC色谱的重折叠)获得的结果。

[0282] 用方法A和B进行的试验在缺少DTT的情况下均不产生显著的可溶性KSAC蛋白。该结果证实了在高压处理的过程中需要还原剂破坏二硫键。然而,出乎意料的令人惊奇的发现是为了获得蛋白的正确的重折叠不需要除去DTT。与为了蛋白正确地重折叠必须从缓冲

液中除去DTT的常识相反,申请人令人惊奇地发现在本发明的高压处理中DTT的存在不干扰重折叠方法。由本发明的高压法得到的KSAC可溶性蛋白在DTT的存在下正确地重折叠形成三聚体(trimmers)。

[0283] 参考文献.

[0284] 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.

[0285] P.Cullen et al:Surfaceome of Leptospira spp.;Infection And Immunity 73,2005,4853-4863.

[0286] 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.

[0287] M.Ritz et al:Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of Salmonella typhimurium;International Journal of Food Microbiology 55,2000,115-119.

[0288] N.Wilkinson et al:Resistance of poliovirus to inactivation by high hydrostatic pressures;Innovative Food Science and Emerging Technologies 2, 2001,95-98.

[0289] Isbarn S.et al:Inactivation of avian influenza virus by heat and high hydrostatic pressure;Journal of Food Protection70,2007,667-673.

[0290] Shearer and Kniel.High Hydrostatic Pressure for Development of Vaccines.Journal of Food Protection.Vol.72,No.7,2009,Pages 1500-1508.

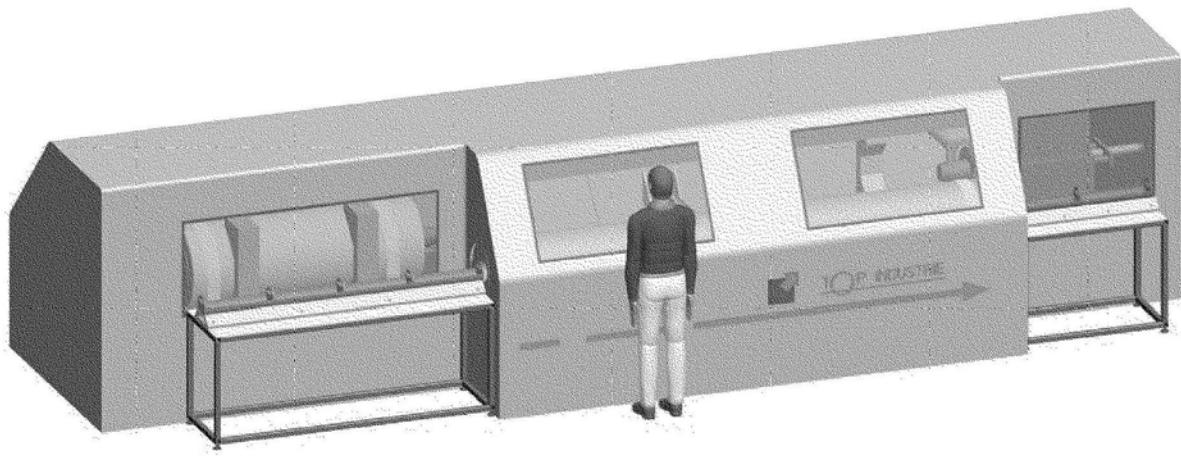


图1A



图1B

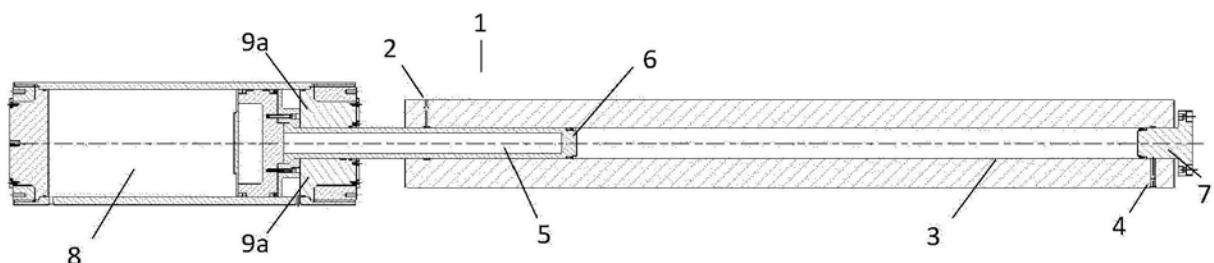


图2A

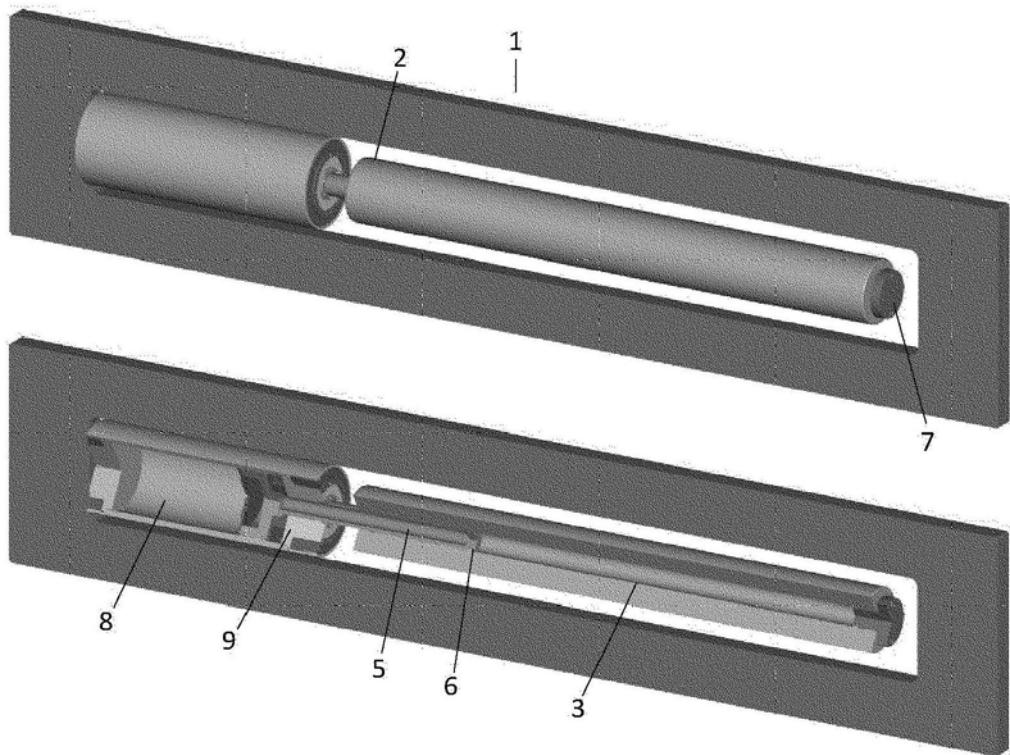


图2B

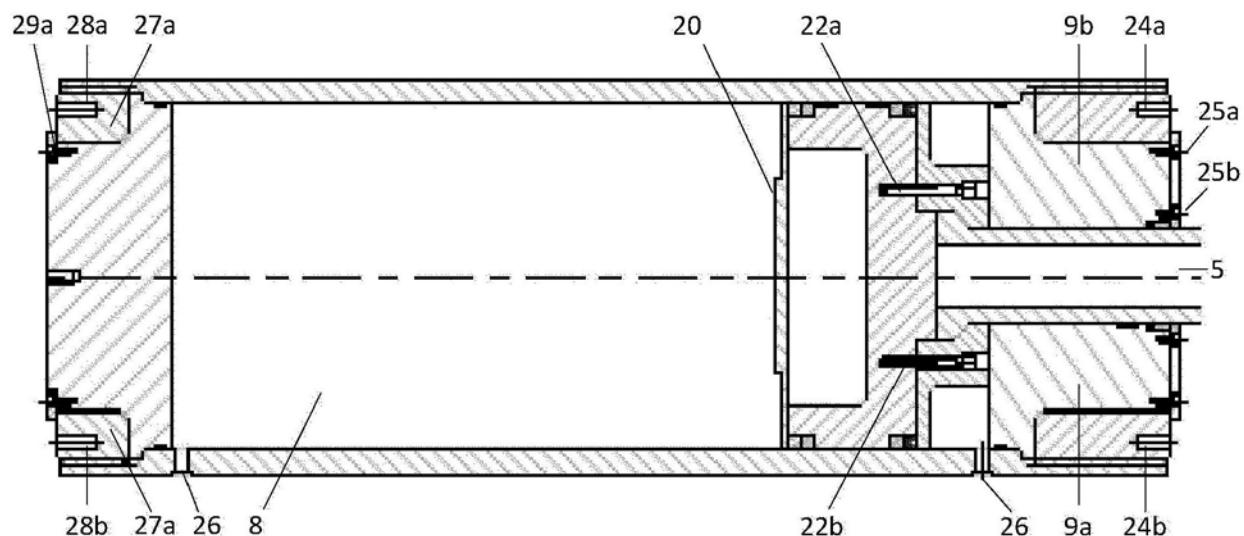


图3

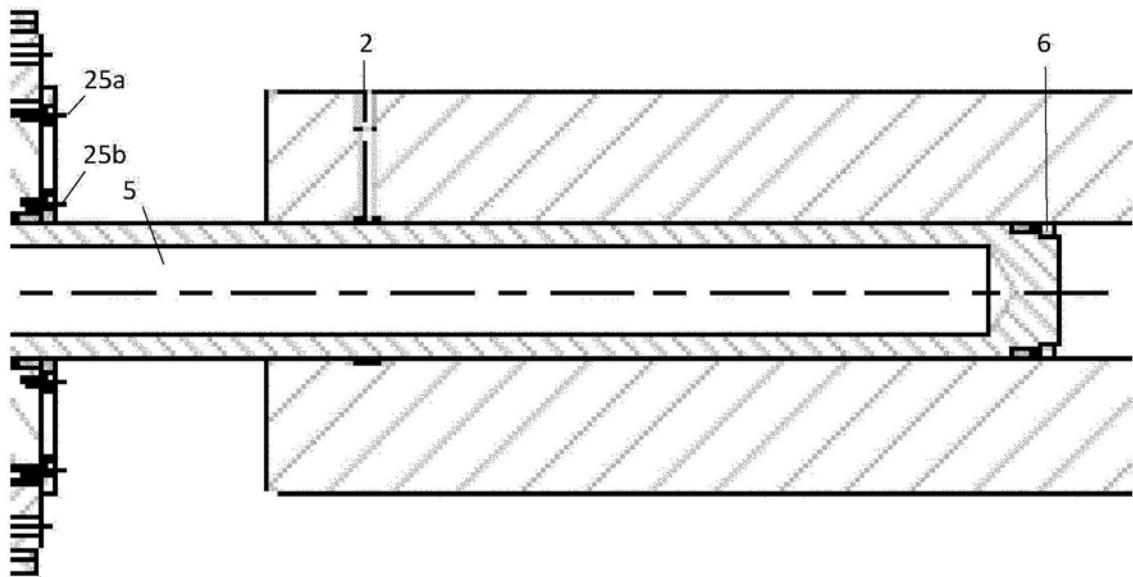


图4

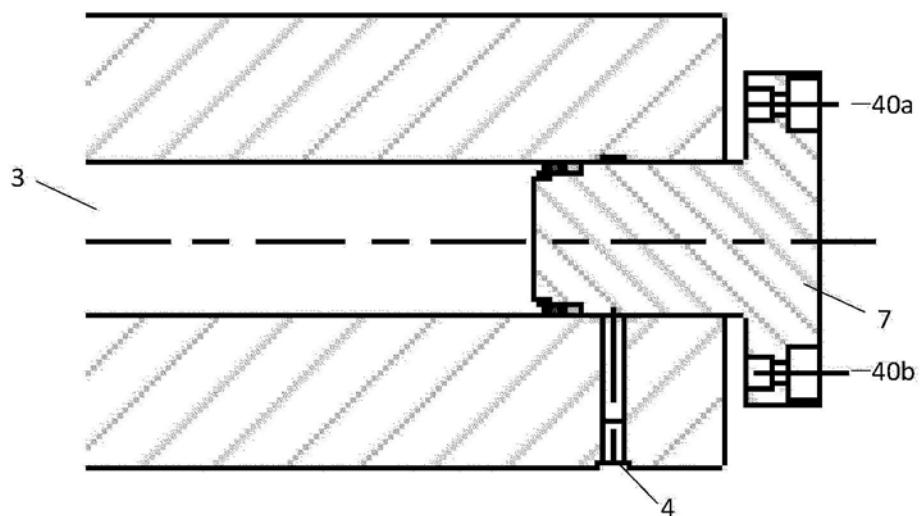


图5

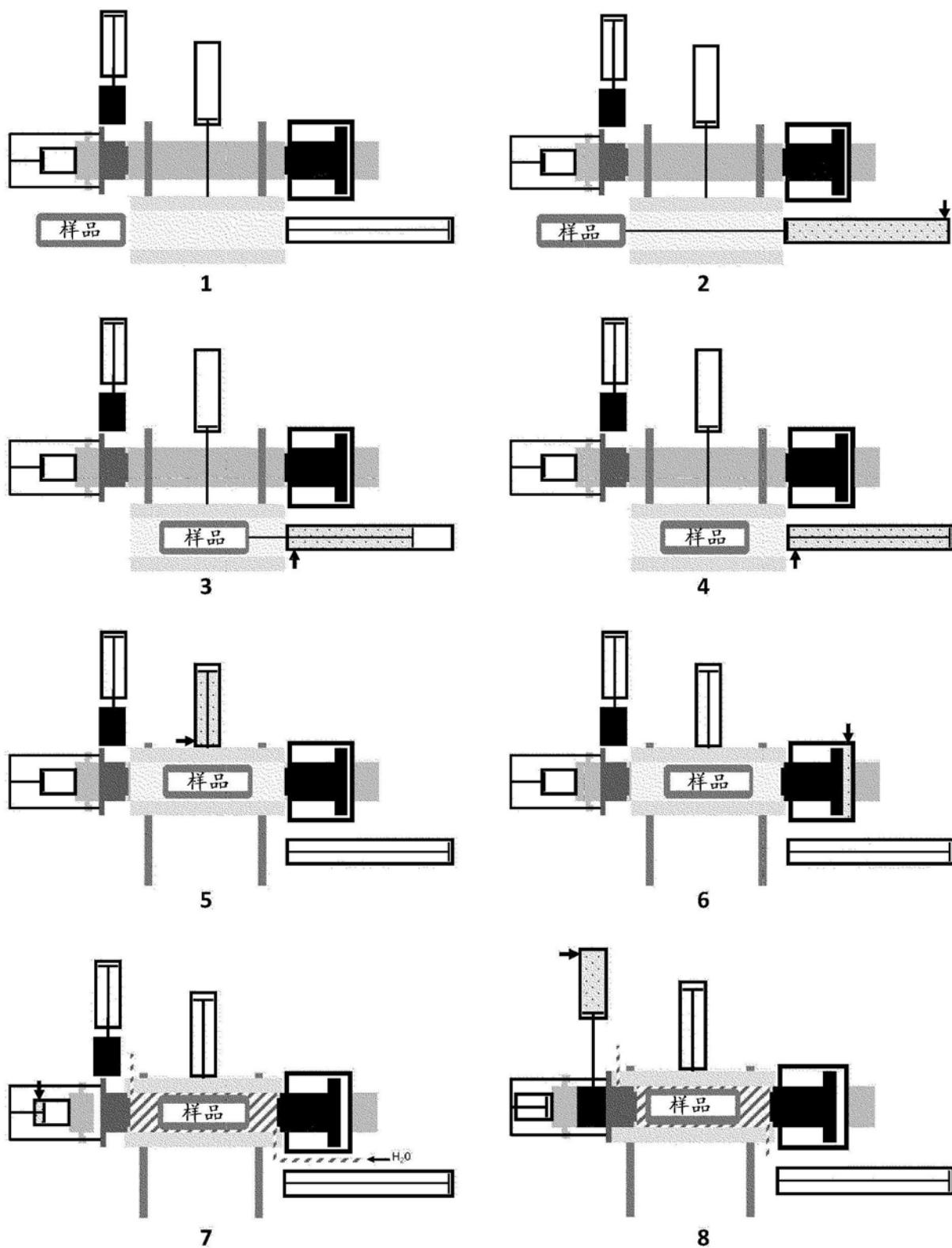


图6 (1/2)

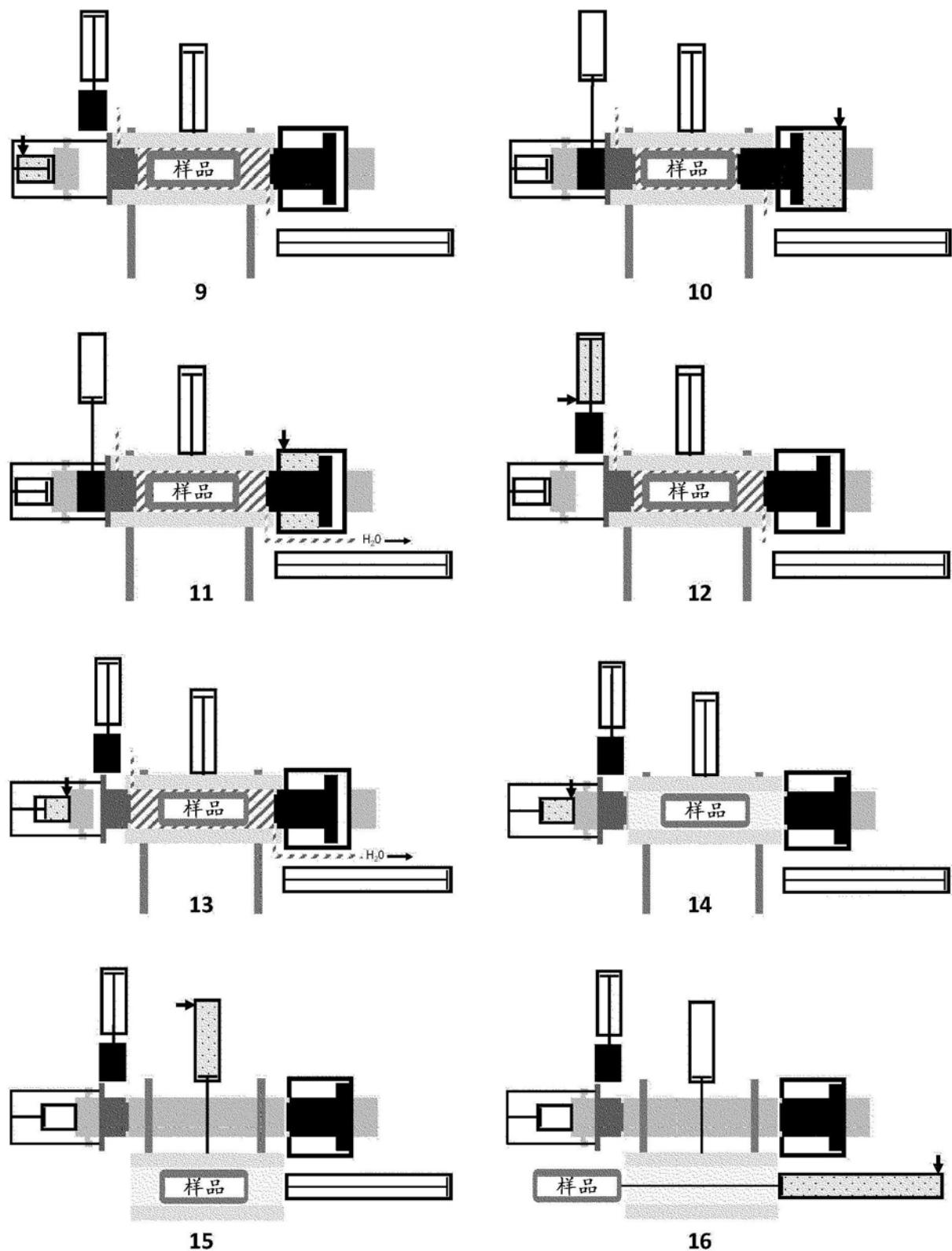


图6 (2/2)

高压设备安全操作程序

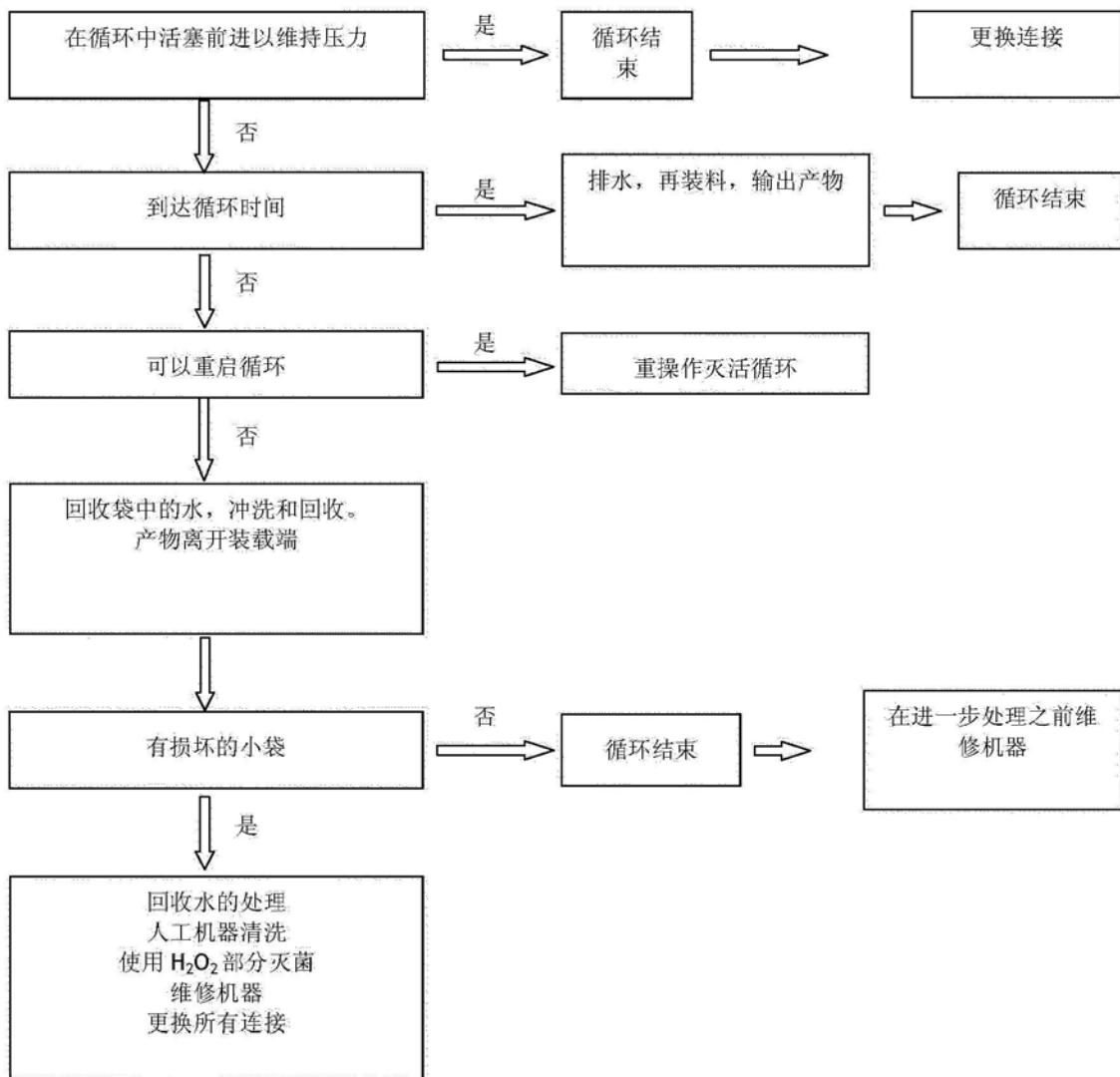


图7

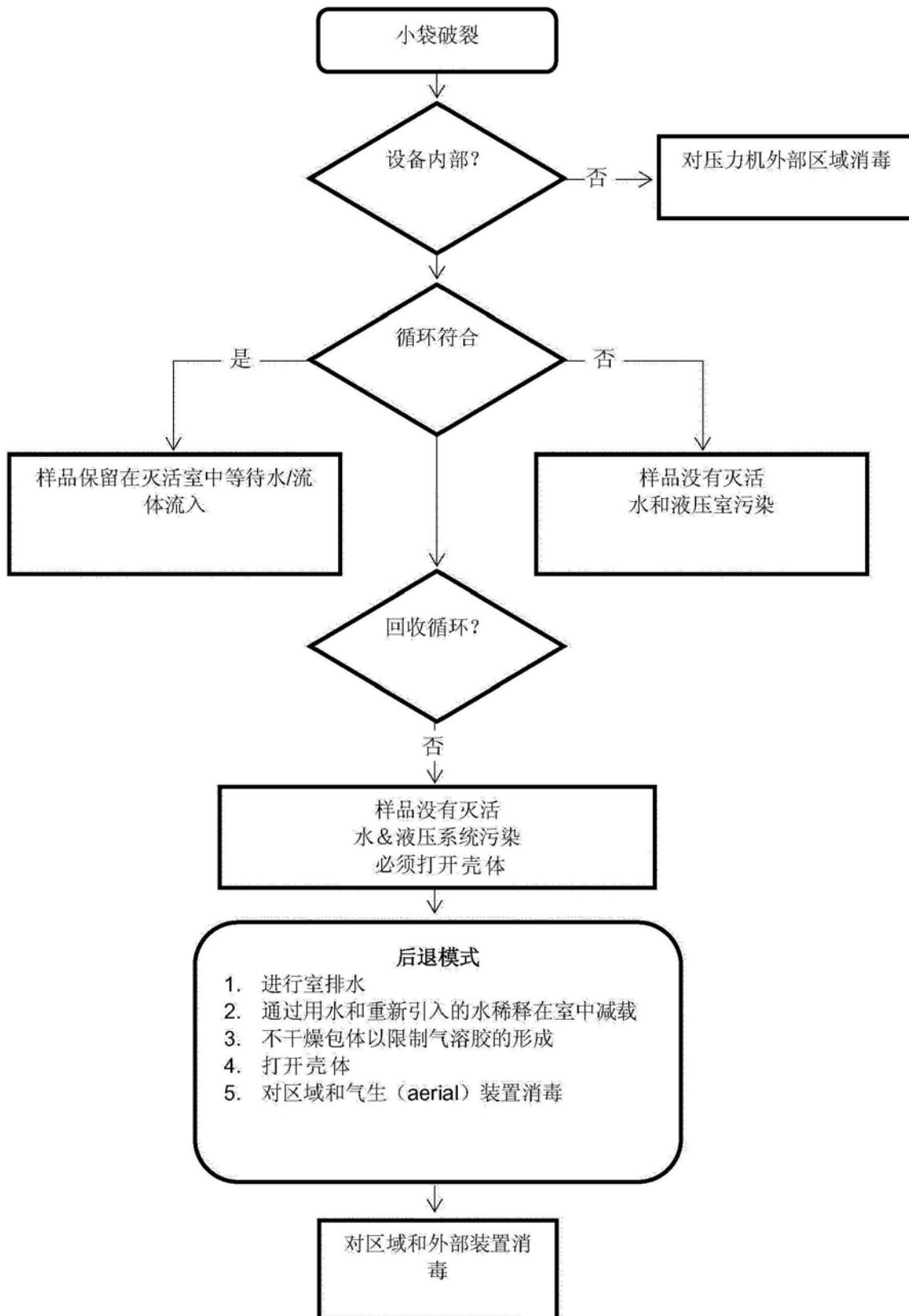


图8

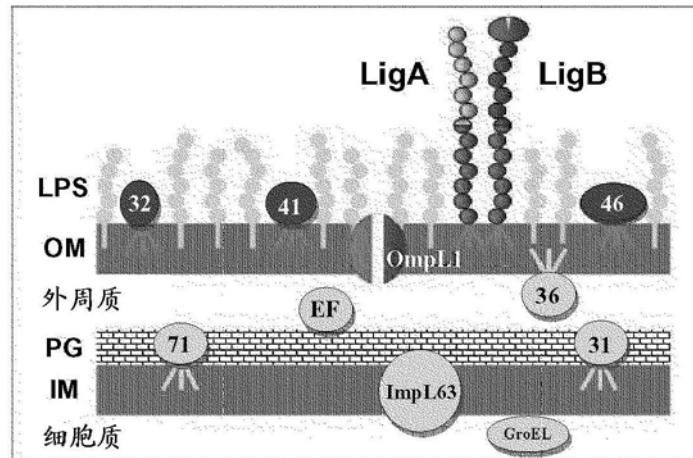


图9

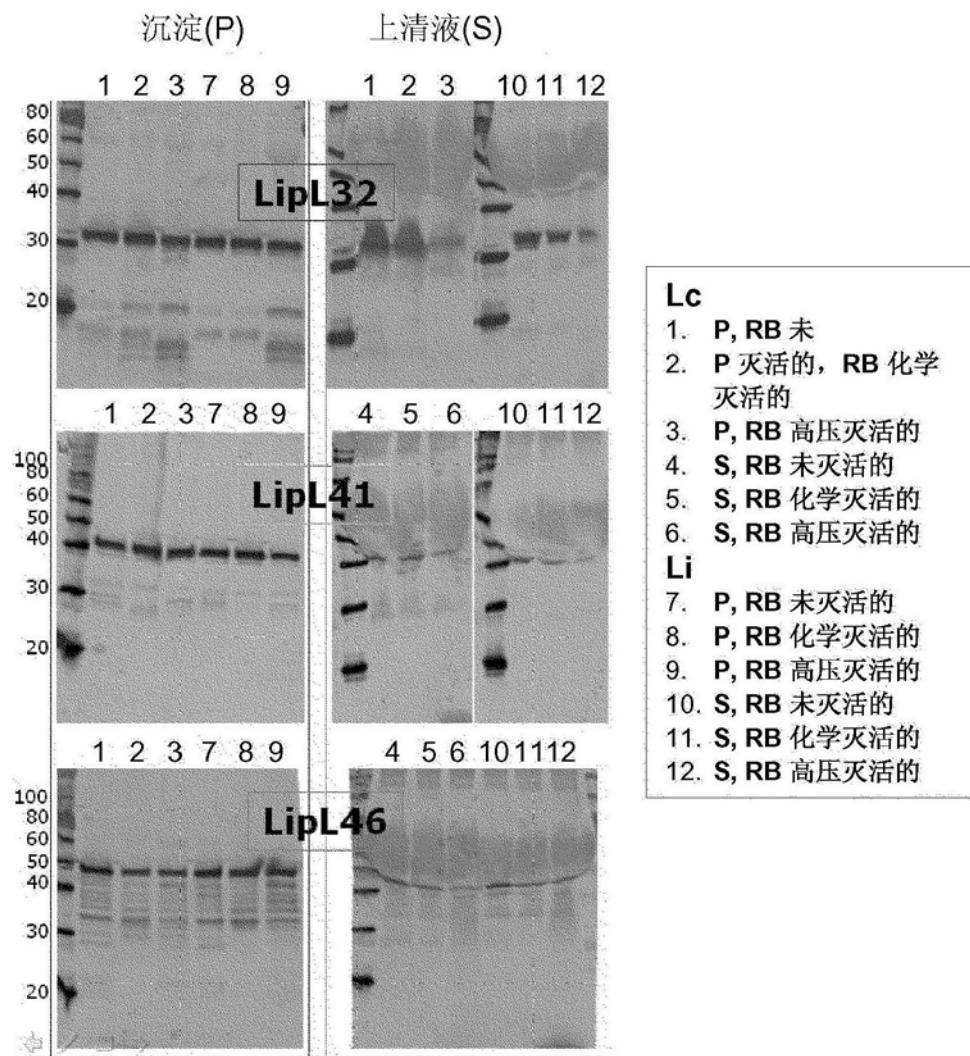


图10

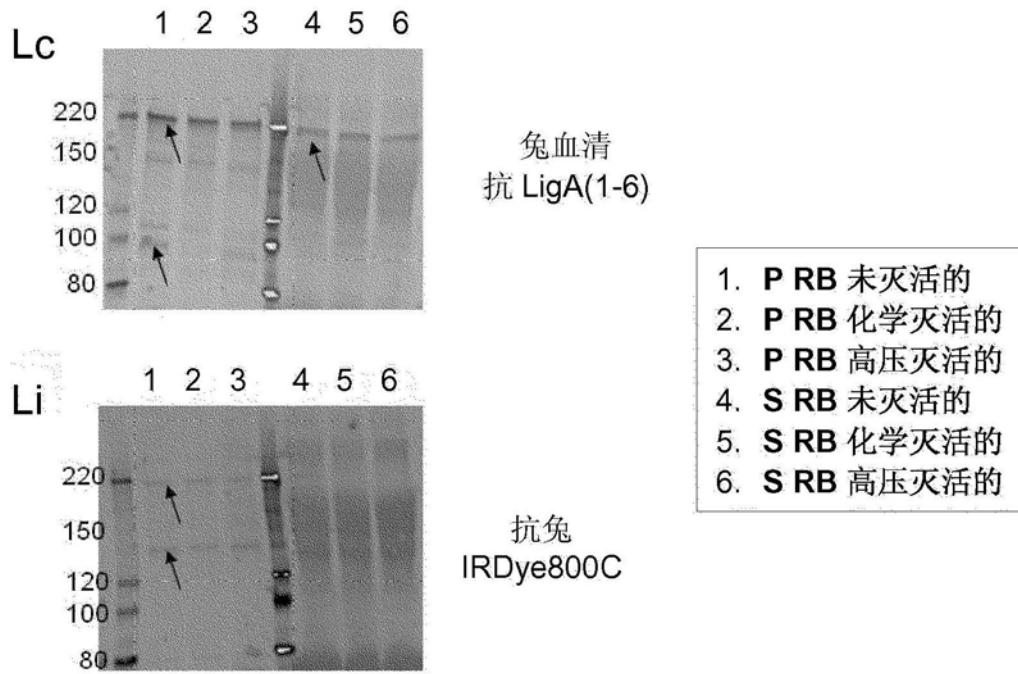
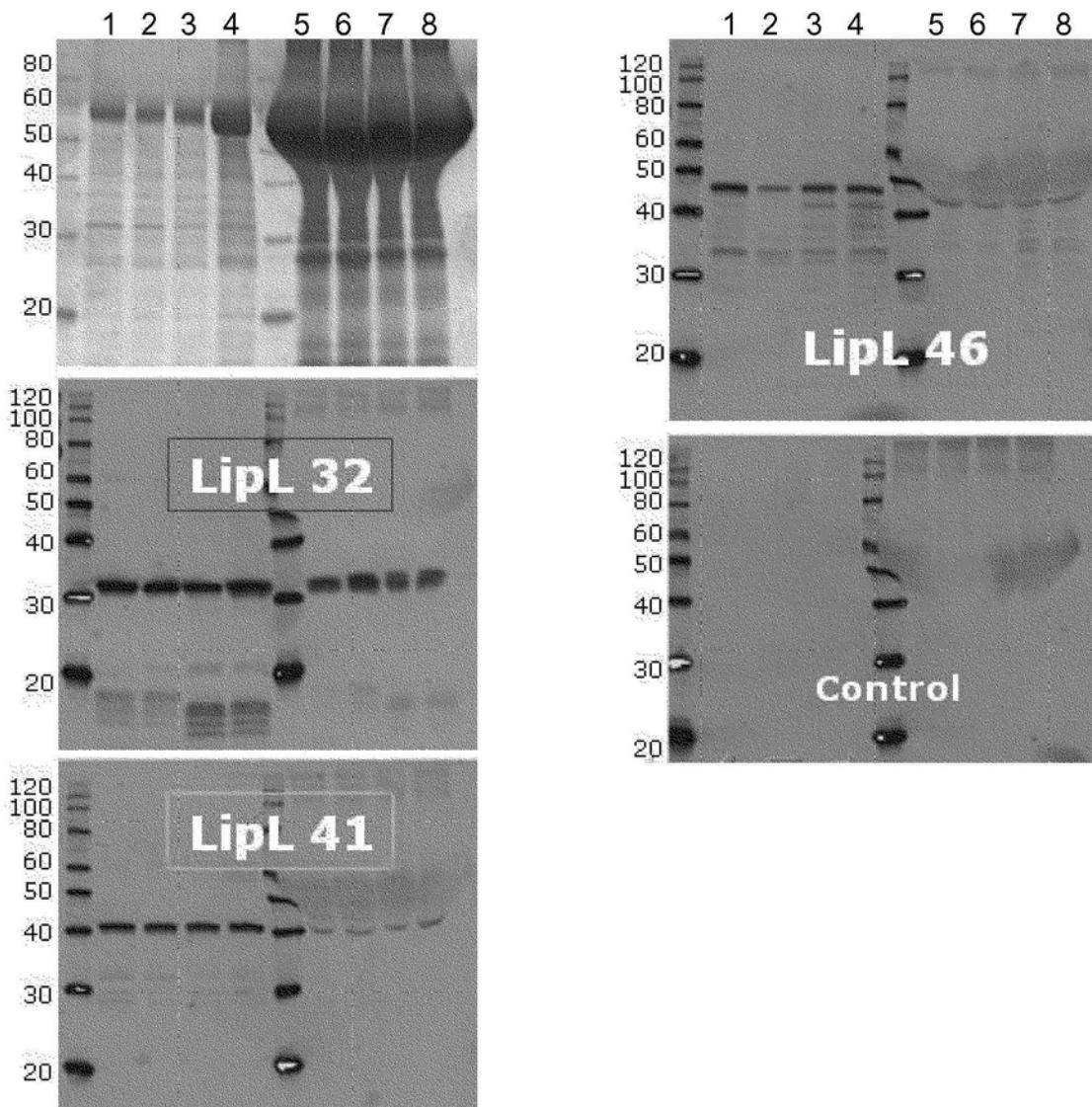


图11

**Lg**

1. P RB 未灭活的
2. P RB 化学灭活的
3. P RB 高压灭活的条件 1
4. P RB 高压灭活的条件 2

Lg

5. S RB 未灭活的
6. S RB 化学灭活的
7. S RB 高压灭活的条件 1
8. S RB 高压灭活的条件 2

图12

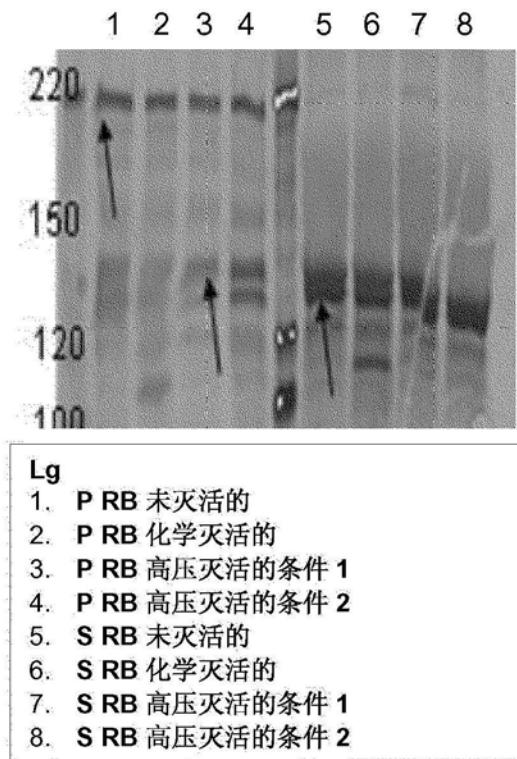


图13

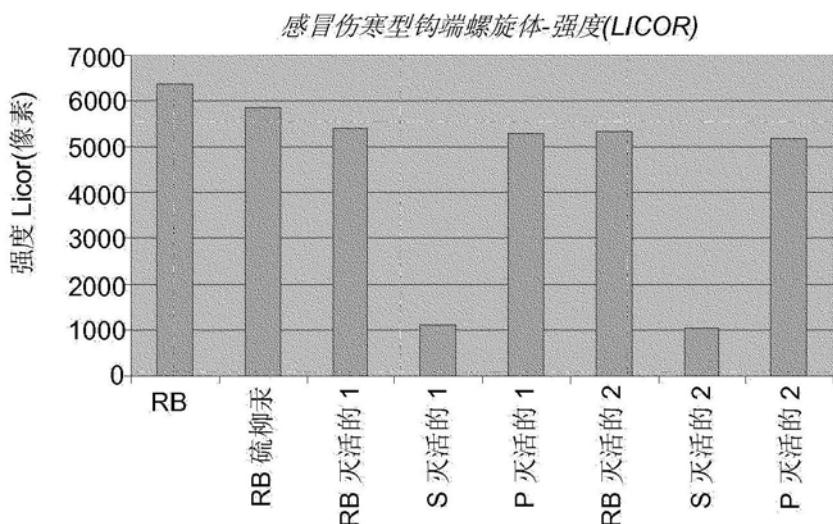


图14A

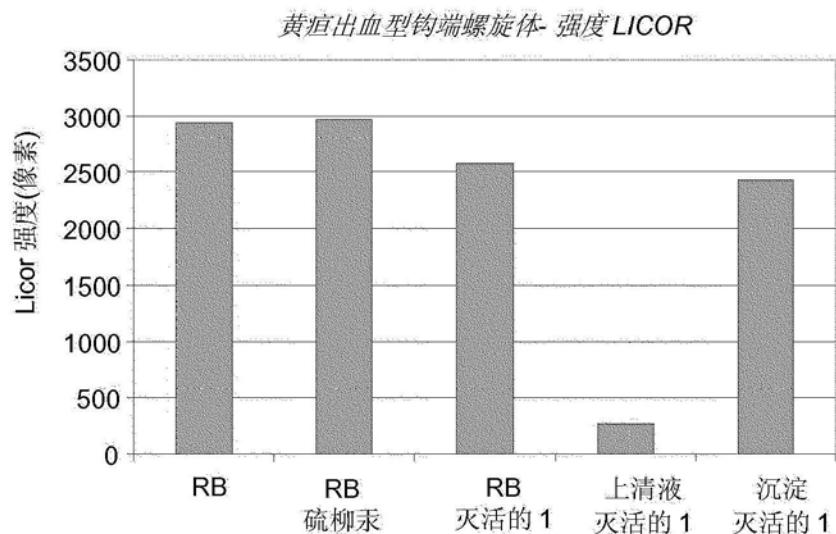


图14B

在不同温度和压力下60分钟后
的滴度 (\log_{10}/ml)

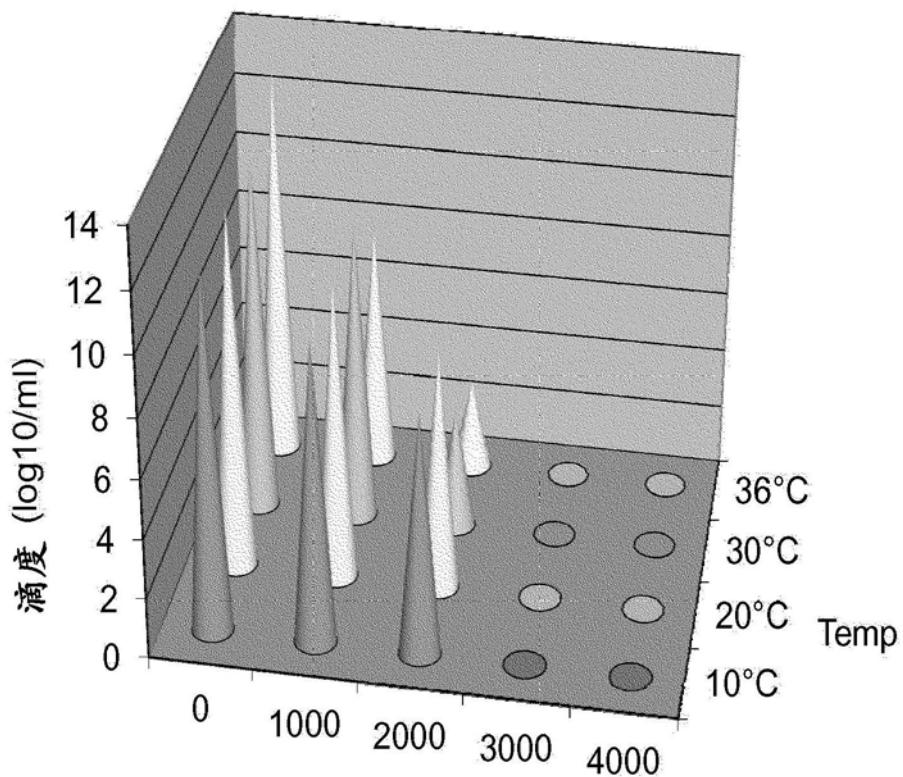


图15

使细菌经受特定的条件防止“恢复现象”

灭活条件	温育条件	11天温育之后的灭活
60 min. 3500 巴 37°C	+5°C	+
	环境	+
	37°C	+
30 min. 4000 巴 37°C	+5°C	-
	环境	+
	37°C	-
90 min. 4000 巴 37°C	+5°C	-
	环境	-
	37°C	-

灭活条件	灭活稳定性的持续时间	温育条件	灭活对照
90 min. 4000 巴 37°C 20X	D0	37°C	-
	没有恢复 (D5, D10, D17, D21)	+5°C	-
		环境	-
		37°C	-

图16

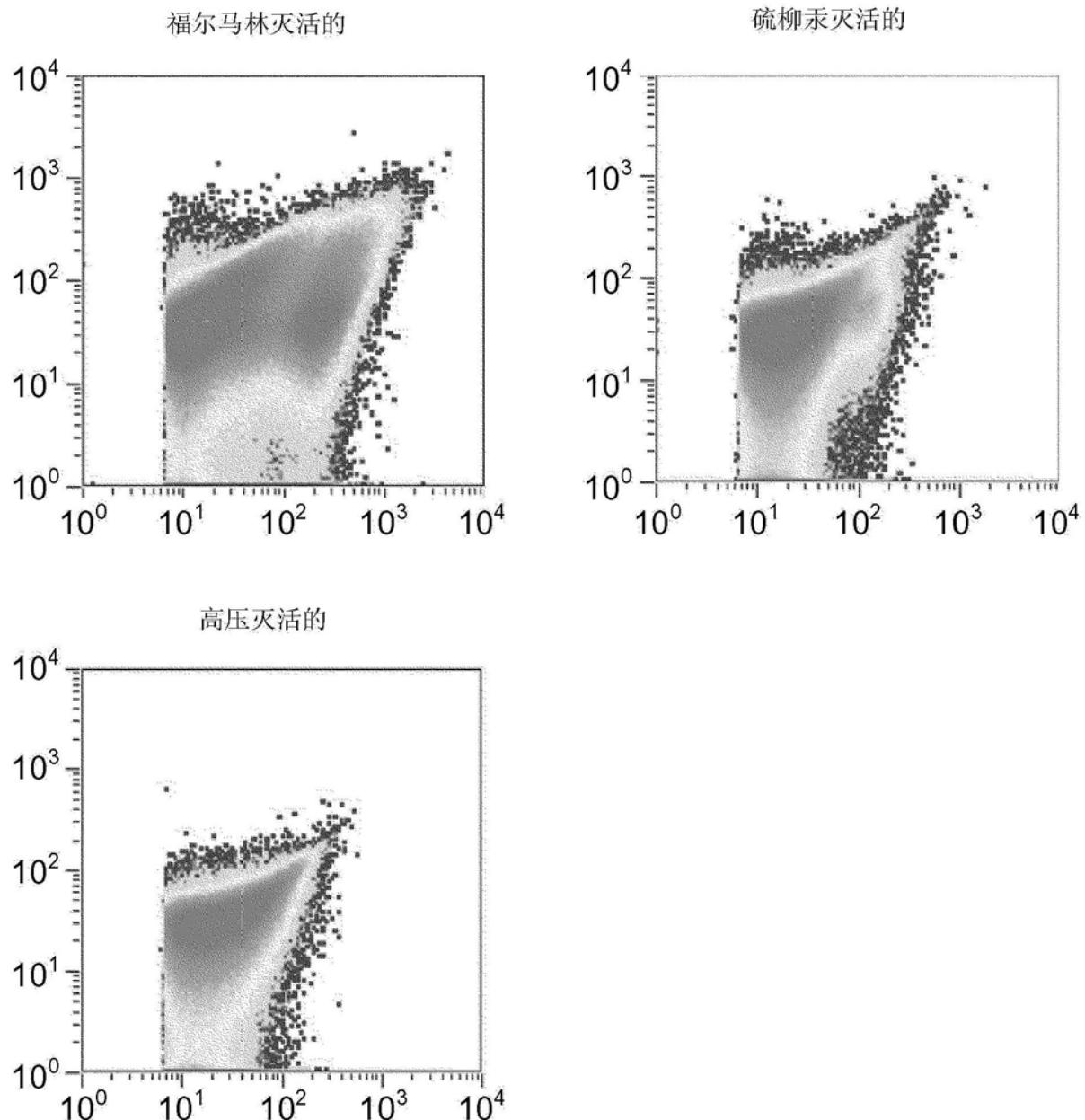


图17

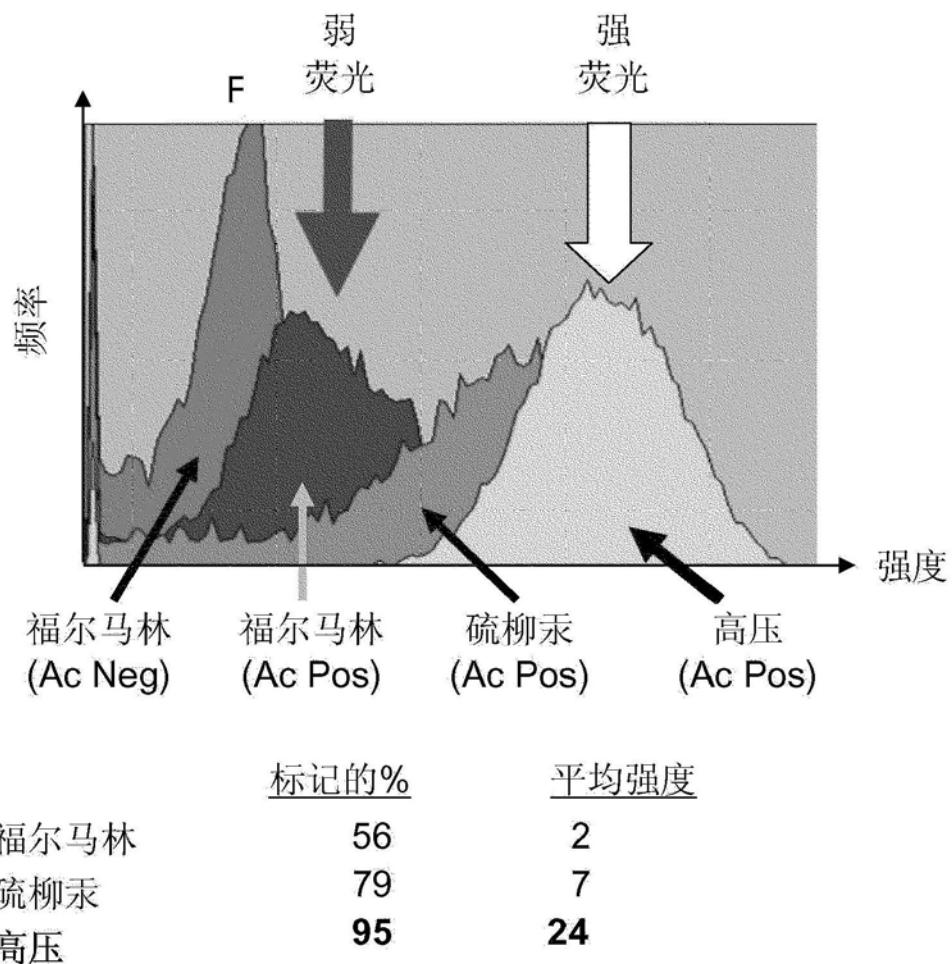


图18

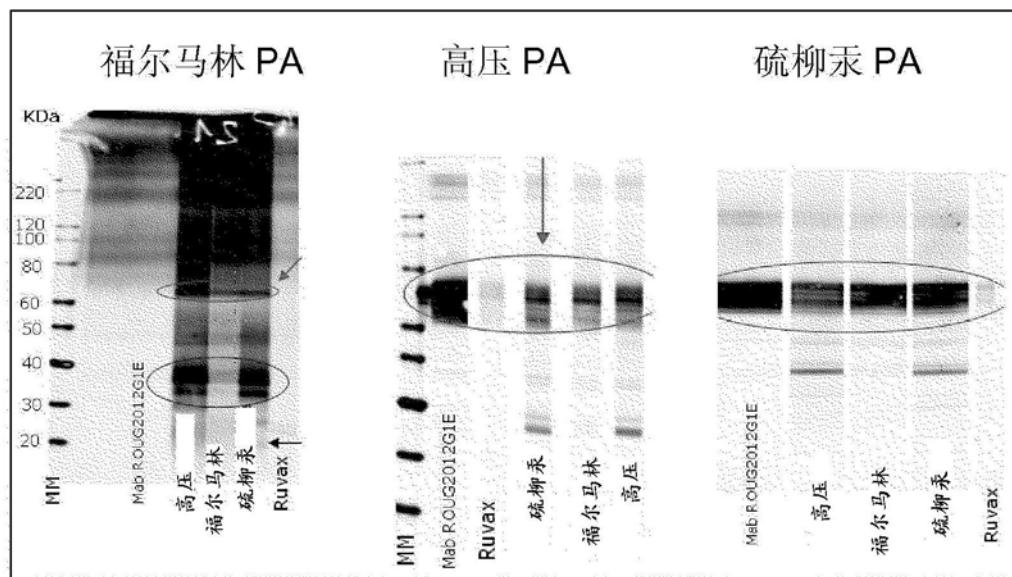


图19

组	小鼠的编号	疫苗	稀释度	保护率	ELISA 滴度
1	20	高压-灭活的	1/25	100%	3.35
2	20		1/50	90%	3.30
3	20		1/100	50%	3.09
4	20	福尔马林-灭活的	1/25	90%	3.42
5	20		1/50	90%	3.19
6	20		1/100	20%	2.76
7	20	硫柳汞-灭活的	1/25	90%	3.49
8	20		1/50	90%	3.10
9	20		1/100	60%	2.81
10	10	没有接种	-	0%	-

图20

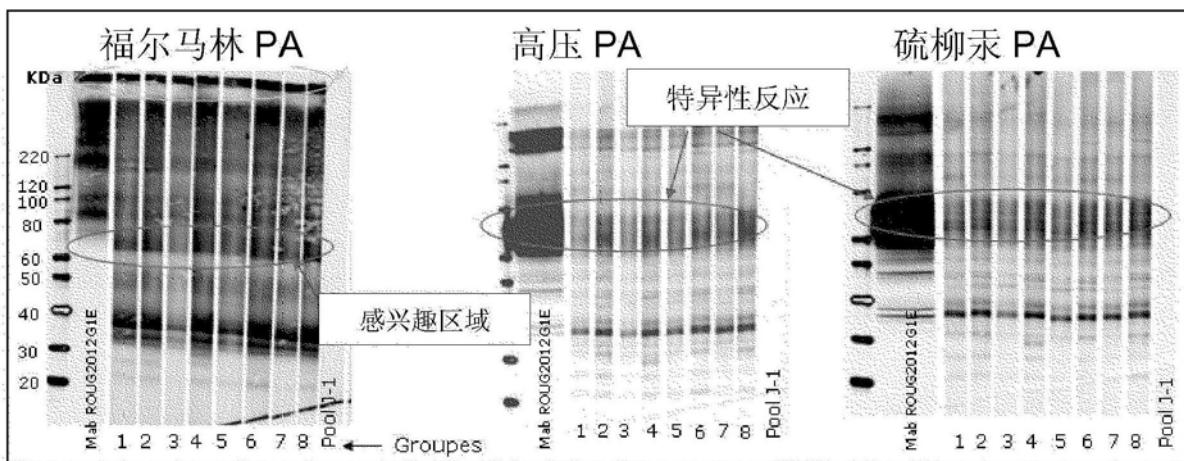


图21

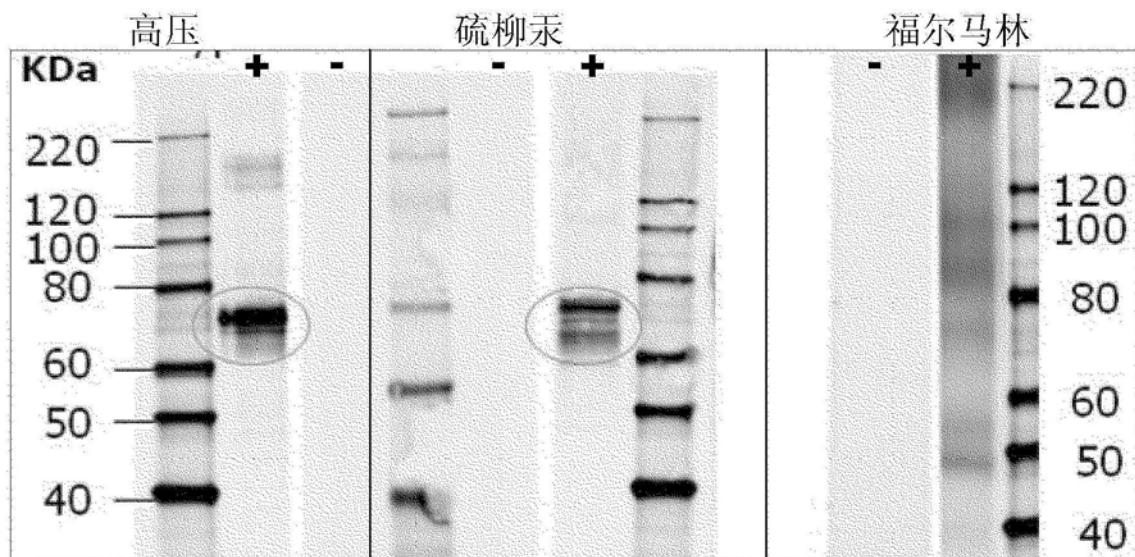


图22

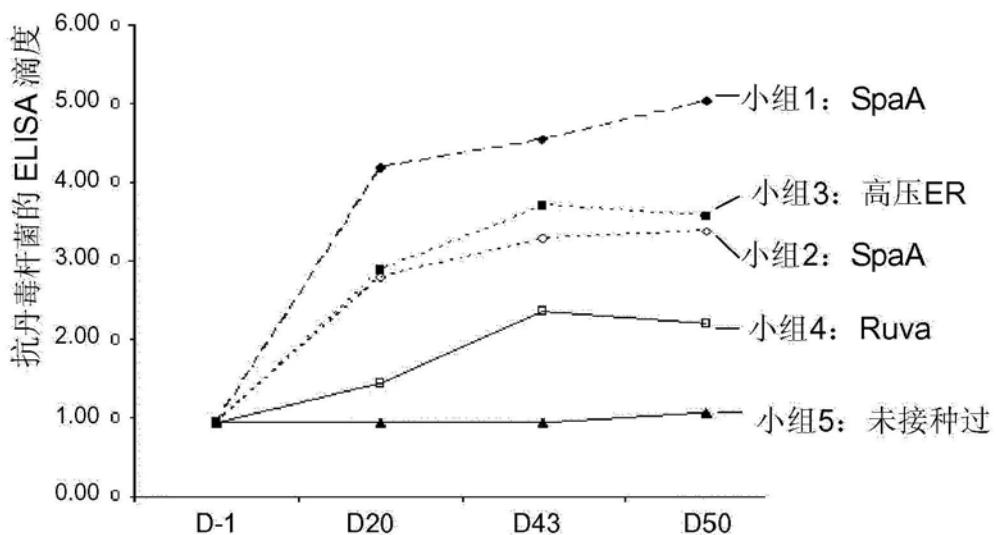


图23

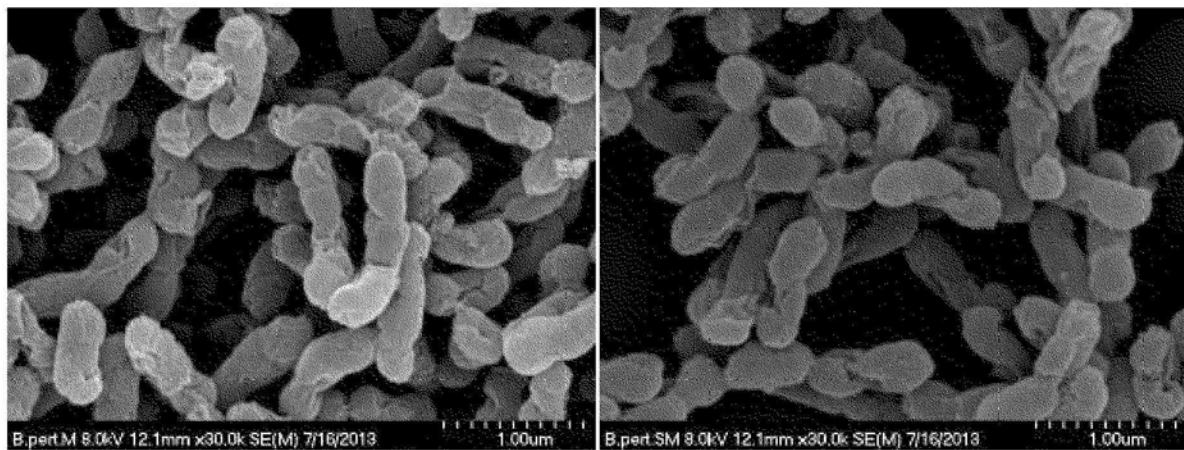


图24

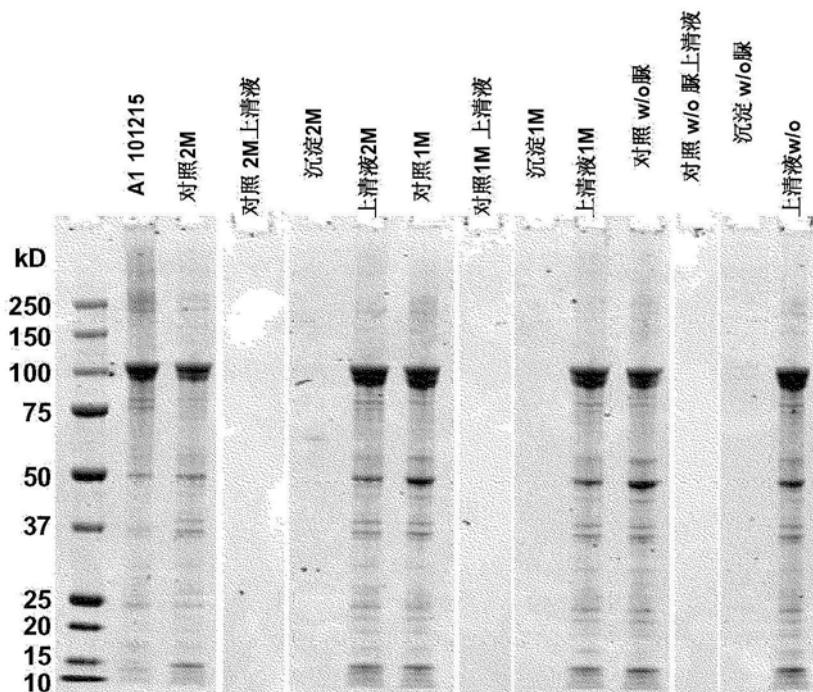


图25

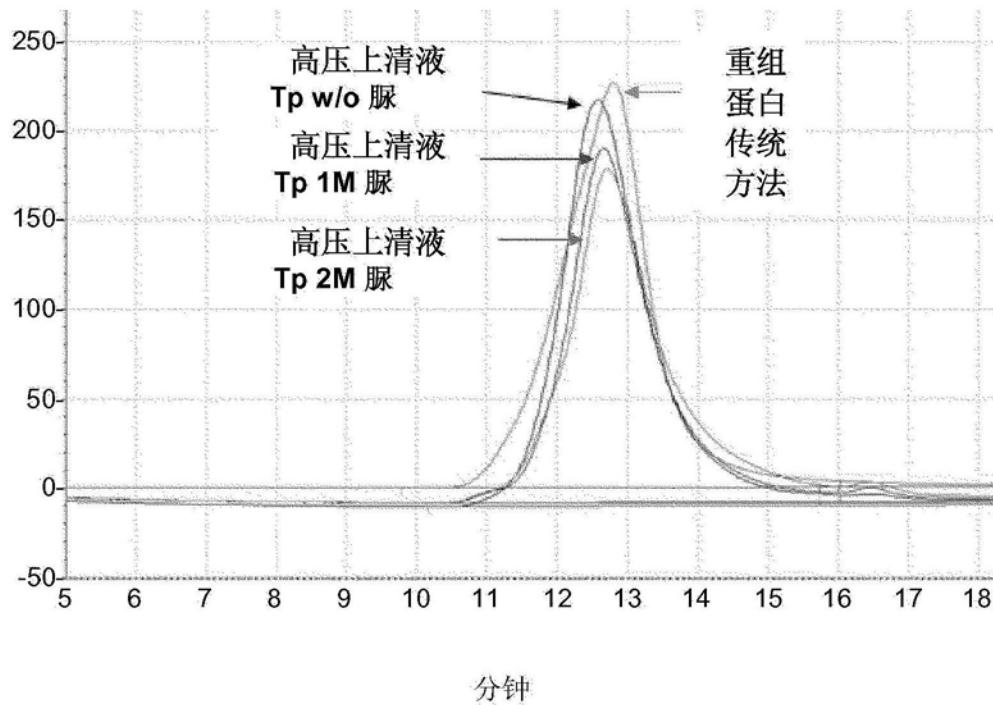


图26

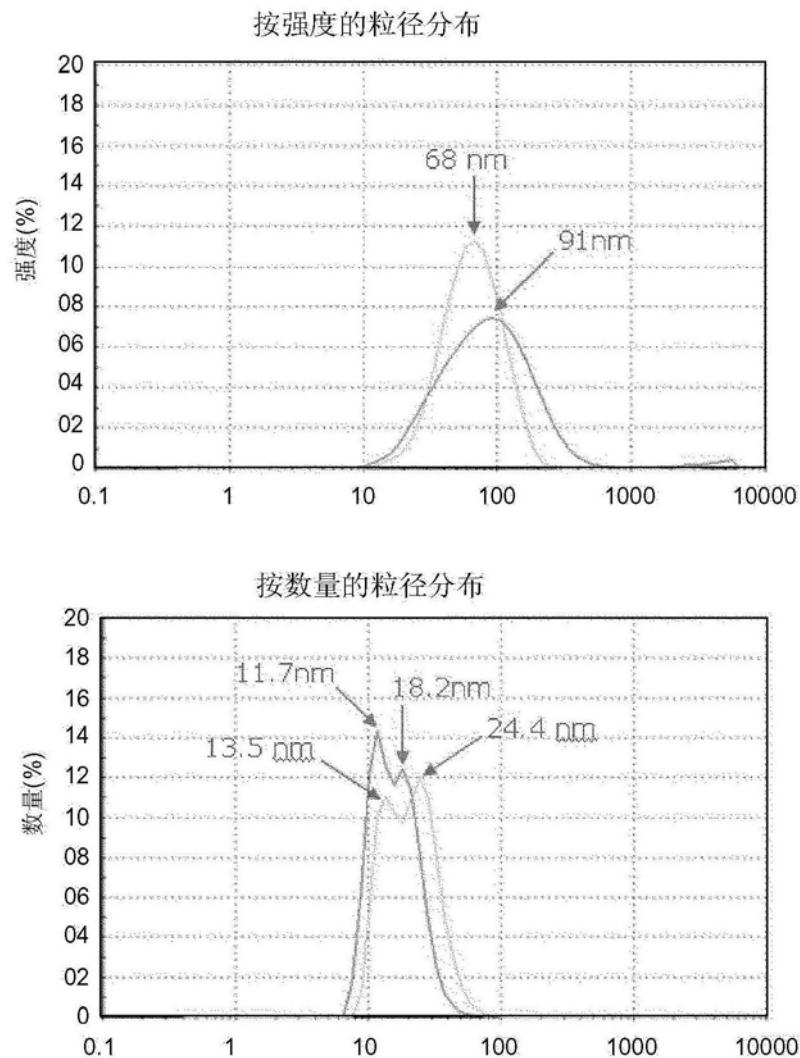


图27

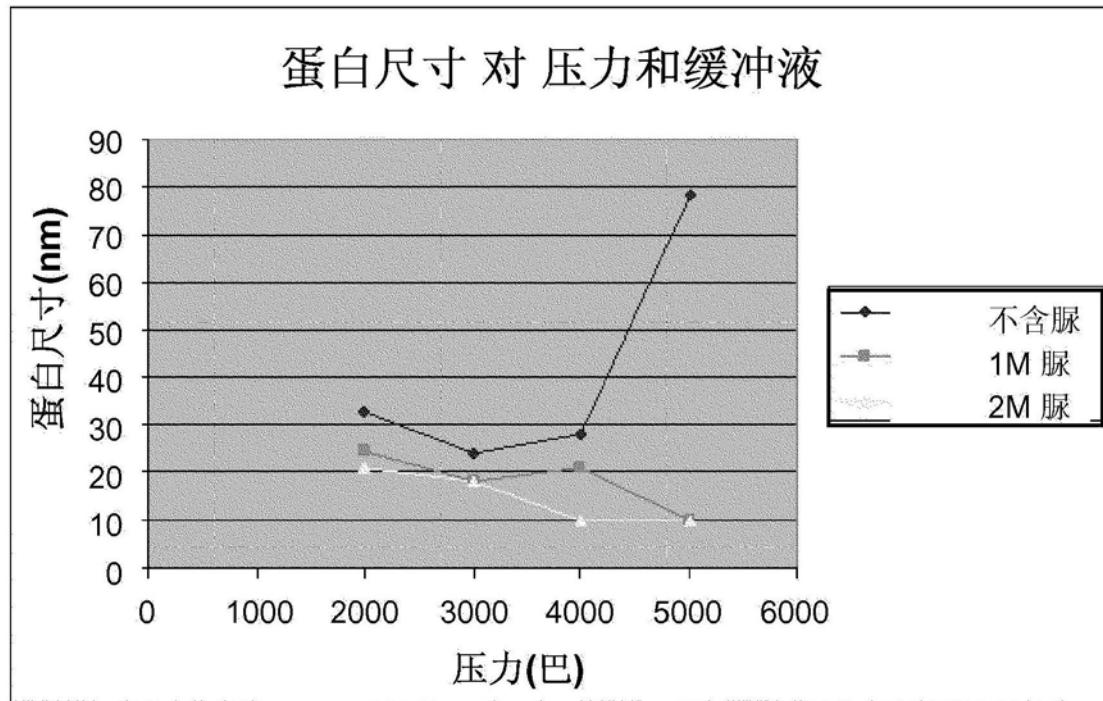


图28

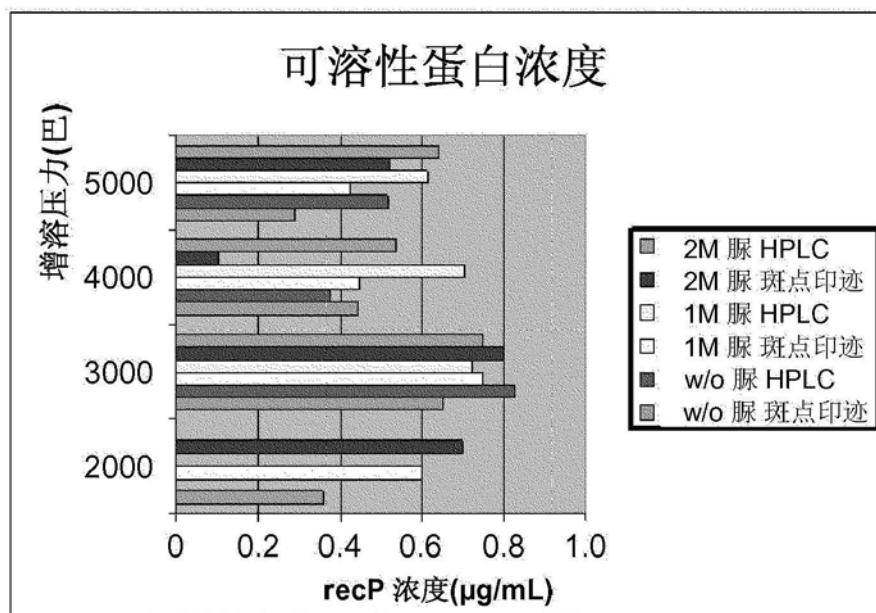


图29

通过方法 A 对 KSAC 蛋白的 QDot Blot 分析

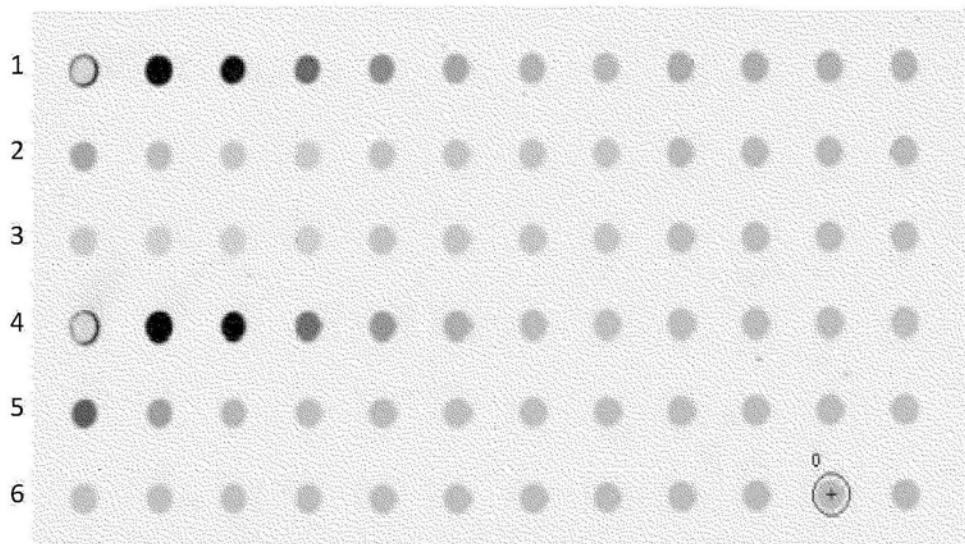


图30A

通过方法 B 对 KSAC 蛋白的 QDot Blot 分析

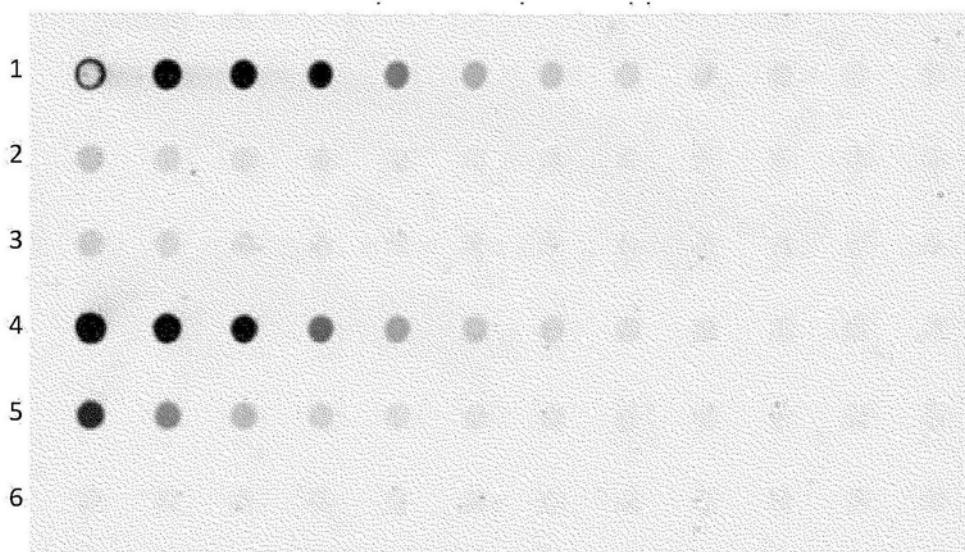


图30B

根据 QDot Blot 的 KSAC 蛋白量化

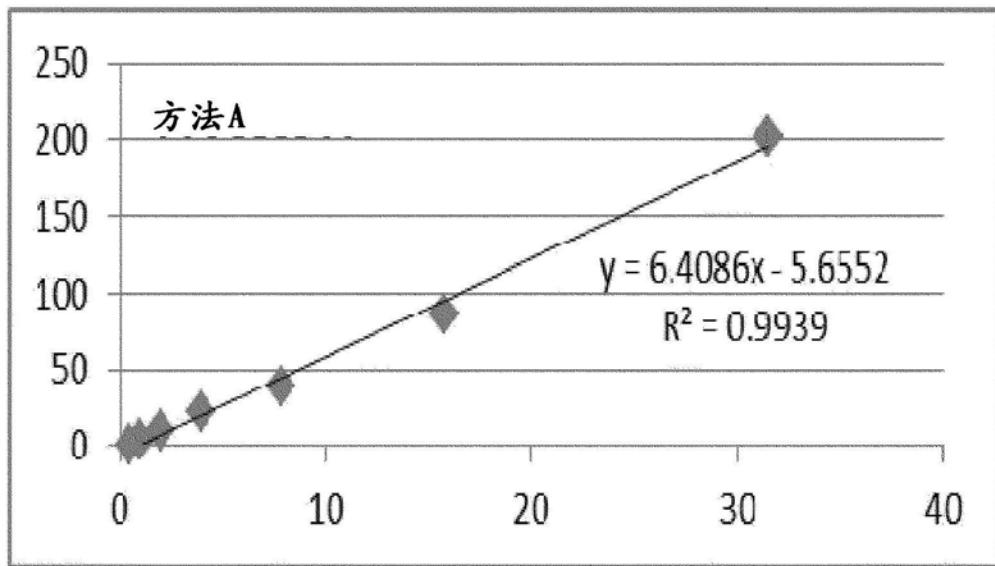


图30C

根据 QDot Blot 的 KSAC 蛋白量化

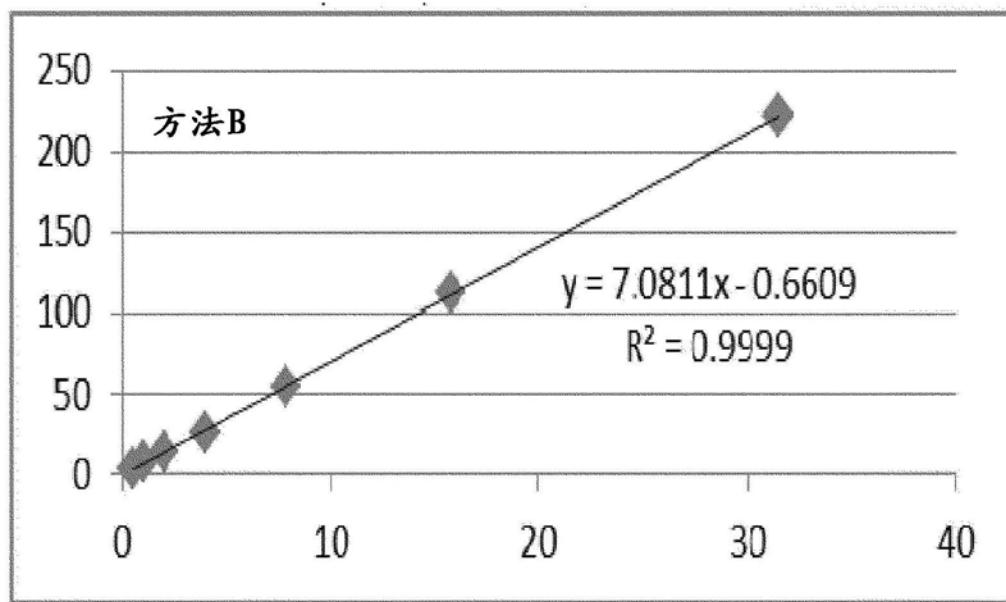


图30D

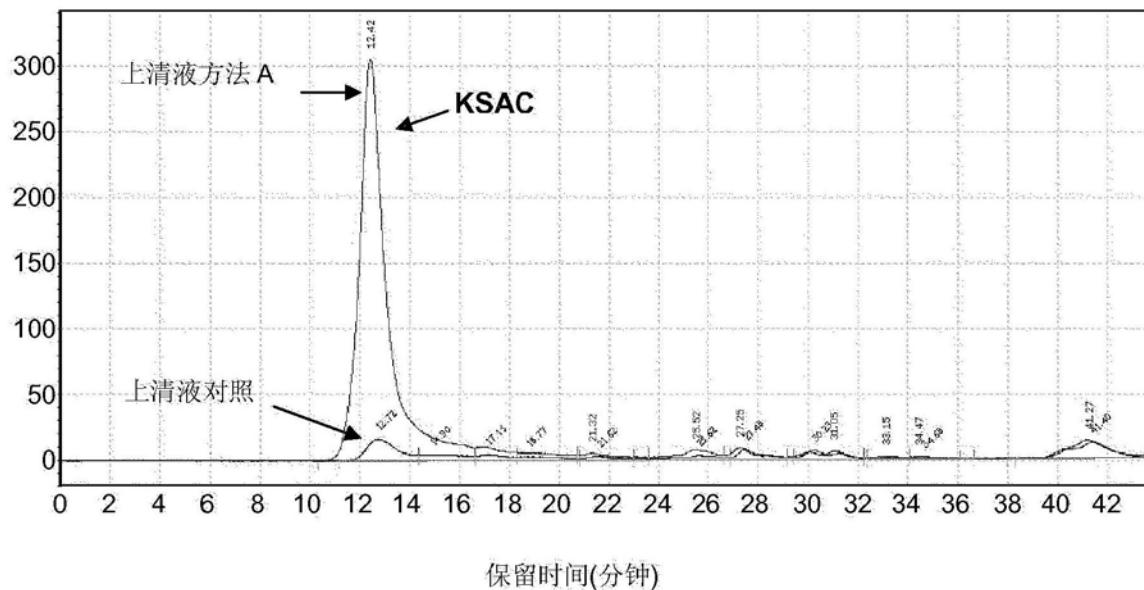


图31

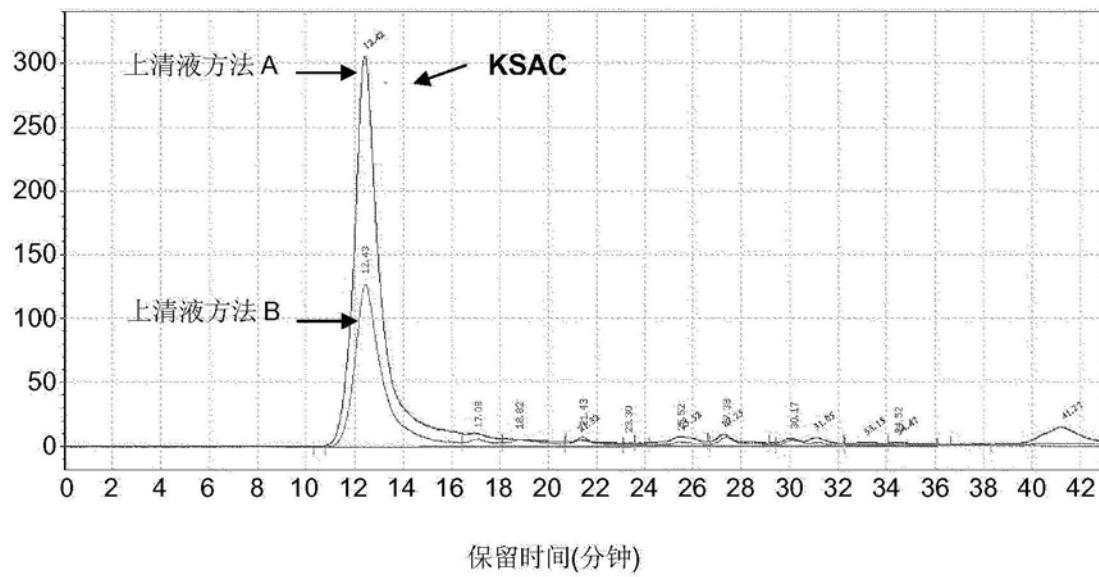


图32

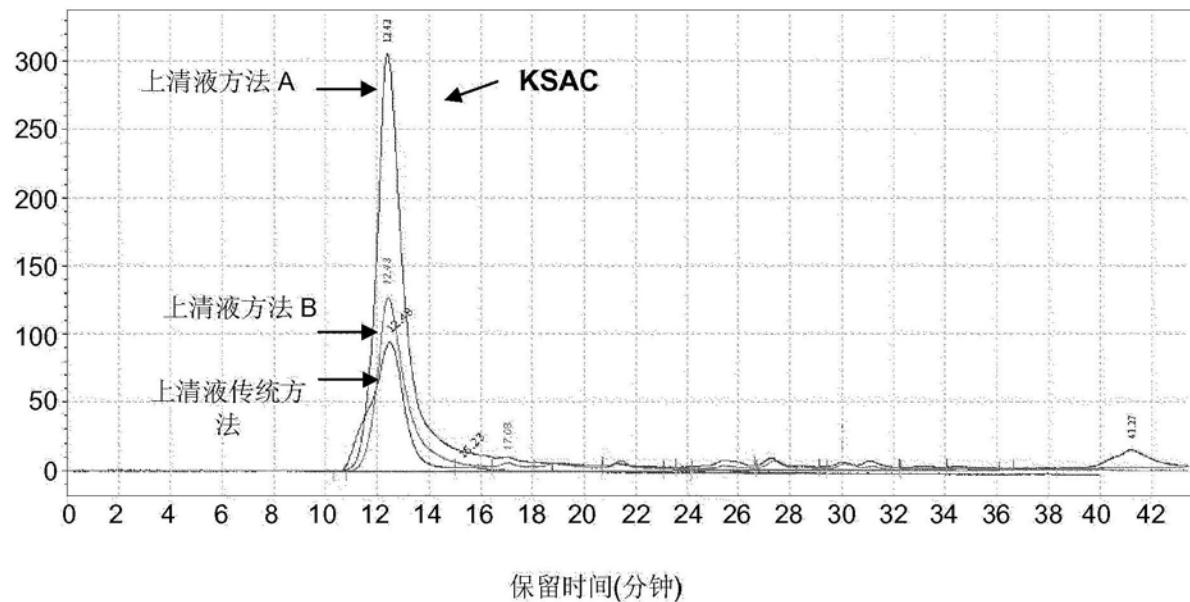


图33