



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 100849

(13) C2

(51) МПК

A61K 39/145 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2009 07428	(72) Винахідник(и):	Васмон Террі Лі (US), Гао Пенг (CN/US), Едді Бредлі Аллен (US), Абдельмагід Омар Юсіф (SD/US)
(22) Дата подання заявки:	14.12.2007	(73) Власник(и):	ШЕРІНГ-ПЛАУ ЛТД., Weystrasse 20, P.O. Box, CH-6000 Lucerne 6, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.02.2013	(74) Представник:	Шамріна Олена Олексіївна, реєстр. №141
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	60/875,287, 60/882,412	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US6344354 B1, 05.02.2002. JACQUELINE M KATZ ET AL: "ANTIGENIC AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF MULTIPLE SUBPOPULATIONS OF H3N2 INFLUENZA VIRUS FROM AN INDIVIDUAL" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 165, 1 January 1988 (1988-01-01), pages 446-456. GOVORKOVA E A ET AL: "AFRICAN GREEN MONKEY KIDNEY (VERO) CELLS PROVIDE AN ALTERNATIVE HOST CELL SYSTEM FOR INFLUENZA A AND B VIRUSES" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 70, no. 8, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 5519-5524. HORIMOTO ET AL: "Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, ELSEVIER CURRENT TRENDS, vol. 12, no. 11, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 506-514.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	15.12.2006, 28.12.2006		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.01.2010, Бюл.№ 1		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.02.2013, Бюл.№ 3		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2007/025636, 14.12.2007		

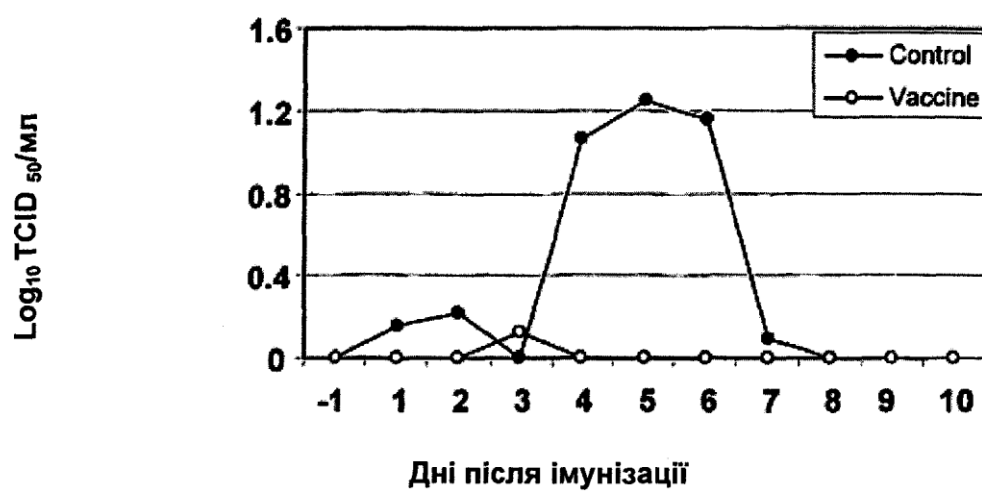
(54) СПОСІБ РЕПЛІКАЦІЇ ВІРУСУ ГРИПУ В КУЛЬТУРІ

(57) Реферат:

Винахід належить до способу селекції вірусу грипу для культивування на клітинах культури тканини з метою одержати вірусний ізолят, адаптований до культури тканини.

UA 100849 C2

Фіг.2 Пост-імунізаційне назальне виділення CIV



Галузь винаходу

Епідемії грипу та пандемії визнавалися протягом декількох сторіч і призвели до значної втрати життя. Вірус грипу є сегментованим РНК-вмісним вірусом, що належить родині Orthomyxoviridae. Епідемії і пандемії викликаються появою вірусів з новими компонентами оболонки, щодо яких є незначний імунітет у популяції. Ці нові компоненти є часто результатом мутації та/або змішування вірусів грипу людини і тварин.

Беручи до уваги, що капсид вірусу грипу трохи плеоморфний, зовнішня поверхня тверда для всіх вірусів і складається з ліпідної оболонки, з якої виконані видимі(випуклі) спайки(шипи) з глікопротеїну двох типів: гемаглютиніну (HA або H) і нейрамінідази (NA або N). Є три типи вірусів грипу: A, B і C. Тільки вірус грипу A додатково класифікується підтипом на основі двох головних поверхневих глікопротеїнів HA і NA. Підтипи вірусу грипу A додатково класифікуються штамми. Вірус грипу B інфікує тільки ссавців і викликає захворювання у людей, але взагалі не настільки серйозне, як тип A. Віруси грипу C також інфікують тільки ссавців, але викликають тільки дуже помірний респіраторний розлад у дітей. Вони є генетично та морфологічно відмінними від типів A і B.

Вірус грипу A інфікує широку розмаїтість тварин, включаючи ссавців, наприклад, людей, коней, собак, свиней, тхорів і птахів, наприклад, качки, курчата та індики. Відомі 16 HA серотипів і 9 серотипів NA. Птахи є особливо важливими резервуарами, що генерують пули генетично/антигенно різноманітних вірусів, які повертаються у людську популяцію через тісний контакт між людьми та тваринами. Свині є пермісивними щодо людських і пташиних штамів. Через цю незвичайну особливість свиней вважають "змішувальним резервуаром", що дозволяє генетичний обмін між пташиними та людськими вірусами, коли та ж сама клітина інфікована обома типами вірусу.

Геном вірусу грипу складається з єдиного ланцюга (-) РНК в 8 сегментах (7 у Грипі C). Структура генома відома більш детально через величезну кількість генетичного дослідження (звичайне і молекулярне), що було зроблене. Кожен сегмент кодує один або два вірусних протеїнів. Епідемії і пандемії, як вважають, відбуваються через генетичну зміну в HA і NA протеїнах вірусу грипу двома різними способами: антигенний дрейф та антигенна мутація. Антигенний дрейф постійно відбувається, тоді як антигенна мутація трапляється тільки іноді. Тип A вірусу грипу піддається обом видам змін; тип B вірусу грипу змінюється тільки більш поступовим процесом антигенного дрейфу.

Антигенний дрейф відноситься до незначних, поступових змін, які відбуваються внаслідок точкових мутацій у двох генах, які містять генетичний матеріал для продукування головних поверхневих протеїнів HA і NA. Антигенна мутація відноситься до різкої, головної зміни для продукування нового підтипу вірусу грипу A у людей, що у цей час не циркулював серед людей. Антигенна мутація може відбутися або безпосередньою трансмісією тварина (домашній птах) - людина, або через змішування людського грипу A і генів вірусу грипу A тварин, щоб створити новий людський підтип вірусу грипу A через процес, названий генетичною рекомбінацією. Антигенна мутація приводить до нового людського підтипу грипу A. Генетична рекомбінація відбувається, коли два різних віруси грипу інфікують ту ж саму клітину та використовується один або більше сегментів РНК. Якщо сегмент, що передається, є HA, наприклад, це може призвести до появи нового вірусного штаму, що є антигенно новим входом у популяцію з незначним імунітетом або без нього. Результат може привести до епідемії та/або пандемії.

Входження вірусів грипу в клітини полегшено, завдяки зв'язуванню HA спайок з мукопротеїнами, що містить кінцеву групу N-ацетил нейрамінової кислоти (NANA = сіалова кислота). Після зв'язування, частина піддається ендоцитозу через облямовані ямки в ендоцитозному пухирці і нарешті в ендосомах. Вони підкислені клітиною, рН приблизно 5,0, HA мономері розщеплені трипсиноподібними ензимами в ендосомах, щоб активізувати їх для інтерналізації. Після інтерналізації, відбувається вірусна реплікація, що приводить до симптомів грипу.

Є значне занепокоєння про недавні спалахи грипу. Серйозний тип респіраторного захворювання був ідентифікований у собак, що відбувається внаслідок вірусу собачого грипу (CIV). Це респіраторне захворювання, як виявилось, було дуже контагіозним. Крім того, CIV може викликати 100% інфекцію з 80% захворюваністю, і аж до 5-8 % смертності при серйозних інфекціях. Починаючи з його першого виявлення в 2004 у гончих мисливських собак (Crawford та ін., Science 310 (5747):482-485 (2005)), CIV швидко поширився у Сполучених Штатах, принаймні 25 штатів повідомили про спалах CIV, і двадцять сім штатів повідомили про домінування серотипу CIV.

Серотип CIV, що спричиняв недавній спалах є H3N8. Цей серотип CIV був спочатку виявлений у коней, і, як думають, перетнув видовий бар'єр у собак. Імовірно, що відсутність

ефективної вакцини проти вірусу собачого грипу відіграє головну роль у швидкій і широкій дисемінації у собак цього вірусу.

Вірус грипу А (H5N1, пташиний грип) - також названий "вірус H5N1" - підтип вірусу грипу А, що зустрічається головним чином у птахів, є дуже контагіозним серед птахів, і може бути летальним для них. Вірус H5N1 звичайно не інфікує людей, але інфекції із цими вірусами зустрічалися у людей. Дотепер, про більше, ніж 200 підтверджені випадки у людей, які привели до більше, ніж 150 смертельних випадків, повідомили в 10 країнах, головним чином в Азії. На щастя, все-таки, вірус не поширюється легко від птахів людям або від однієї людини до іншої. Однак, це може траплятися, так що в результаті епідемія або пандемія може відбуватися. Кращою стратегією для запобігання захворюваності й смертності, пов'язаної з епідемією або пандемією, є вакцинація.

У вакцин проти грипу, які тепер призначають людям, є високе співвідношення переваг-кошти в строках запобігання госпіталізацій і смертельних випадків, однак, щорічна продуктивність у світі для сезонної вакцини обмежена та реалістично не покриває глобально високо ризиковану популяцію. Існуючі вакцини одержані з яєць, використовуючи вірус, отриманий від Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я (ВОЗ) або Центру Контролю Захворювання (ЦКЗ), які забезпечують вірусний посів для одержання вакцини щороку. Зміни в НА циркулюючих вірусів (антигенний дрейф) вимагають періодичної заміни штамів вакцини під час інтерпандемічних періодів. ВОЗ видає піврічні рекомендації для штамів, які будуть включені для Північних і Південних Півкуль. Щоб дозволити достатню кількість часу для продукування, ВОЗ визначає в лютому, які вакцинні штами повинні бути включені у вакцину наступної зими. Взагалі, 1 доза для дорослих містить еквівалент 45 мкг НА (15 мкг кожного для 3 вірусів). Ця доза - приблизна кількість очищеного вірусу, отриманого з алантоїдної рідини одного інфікованого курячого ембріону. Якщо 100 мільйонів доз убитої вірусної вакцини грипу одержані, виробник повинен забезпечити 100 мільйонів курячих ембріонів. Це робить виробництво вакцини залежною від своєчасної придатності, гарної якості курячих ембріонів, й посівів штамів, наданих ВОЗ/ЦКЗ. Більшість прототипів посівів штамів легко не вирощується до високого титру навіть у яйцях з ембріоном, що розвивається. Щоб перебороти цю проблему, урядові заклади спочатку створюють лабораторні високопродуктивні штами, через класичну рекомбінацію з високопродуктивним A/PR/8/34 лабораторним штамом (на 6:2 рекомбінації, одержуючи 6 сегментів із штаму A/PR/8/34). На жаль, цей процес може бути важким для здійснення й може впливати на антигенність одержаної вакцини. Тому, існує потреба забезпечити альтернативні способи продукування вакцин, які захищають проти клінічних хвороб, викликаних грипом, особливо високо патогенними штамми, такими як H5N1. Крім того, залишається потреба забезпечити способи продукування більших кількостей рятувальних вакцин проти грипу в періоді часу, досить швидко, щоб ефективно запобігти можливим епідеміям та/або пандеміям. Представлений винахід відноситься до цієї і іншої потреб.

Цитата будь-якого посилення тут, не повинна бути розглянута як визнання, що таке посилення доступне як "попередній рівень техніки" для заявки, що розглядається в даний момент.

Короткий опис винаходу

Представлений винахід має відношення до вакцин для запобігання грипу А і В. Вакцини та пов'язані способи винаходу забезпечують багато переваг перед вакцинами та способами попереднього рівня техніки. Наприклад, вакцини винаходу одержані, використовуючи клітини культури тканини замість курячих ембріонів. Способи продукування за винаходом заощаджують критичний час, обходячи класичну процедуру виготовлення вакцини. Крім того, вакцини винаходу корисні для тих, які мають алергію на матеріал яйця. Представлений винахід також забезпечує нові імуногенні композиції, які можуть використовуватися у вакцинах. Ці нові імуногенні композиції можуть використовуватися, щоб імунізувати тварин, включаючи птахів, проти вірусу грипу. У специфічних втіленнях винаходу одержувач вакцини - ссавець. В одному аспекті, представлений винахід забезпечує вакцину, що захищає собак проти собачого респіраторного захворювання внаслідок вірусу собачого грипу (CIV). В іншому аспекті представлений винахід забезпечує вакцину, що захищає людей проти вірусних штамів грипу, природно одержаних внаслідок генетичної рекомбінації.

Винахід забезпечує штами вірусу грипу, які були специфічно адаптовані, щоб рости в клітинах культури тканини. У конкретному втіленні, адаптовані штами вірусу грипу відбирали за їх здатністю рости на вибраній лінії клітин культури тканини, використовуючи клонування граничного розведення. В одному конкретному втіленні відбирали субпопуляцію вірусу грипу, пристосованого до культивування на лінії культивованих клітин шляхом послідовних розведень в ряді аліквот, кількість вірусу грипу, що включає розмаїтість субпопуляцій грипу. Ряд аліквот

потім контактують та/або вирощують в лінії культивованих клітин. Субпопуляцію вірусу грипу в межах розмаїтості субпопуляцій грипу ідентифікували як таку, що росте на культивованих клітинах при низькій кратності інфікування (кратність інфікування (KI)) і відбирали як субпопуляцію вірусу грипу, що пристосована до культивування на лінії культивованих клітин. У пов'язаних втіленнях представлений винахід забезпечує способи, що включають взаємодію штаму пристосованого до культури тканин з клітинами культури тканин, ріст протягом достатнього часу, для одержання цитопатичних ефектів (CPE). Цей спосіб може також включати збір вірусів грипу. У деяких таких втіленнях процес клонування граничного розведення включає серійне розведення штаму вірусу грипу та взаємодію кожного розведення з культивованими клітинами, культивування клітин протягом достатнього часу, для одержання цитопатичних ефектів (CPE), збір вірусу від найвищого розведення, що викликає CPE, і повторення процесу із зібраним вірусом. У деяких втіленнях спосіб також включає змішування штаму вірусу грипу з ефективною кількістю трипсину перед взаємодією з культивованими клітинами. У деяких втіленнях суміш інкубували протягом достатнього часу, щоб дозволити трипсину розщеплювати вірусні протеїни, не відокремлюючи клітини від субстрату. Трипсин, використовуваний для того, щоб розщеплювати вірусні протеїни, може бути типом IX трипсину. У деяких випадках, стадія взаємодії штаму пристосованого до культури тканини з клітинами культури тканини здійснюють при кратності інфікування (KI) менше, ніж приблизно 0,01, включаючи менше, ніж приблизно 0,001 та/або менше, ніж приблизно 0,0001. В інших випадках штаму вірусу грипу спочатку тестували на клітинах культури тканини, щоб визначити оптимальну кратність інфікування (KI). Клітини культури тканини можуть бути клітинами ембріональної нирки ссавця такими як клітини ембріональної нирки людини. Вірус грипу може бути вірусом грипу А, В або С. В одному конкретному втіленні вірус грипу А є штамом H5N1. Штаму вірусу грипу може бути отриманий з будь-якого числа джерел, включаючи назальний мазок, тканини легенів, і/або може бути наданий третьою особою, наприклад, ВОЗ. У деяких втіленнях штаму вірусу грипу спочатку був культивований у яйцях з ембріоном, що розвивається, щоб одержати великий інокулят для адаптації до культури тканини. Деякі способи включають очищення зібраного вірусу. В одному такому способі стадію очищення виконували, використовуючи ексклюзійно-гранулометричну хроматографію. Способи винаходу можуть також включати змішування другого штаму вірусу грипу з першим штамом до, під час або після очищення, таким чином, що другий штаму є відмінним від першого. У деяких способах дослідження титрування дози виконані до змішування двох вірусних штамів, щоб визначити суміш, що надає еквівалентну імуногенність вірусних протеїнів. У деяких способах інактивованій грип. У деяких втіленнях цього типу, вірус грипу обробляють кількістю бінарного етиленіміну, ефективного для інактивації. У деяких способах збір здійснюють, коли вміст гемаглютиніну максимальний.

Подальші втілення включають вакцину, одержану збиранням вірусного штаму, одержаного способом селекції вірусу грипу для культивування на клітинах культури тканини, титруючи штаму вірусу грипу, використовуючи клонування граничного розведення таким чином, що відбирають штаму вірусу грипу, що адаптований до клітин культури тканини. У деяких втіленнях вірус одержаний інокуляцією певними патогенами курячого ембріону шляхом інокуляції хоріон-алантоїдної (також називаною алантоїдною порожниною) або амніотичної мембрани перед клонуванням граничного розведення. В одному втіленні вірус грипу реплікується спочатку інокуляцією через амніотичну мембрану курячих ембріонів, щоб одержати інокулят для адаптації до клітин культури тканини.

Крім того, винахід забезпечує способи селекції вірусу грипу для культивування на людських клітинах ембріональної нирки. В одному такому способі штаму вірусу грипу титрували, використовуючи клонування граничного розведення таким чином, що штаму вірусу грипу, що адаптований до клітин НЕК був вибраний. Цей спосіб може включати взаємодію НЕК-пристосованого штаму з клітинами НЕК і ріст клітин протягом достатнього часу для одержання цитопатичних ефектів (CPE). У конкретному втіленні цього типу, одержаний вірус грипу був зібраний. Винахід також забезпечує вакцину, що включає штаму вірусу грипу, отриманий цими способами. Спосіб може також включати змішування штаму вірусу грипу з ефективною кількістю трипсину IX типу перед взаємодією з культивованими клітинами, протягом достатнього часу, щоб дозволити трипсину розщеплювати вірусні протеїни, не відокремлюючи клітини від субстрату. В одному втіленні, стадія взаємодії НЕК-пристосованого штаму з клітинами НЕК виконана при кратності інфікування (KI) менше, ніж приблизно 0,001.

У деяких втіленнях винахід додатково забезпечує вакцини, що включають вірус людського грипу, утворені при менше, ніж 4 мкг НА людського грипу на дозу. У подібному втіленні винахід забезпечує вакцини, що включають вірус людського грипу, утворені при менше, ніж 3 мкг НА людського грипу на дозу. В іншому втіленні винахід забезпечує вакцини, що включають вірус

людського грипу, утворені при менше, ніж 2 мкг НА людського грипу на дозу. В усі ще іншому втіленні винахід забезпечує вакцини, що включають вірус людського грипу, утворені при 1,5-3,5 мкг НА людського грипу на дозу. У специфічних втіленнях вакцини ад'ювантом є ISCOM. В інших втіленнях вакцини принаймні 70 % вірусів включають НА, що має ту ж саму амінокислотну послідовність. В усе ще інших втіленнях вакцини, принаймні 80 % вірусів включають НА, що має ту ж саму амінокислотну послідовність. В усе ще інших втіленнях вакцини, принаймні 90 % вірусів включають НА, що має ту ж саму амінокислотну послідовність. В усе ще інших втіленнях вакцини, більше ніж 95 % вірусів, включають НА, що має ту ж саму амінокислотну послідовність.

Представлений винахід додатково забезпечує комбіновані вакцини для надання імунного захисту проти вірусу грипу, наприклад, вірусу собачого грипу (CIV) і інших хвороб, наприклад, інших собачих інфекційних хвороб. Представлений винахід додатково передбачає спосіб імунізації ссавця, наприклад, собаки, кішки, або коня проти грипу. Способи створення та використання вакцин при інфекційних захворюваннях, наприклад, собачих інфекційних захворюваннях також надані.

У конкретному втіленні імуногенна композиція представленого винаходу включає імуногенну композицію, що містить інактивованій CIV H3N8 і ад'ювант. Як правило, ад'ювант включає емульсію масло-вода. В одному такому втіленні ад'ювант додатково включає гідроксид алюмінію. У конкретному втіленні цього типу ад'ювантом є Emunade®. В іншому втіленні імуногенна композиція є вакциною.

Вакцинна композиція може включати приблизно від 100 одиниць гемаглютинації (HAU) до приблизно 1500 HAU на дозу. Це може широко варіюватися залежно від розміру та інших міркувань щодо здоров'я і індивідуально отриманого лікування. Композиція звичайно містить між 250 і 750 HAU на дозу. В одному втіленні вакцинна композиція включає приблизно 500 HAU на дозу.

Довільно, вакцини представленого винаходу можуть також включати фармацевтично прийнятний імуностимулятор, наприклад, цитокіни, фактори росту, хемокини, супернатанти від клітинних культур лімфоцитів, моноцитів, або клітин від лімфатичних органів, клітинні препарати та/або екстракти з рослин, бактерій або паразитів, або мітогенів.

Вакцини представленого винаходу можуть вводитися шляхами, такими як: парентеральне введення, внутрішньом'язова ін'єкція, підшкірна ін'єкція, перитонеальна ін'єкція, інтрадермальна ін'єкція, оральне введення, інтраназальне введення, скарифікація та їх комбінації. У переважному втіленні винаходу вакцину вводять внутрішньом'язовою ін'єкцією.

Винахід також забезпечує сироватку, отриману із вакцинованої тварини, що містить антитіла, які зв'язуються із CIV H3N8 та очищені антитіла безпосередньо. У конкретному втіленні винаходу очищене антитіло, що зв'язується з CIV H3N8, є химерним антитілом.

Представлений винахід додатково забезпечує комбіновані вакцини, які включають один або більше штамів інактивованого CIV, наприклад, CIV H3N8, у комбінації з одним або більше іншими собачими патогенами та/або імуногенами, включаючи, наприклад, імуногени для забезпечення імунітету щодо наступних: вірус собачої чуми; собачий аденовірус; собачий аденовірус тип 2; собачий парвовірус; вірус собачого парагрипу; собачого коронавірусу; вірус собачого грипу; і/або серовари *Leptospira*, наприклад, *Leptospira kirschneri*, серовар *grippotyphosa*, *Leptospira interrogans*, серовар *canicola*, *Leptospira interrogans icterohaemorrhagiae*, і/або *Leptospira interrogans*, серовар *romona*. Додаткові собачі патогени, які можуть бути додані до комбінованої вакцини представленого винаходу, включають *Bordetella bronchiseptica*; *Leishmania*, такі як *Leishmania major* й *Leishmania infantum*; види *Borrelia spirochetes*, включаючи *B. burgdorferi sensu stricto* (ss), *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, і *B. afzelii*; види *Mycoplasma* (наприклад, *Mycoplasma cynos*); вірус сказу; і *Ehrlichia canis*.

Представлений винахід передбачає способи культивування CIV H3N8 у культивованих клітинах. У деяких втіленнях культивовані клітини - несобачі ниркові клітини. В одному втіленні клітини - Madin-Darby клітини бичачих нирок (MDBK). В іншому втіленні клітини - клітини Vero.

У деяких втіленнях винахід додатково забезпечує вакцини, що включають CIV H3N8 утворений при менше, ніж 500 HAU на дозу. У цих втіленнях ад'ювантом є звичайно гідроксид алюмінію, і принаймні 70 %, звичайно принаймні 90 % НА має ту ж саму амінокислотну послідовність. В інших втіленнях вакцини принаймні 80 % вірусів включають НА, що має ту ж саму амінокислотну послідовність. В усе ще інших втіленнях вакцини, більше, ніж 95 % вірусів включають НА, що має ту ж саму амінокислотну послідовність.

Ці й інші аспекти представленого винаходу будуть краще оцінені, посилаючись на наступні фігури і детальний опис.

Короткий опис фігур

Фіг. 1 демонструє середню клінічну оцінку після імунізації CIV у собак. Невакцинований

контроль й вакциновані собаки імунізували з CIV і контролювали щодня, від дня-2 протягом 10 днів після за клінічними симптомами, такими як очні і назальні виділення, чхання, кашель, депресія та задишка. Клінічні симптоми були оцінені відповідно до керівних принципів, описаних у Прикладі 1, і середня клінічна оцінка для кожної групи обробки була графічно нанесена проти днів.

Фіг. 2 демонструє пост-імунізаційне назальне вірусовиділення у собак. Невакцинований контроль й вакциновані собаки імунізували з CIV. Назальні мазки були зібрані в день перед імунізацією (день-1), щоб підтвердити, що собаки були вільними від CIV. Назальне вірусовиділення було перевірене у імунізованих собак, збираючи назальні мазки щодня протягом 10 днів (день 1-10 після імунізації) і виконуючи титрування на моношарових культурах MDCK. Середні вірусні титри для кожної групи обробки, виражені як $\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50}/\text{мл}$, були обчислені й графічно нанесені проти днів після імунізації.

Детальний опис винаходу

Традиційні способи одержання вакцин проти грипу включають культивування ізолюваного штаму в курячих ембріонах принаймні частково, тому що використання яєць дешево та ефективно та тому, що немає ніякого доступного очевидного альтернативного варіанту для культивування вірусів грипу у великій кількості. У випадку людського грипу це особливо актуально, тому що багато ліній клітин, які можуть використовуватися для розмноження вірусу грипу, не були схвалені FDA для одержання вакцини для людей, і тільки дуже низькі титри були отримані в культурі тканини.

Коли вакцина одержана з яєць, це взагалі вироблено наступним способом. Спочатку, вірус відновлюють з мазка з горла або подібного джерела та ізолюють у яйцях. Початкова ізоляція в яйці є важкою, але вірус пристосовується до яйця, і наступне розмноження в яйцях відбувається відносно легко. Після культивування в яйці вірус очищують і інактивують формаліном або бета-пропіолактоном. Культивування свідчить, що яйце не є оптимальними для розмноження вірусів. Наприклад, звичайна яйцекладка, використовувана в заснованому на яйці виробництві, є високим ризиком для контамінації вірусного препарату ендегенними вірусами, звичайно знайденими в цьому середовищі. Крім того, окрема інокуляція та урожай мільйонів яєць, так само як технологія продукування і виділення цільового продукту, приводять значної можливої контамінації середовищем, що буде введено у вірусний препарат, що є ймовірною причиною відкликання вакцини в 2004. Як згадано раніше, важко повністю видалити матеріал яйця, і це може привести до чутливості до вакцини. Крім того, процес повністю випробовує недолік у гнучкості, якщо вимога раптово збільшується через тилові проблеми внаслідок недоступності більших кількостей прийнятних яєць. Є також свідчення, що культивування у яйцях може зменшити антигенність вірусу. Відповідно, культивування вірусів грипу А або В у яйцях приводить до гетерогенного вірусного продукту, у якого є спектр НА мутацій. На прямому контрасті, відповідне культивування на клітинах-хазяїнах ссавця приводить до вірусів грипу, які структурно ідентичні спочатку ізолюванням (Rocha, і ін. J. Gen. Virol 1993; 74:2513-2518). Крім того, віруси грипу, вирощені на клітинах ссавця, виявляють нейтралізацію й інгібування антитіл НА у сироватці людини виключно швидко та з більш високим титром, ніж це роблять їх культивовані у яйцях копії (Oxford, і ін. Bull VOZ 1987; 65:181-187).

На жаль, тоді як усі штами вірусу грипу, здається, культивують у яйцях, тим не менше, багато з них добре не культивувались в клітинах культури тканини, і ті, які дійсно культивувались у клітинах культури тканини, часто не культивувались у кількостях, необхідних, щоб одержати ефективну вакцину. Представлені винахідники тепер розкривають те, що коли вірус грипу культивований у культурі тканини, використовуючи клонування методом серійних розведень, можуть бути одержані штами, адаптовані до культури тканини. Несподівано, винахідники виявили, що реплікація вірусу, одержаного від інокуляції через амніотичну мембрану курячих ембріонів, надає популяцію вірусів, здатних до реплікації і забезпечити високі рівні НА, при розмноженні на клітинах культури тканини (наприклад, Vero клітини). Одержані вірусні штами продукують НА титр, що майже дорівнює отриманим, використовуючи курячі ембріони та НА титр є однією важливою мірою потенціалу вакцини. Тому, один важливий аспект представленого винаходу спрямований на способи продукування вірусних штамів грипу, адаптованих до культури тканин і прийнятні для використання у виробництві вакцин проти грипу, особливо вакцин для ссавців. Способи включають використання клонування граничного розведення, щоб ізолювати та ідентифікувати адаптовані до культури тканини віруси. Одержані штами можуть бути оброблені, щоб одержати вакцину. Таким чином, представлений винахід також спрямований на способи продукування поліпшених вірусних вакцин проти грипу.

До цього були забезпечені способи для селекції адаптованого до культури тканини вірусу, шляхом титрування вірусу, використовуючи клонування граничного розведення й повторення

процесу 2 або більше разів. У деяких способах використовується клітина культури тканини є клітиною НЕК (клітини ембріональної нирки людини). Трипсин або еквівалентна протеаза можуть використовуватися, щоб збільшити ефективність входження вірусу у клітини. Подальші способи включають титрування трипсину, щоб ідентифікувати кращу концентрацію для використання серії трипсину та для використовуваних клітин. Ідентифікація кращої кратності інфікування (KI) для кожного використовуваного вірусу грипу та для певних клітин також сприяє успішному розмноженню культури тканини. Ізольований адаптований до культури тканини вірус може використовуватися, щоб одержати вакцину відповідно до стандартних способів. У деяких втіленнях вакцини включають використання ад'юванта ISCOM. У деяких втіленнях вакцини включають використання як ад'юванта гідроксиду алюмінію. Коли, більше, ніж один вірусний штам або ізолят включені у вакцину, способи можуть включати змішування двох в імунологічно еквівалентних кількостях. В цьому документі забезпечуються способи та композиції для адаптованих до культури тканин вірусних ізолятів і для одержаних з них вакцин.

I. Способи селекції вірусу, адаптованого до культури тканини

Джерело вірусу, використовуване в способах винаходу не є критичним щодо винаходу. Наприклад, вірус може бути отриманий ізоляцією від інфікованої тварини або пацієнта, як посів вірусу, постачений ВОЗ, закупівлею у відповідній організації (наприклад, АТСС) або від науково-дослідних лабораторій. Зокрема CIV, як відомо, викликає серйозне респіраторне захворювання, включаючи пневмонію. Таким чином, собаки з цими симптомами є корисними джерелами. Відповідні зразки для виділення вірусу включають: назальний змив/аспірат, назофарингеальний мазок, мазок з горла, бронхоальвеолярний лаваж, трахеальний аспірат, пунктат плеври, слину, мазок виділень та аутопсійні зразки. Зразки від живих тварин оптимально повинні бути зібрані рано, і в деяких випадках, протягом 4 днів після початку захворювання. Зразки можуть бути зібрані у прийнятні транспортувальні середовища, щоб бути збереженими до використання або використовуватися негайно. В разі зберігання, для гарантування життєздатності, вірус може бути збережений при зменшеній температурі такої як 4°C. Щоб ізолювати вірус грипу із зразка, великі контамінанти можуть бути вилучені (наприклад, центрифугуванням), і супернатант можливо інокулювати у чисельні клітини при чисельних розведеннях. Альтернативно, вірус від тварини може спочатку бути культивовий у курячих яйцях. Можуть використовуватися способи, щоб підтвердити, що ізолят вірусу є дійсно грипом у будь-якій стадії технологічного процесу.

Для підтвердження присутності бажаного вірусу грипу в будь-який час у процесі одержання адаптованого до культури тканини штаму можуть використовуватися чисельні скринінгові способи. Вірус може бути підданий скринінгу, використовуючи будь-яке відоме та/або прийнятне дослідження для вірусу грипу. Таке дослідження включає (самостійно або в комбінації), вірусну реплікацію, кількісний та/або якісний аналіз інактивації (наприклад, антисироватками), транскрипцію, реплікацію, трансляцію, вбудовування віріону, вірулентність, HA або NA активність, вірусну продуктивність та/або морфогенез, використовуючи такі способи як зворотна генетика, рекомбінація, комплементация і/або інфікування.

A. Клітини культури тканини

Будь-які клітини-хазяїни ссавців, які дозволяють культивувати вірус грипу, можуть використовуватися для способів тут. Як правило, клітини-хазяїни відповідно виключають побічні агенти і число пасажу, що може бути сертифіковано згідно з вимогами ВОЗ для одержання вакцини. Чисельні клітинні лінії можуть використовуватися, щоб ізолювати та розмножити віруси грипу. Деякі лінії клітин, які використовувалися, включають: клітини Vero (клітини нирки мавпи), клітини MDCK (клітини Madin-Darby нирки собак), клітини BHK-21 (нирки немовляти хом'яка) і BSC (клітини нирки мавпи) і клітини HEK. Таким чином, будь-яка клітина культури тканини, що дозволяє культивування вірусу грипу, може використовуватися. Прийнятні клітини включають, не обмежуючись, наступні: Vero, MDBK, BK21, CV-1, і будь-яка стосовна до ссавців ембріональна ниркова клітина (наприклад, HEK). У деяких втіленнях використовуються клітини Vero або клітини ембріональної нирки ссавця. У деяких втіленнях використовуються клітини ембріональної нирки людини (HEK клітини).

Прийнятне середовище культури тканини для розмноження вищезгаданих клітинних ліній буде відоме фахівцям у даній галузі. Таке середовище може містити відповідну сироватку (наприклад, ембріональну бичачу сироватку) при концентрації до 20 % об/об. Фахівцями буде оцінено, що середовище, що містить менше, ніж 20 % об/об сироватки (2-5 % об/об), може використовуватися для розмноження вищезгаданих клітинних ліній.

B. Оптимізація трипсину для клітин

Щоб культивувати високий запас титру вірусу в культурах клітин, відповідна кількість протеази може використовуватися, щоб активізувати гемаглютинін для інтерналізації в клітини.

Розчин, що містить протеазу, може бути доданий до ізоляту безпосередньо або ізолят може бути розведений у протеазі для культивування ізоляту для одержання вакцини. Протеаза може використовуватися, щоб розбавити вірус до відповідної кратності інфікування (KI) для культивування.

5 Протеаза може бути будь-якою протеазою, що здатна до активування НА для інтерналізації, не ушкоджуючи вірусні протеїни, таким чином, що вони не можуть бути культивовані та/або інфікувати клітини. Такі протеази включають, не обмежуючись, наступні: прокаріотична протеаза, проназа, трипсин, і субтилізин (А), наприклад, трипсин ІХ.

10 Кількість протеази, що буде використовуватися, повинна бути достатньою, щоб активізувати вірус із дуже незначним токсичним ефектом щодо клітин. Токсичний ефект може бути проаналізований, ідентифікуючи характеристики пошкодження клітини, таке як відділення від планшету або субстрату, присутність продуктів розпаду клітин, поява мертвих клітин і недостача життєздатних клітин. Таким чином, "ефективна кількість трипсину" є тою, коли використовується протягом достатнього часу, дозволяє трипсину розщеплювати вірусні протеїни, не відокремлюючи клітини від субстрату або викликаючи інші токсичні ефекти. Титрування протеази може також використовуватися, щоб збільшити продукування активного вірусу в культурі тканини. Титрування включає ідентифікацію максимальної кількості трипсину, що є мінімально руйнівною для клітин. Ця кількість може мінятися залежно від використовуваних клітин культури тканини та серії протеази. Тому, нові серії протеази можуть бути протитровані, щоб встановити оптимальний рівень до використання, і кожна протеаза може бути протитрована для кожної клітини культури тканини. Титрування включає інокуляцію клітин культури тканини з поетапним розведенням протеази та культивуванням їх протягом прийняттого часу. Наприклад, стадія половинного розведення ($10^{-0.5}$) протеази може використовуватися. Час інкубації буде мінятися залежно від лінії клітини, але, звичайно буде 25 приблизно між 2 днями та 7 днями. Рівень протеази може бути визначений, використовуючи типовий час інкубації для використовуваних клітин. Наприклад, якщо 4-денна інкубація краща для вірусу грипу, протеаза може бути перевірена, культивуючи протягом приблизно 4 днів у присутності однієї тільки протеази. Найнижче розведення протеази, у якій немає ніякої токсичності або дуже незначна токсичність для клітин, може потім використовуватися. Діапазон 30 концентрацій трипсину, які можуть використовуватися на клітинах культури тканин ссавця, наприклад клітинах Vero, є від приблизно 0,5 мкг/мл до приблизно 10 мкг/мл, але більш звичайно приблизно 2,5 мкг/мл середовища.

Як тільки оптимальний рівень протеази ідентифікований, вірус може бути розведений у середовищі інфекції відповідною кількістю протеази, (наприклад, трипсином) таким чином, що 35 оптимальний рівень досягається, коли вірус доданий до клітинного середовища. Оптимальна кількість трипсину може використовуватися для клонування граничного розведення, щоб одержати ізолят, адаптований до культури тканини, так само як культивування і збір ізоляту.

С. Клонування методом серійних розведень

40 Типова вірусна культура є гетерогенною. Таким чином, наприклад індивідуальні вірусні частинки у лунці мікротирувального планшету можуть змінитися відносно інфекційності, реплікації, і т.п.. Серійне розведення використовується, щоб вибрати субпопуляції вірусів у культурі, субпопуляції, які найкраще адаптовані до клітин, наприклад. Серійне розведення включає розведення вірусної культури послідовно до зникнення, наприклад, щоб визначити кращу кратність інфікування (KI). Звичайно це включає ряд 10-кратних розчинень, але може 45 змінитися залежно від титру вірусу.

Типове граничне розведення використовується, щоб ідентифікувати найвище розведення, що приводить до вірусного ефекту на клітину. Вірусний ефект може бути цитопатичним ефектом (CPE). Цитопатичні ефекти - будь-які ефекти на клітину, викликані грипоною вірусною інфекцією. Вони включають, не обмежуючись, наступні: округлення клітини, дегенерацію, 50 відторгнення, апоптоз, індукцію оксиген-реактивних видів (ROS), грануляцію і наступну фрагментацію клітин, і відділення клітин від основи (такі, як планшет культури тканини). Лунка найвищого розведення була зібрана. Цей зібраний вірус потім розводили до зникнення, і процес повторювали. Як правило, серійні 10-кратні розведення одержані у відповідному середовищі (з або без трипсину) і 0,2 мл кожного розведення були додані до планшетів або лунок 55 мікротитрувального планшету, що містить клітини культури тканини та культивували достатній час, щоб ідентифікувати CPE клітини. Оскільки сироватка інактивує трипсин, середовище звичайно не містить сироватки. Лунку або планшет, що містять найвище розведення, що викликає CPE, збирали, потім розводили і процес повторювали. Процес звичайно повторюється принаймні два рази, але може бути повторений до 5 разів. У деяких випадках, процес 60 повторювали 3 рази.

Вірусні культури, одержані способами винаходу, охарактеризовані гомогенністю послідовності НА протеїнів у вірусах. Багато способів можуть використовуватися, щоб визначити ступінь гомогенності послідовності. Наприклад, послідовність НА протеїнів безпосередньо або секвенуванням кодування РНК таких протеїнів. Як правило, вірусні

5 препарати, одержані способами винаходу, будуть містити віруси, у яких принаймні 70 % НА протеїнів мають ту ж саму амінокислотну послідовність. У деяких втіленнях 80 %, або принаймні 90 % НА протеїнів мають ту ж саму амінокислотну послідовність.

D. Способи тестування вірусу грипу

Тести можуть бути виконані, щоб підтвердити активність і присутність вірусу грипу в будь-який час у процесі для способів тут. Наприклад, гемаглютинація може бути ідентифікована наступним способом. Якщо у віруса є поверхневий НА протеїн, він може з'єднуватися з RBCs та аглютинувати. Якщо концентрація вірусу в зразку буде висока, коли зразок буде змішаний з RBCs, то буде утворена решітка вірусів і RBC. Це явище називають гемаглютинацією. Це - простий спосіб виявити присутність і титр вірусів, що утворюють гемаглютинат, таких як віруси

15 грипу. Якщо вірусів у зразку недостатньо для гемаглютинації з RBCs, вони утворюють кульку на дні лунки. Найвище розведення, що показує повну гемаглютинацію було взяте за кінцеву точку. Вірусний титр виражали у НА одиницях (HAU), які є інверсією розведення на мілілітр. Наприклад, якщо є повна гемаглютинація у лунці, при 1/32 розчиненні в 50 мкл, але не в лунці з наступним найвищим розведенням титр вірусу - 32 HAU на 50 мкл або 640 HAU на мл.

Інші дослідження, що можуть використовуватися, щоб ідентифікувати та визначити кількість вірусів грипу, включають ідентифікацію CPE (як обговорено тут), Western blot, ELISA, PCR і інші способи ідентифікації вірусу грипу, використовуючи антитіла та/або проби, які є специфічними для деякої частини вірусу, зокрема НА антиген.

II. Способи культивування і збирання

Після продукування штаму вірусу ізолят може бути зібраний. Можуть використовуватися стандартні способи. Зібраний ізолят може бути збережений для майбутнього використання або використовуватися, щоб одержати вакцину, використовуючи стандартні способи. Вірус може бути зібраний, коли одержана максимальна кількість вірусу; коли одержана максимальна кількість гемаглютиніну, як визначено НА дослідженням; і/або, коли клітини лізовані(лізовані).

Після одержання адаптованого до культури тканини ізоляту, ізолят може бути культивований і зібраний. Спосіб культивування і збирання адаптованого до культури тканини вірусу не є критичним щодо винаходу, і можуть використовуватися стандартні способи. Однак, у деяких втіленнях, вірус культивується у клітині культури тканини, до якої він найкраще адаптований. Зібраний вірусний ізолят може бути збережений для майбутнього використання або використовуватися, щоб одержати вакцину, використовуючи стандартні способи. Вірус може бути культивований на відповідних клітинах культури тканини, додаючи вірус при прийнятній кратності інфікування (KI) у відповідну кількість протеази (наприклад, трипсину) до клітин, протягом достатнього часу, щоб одержати високий титр вірусу та/або до лізис клітин. Вірус може бути зібраний, коли одержана максимальна кількість вірусу, коли одержана максимальна кількість гемаглютиніну та/або коли клітини лізовані. Було знайдено тут, що оптимальне прекультивування вірусу в яйцях (в алантоїдній порожнині або інокуляцією через амніотичну мембрану) може збільшити адаптацію вірусу в клітинах культури тканини.

A. Пре-культивування у яйцях

Пасаж у культуру яєць, як показав, полегшив адаптацію вірусу в клітині культури тканини. Таким чином, може бути бажаним пре-культивувати вірусний ізолят в курячих ембріонах відповідно до стандартних технологій. Наприклад, вірус вводили в алантоїдну порожнину або через амніотичну мембрану 9-12 денних курячих ембріонів, і дозволяли розмножуватися протягом приблизно трьох днів. Потім алантоїдну або амніотичну рідину збирали, і зібраний матеріал може бути культивований у культурі тканини при прийнятній кратності інфікування (KI) для використання у виробництві вакцини. Альтернативно, зібраний матеріал може безпосередньо використовуватися в клонуванні граничного розведення. Було знайдено, що інокуляція яєць через амніотичну мембрану збагачує вірус, що реплікуватися й може забезпечити високі рівні НА протеїну, коли культивують у клітинах Vero.

B. Кратність інфікування (KI)

Тут було ідентифіковано, що низька кратність інфікування (KI) приводить до кращого та/або більш високого титру вірусного ізоляту. Без обмеження до певної теорії, покладається, що низька кратність інфікування (KI) зменшує кількість дефектних вірусних частинок і приводить до більш ефективного інфекційного процесу. У деяких втіленнях використовується кратність інфікування (KI) є менше, ніж приблизно 0,01 (один вірус на 100 клітин). В інших втіленнях кратність інфікування (KI) - менше, ніж приблизно 0,003. У деяких втіленнях кратність

інфікування (KI) - менше, ніж приблизно 0,001. Кратність інфікування (KI) може бути вибрана як найнижча кратність інфікування (KI), що приводить до високого титру вірусу і/або до лізису клітин приблизно через 3-4 дні.

III. Виробництво Вакцини

Як тільки бажаний ізолят отримано від адаптованого щодо культури тканини вірусу, вірус може використовуватися, щоб одержати вакцину. Багато типів вірусних вакцин відомі, включаючи, але не обмежуючись атенуйованими, інактивованими, субодиночними і розщепленими вакцинами.

A. Способи продукування атенуйованого вірусу

Атенуйовані вакцини є живими вірусними вакцинами, які були атенуйовані(ослаблені) або змінені, щоб більше не викликати захворювання. Вони можуть бути одержані різними способами, наприклад, культивуванням у культурі тканини для повторного розмноження і генетичної маніпуляції, щоб видозмінити або видалити гени, залучені в патогенність. Ізолят, адаптований до культури тканини, може використовуватися, щоб одержати атенуйований (ослаблений) вірус, використовуючи стандартні способи. Наприклад, як тільки вірусні гени та/або протеїни ідентифіковані, які залучені в патогенність або залучені в прояв захворювання, вони можуть бути піддані мутації або змінені таким чином, що вірус усе ще в стані інфікувати та реплікуватися в межах клітини, але це не може викликати захворювання. Приклад цього - мутагенезом розщеплений сайт HA1/HA2. Адаптований до культури тканини вірус може бути атенуйований(ослаблений), використовуючи будь-які стандартні способи, наприклад холод, що пристосовує вірус.

Після продукування атенуйованого вірусу вакцина може бути одержана, використовуючи стандартні способи (наприклад, способи описані тут). Вірус може бути очищений, використовуючи стандартні способи, наприклад використовуючи ексклюзійно-гранулометричну хроматографію. Вакцина потім може бути одержана, використовуючи стандартні ад'юванти та вакцинні препарати, наприклад, ISCOM, нано-гранули, мінеральне масло, рослинне масло, гідроксид алюмінію, сапонін, неіонні детергенти, сквален, і блок-співполімери можуть використовуватися самостійно або в комбінації як ад'юванти. Поточні комерційні вакцини в Сполучених Штатах й Європі не містять ад'ювантів (і живі й убиті вакцини), і це частково, чому така висока концентрація HA (15 мкг HA на вірусний штам, 45 мкг HA для тривалентної композиції) необхідна у вакцині.

B. Способи одержання інактивованої, субодиночної, і розщепленої вірусної вакцини

Як тільки бажаний вірус отриманий, він може використовуватися, щоб одержати імуногенну композицію, наприклад, вакцину. Приклади "убитих" вакцин - інактивовані, розщеплені й субодиночні вакцини. Вони можуть бути одержані, обробляючи вірус грипу, використовуючи стандартні способи.

Наприклад, субодиночні вакцини взагалі включають ізоляцію тільки частини вірусу, що активізує імунну систему. У випадку грипу субодиночні вакцини були одержані, використовуючи очищений HA і NA, але будь-яка суміш вірусних протеїнів може використовуватися, щоб одержати субодиночну вакцину. Взагалі, вірусний протеїн, такий як HA - екстрагований з рекомбінантних вірусних форм, і субодиночна вакцина утворена, щоб включати суміш цих вірусних протеїнів від штамів, рекомендованих ВОЗ. Наприклад, 1995-1996 вакцин містили HA і NA від двох A штамів й одного B штаму (A/Singapore/6/86 (H1N1); A/Johannesburg/33/94 (H3N2); і B/Beijing/84/93). Для H3N8 CIV можуть використовуватися H3 та/або N8 антигени.

Взагалі, вірусний протеїн(и) екстраговані з вірусу, і субодиночна вакцина утворена, щоб містити суміш цих вірусних протеїнів. Протеїни можуть бути виділені від адаптованих до культури тканин вірусних ізолятів для субодиночної вакцини, використовуючи стандартні способи. Альтернативно, протеїни можуть бути одержані, використовуючи рекомбінантні способи. Способи для того, щоб одержати специфічний протеїн відомі в даній галузі.

Розщеплені вакцини взагалі включають оброблені детергентом капсульні віруси, щоб одержати солюбільні протеїни. У випадку вірусу грипу, HA і NA стають розчинними. Наприклад, неіонні детергенти, такі як Тритон X-100 можуть використовуватися для того, щоб одержати розщеплені вакцини.

Інактивовані вірусні вакцини одержані, інактивуючи зібраний вірус і утворюючи це, використовуючи відомі способи для застосування у якості вакцини, для індукування імунної реакції у ссавця. Стадія інактивації, очищення субодиноць, і/або розщеплення можуть бути виконані до або після очищення вірусу виключенням розміру. Наприклад, виробництво інактивованої вакцини, може включати видалення клітинного матеріалу, інактивацію вірусу, очищення й солюбілізацію капсули вірусу. Інші втілення можуть включати очищення вірусу та потім інактивацію, наприклад використовуючи формальдегід.

Після одержання, будь-яка з вакцин (наприклад, атенуйована, розщеплена, субординічна або інактивована) може бути перевірена, щоб ідентифікувати що вірус та/або вакцина підтримують подібну антигенність, індують серологічну відповідь у ссавця, і/або забезпечують захист від захворювання у ссавця.

5 С. Подальша обробка зібраного вірусу

1. Очищення зібраного вірусу

Після збору та/або після інактивації зібраного вірусу, клітинний матеріал й інші інтерферуючі матеріали, можуть бути вилучені, наприклад, седиментацією, щоб видалити мікроносії і концентрувати супернатант ультрафільтрацією. Грип, культивований у клітинах культури тканини, буде містити протеїни клітин хазяїна. Деяке подальше очищення супернатанту може бути необхідно. Клітинна ДНК може бути вилучена ферментативною обробкою (наприклад, Бензоназою). Після початкового видалення інтерферуючого матеріалу, вірус може бути інактивованій, використовуючи стандартні способи. Альтернативно, інактивація може бути виконана після подальшого очищення, наприклад, розмір-ексклюзією хроматографією.

15 2. Інактивація вірусу

Вірус грипу може бути інактивованій будь-яким способом і будь-якою кількістю агентів. Спосіб інактивації не є критичним щодо винаходу. Інактивація може відбутися після вилучення контамінуючого або інтерферуючого матеріалу. Інактивація може включати використання відомих інактивувальних агентів. Такі інактивувальні агенти включають, не обмежуючись, наступні: УФ опромінення, формальдегід, глутаральдегід, бінарний етиленімін (BEI) і бета-пропіолактон. У деяких втіленнях використовується BEI, тому що він, як відомо, руйнує вірусну нуклеїнову кислоту, не ушкоджуючи вірусні протеїни. Крім того, BEI не впливає на вміст протеїну та температуру. Інактивувальні агенти використовуються при досить високій концентрації, щоб інактивувати кожен вірусну частинку в розчині. Наприклад, BEI може використовуватися в кінцевій концентрації між приблизно 0,5 й 10 мМ, включаючи, але не обмежуючись: 1,5, 3, 4, 5 і 6 мМ і включаючи діапазони приблизно 1-6 і 1-3 мМ. В одному втіленні BEI використовується при концентрації приблизно 6 мМ. Як правило, BEI використовується при концентрації приблизно 1,5 мМ і інкубуванні при 37°C протягом 48 годин. У виготовленні вакцин проти CIV, BEI може використовуватися в кінцевій концентрації між приблизно 0,5 й 10 мМ, звичайно між 4-8 і часто між 5-7 мМ. В одному втіленні, BEI використовується при концентрації приблизно 6 мМ. У деяких втіленнях інактивація відбувається у відповідному рН факторі й температурі для інактивувального агента. РН фактор і температура можуть бути обрані, щоб гарантувати, що одержаний інактивованій вірус усе ще є імуногеном. Інактивація може бути продовжена з відповідною кількістю струшування, щоб гарантувати, що агент зв'язується з усіма вірусними частинками в розчині.

Після інактивації інактивувальні агенти можуть бути вилучені, використовуючи способи, включаючи, але не обмежуючись, наступні: інактивація інактивувального агента, осадження інактивувального агента, фільтрація інактивувального агента, і хроматографія, або суміш цих способів. Наприклад, BEI може бути інактивованій доповненням тіосульфату натрію. Залишковий BEI може також бути відділений від вірусу/вірусних протеїнів, використовуючи гранулометрично-ексклюзійні способи. Як тільки нешкідливість (відсутність живого вірусу) підтверджена, вірусний розчин може бути додатково оброблений, щоб одержати вакцину.

3. Додаткова технологічна обробка

Вірусний розчин може бути додатково оброблений, наприклад, видалити контамінанти, додатково сконцентрувати вірус і забезпечити більш сильну імунну реакцію. Деякі приклади подальшої обробки включають початкове видалення клітинного матеріалу, видалення клітинної ДНК, концентрування і утворення в ад'юванті, використовуючи стандартні способи. Грип, культивований у клітинах культури тканини, буде містити протеїни клітин хазяїна. Наприклад, грип, розмножений у клітинах ембріональної нирки людини (НЕК), буде мати протеїни НЕК або бичачі або мавпячі протеїни, якщо культивували в MDBK або клітинах VERO, відповідно. Ці протеїни можуть бути виявлені способами, відомими фахівцям у даній галузі. Багато способів відомі для видалення ДНК, включаючи додавання чисельних ферментів дезоксирибонуклеази, відомих, як дегранданти клітинної ДНК, наприклад, Бензоназа. Початкова стадія концентрування може бути виконана, щоб забезпечити вірусний розчин при концентрації, найбільш прийнятній для додаткового очищення хроматографією. Це може бути зроблено, використовуючи будь-які стандартні способи, включаючи, але не обмежуючись ультрафільтрацією, використовуючи мембрану, що має молекулярну масу приблизно 100 K (наприклад, полісульфонова мембрана з MWCO 100 K). Вірусний розчин може бути сконцентрований приблизно у 100 разів, включаючи, але не обмежуючись 90 разів, 80 разів, 70 разів, 60 разів, 50 разів, 40 разів, 30 разів, 20 разів, 10 разів і 5 разів. У деяких втіленнях вірусний розчин сконцентрований приблизно у 50 разів,

але більш звичайно включаючи 20 разів і 30 разів.

4. Очищення

Вірус може бути очищений, використовуючи стандартні способи, такі як центрифугування щільності. У деяких втіленнях вірус очищений гранулометрично-ексклюзійною гель-хроматографією. Одна перевага використання виключення розміру полягає в тому, що вихід є кращим, ніж при використанні центрифугування щільності. Будь-який гранулометрично-ексклюзійний гель може використовуватися, щоб надати очищений вірус. Будь-який стандартний гель може використовуватися, такі як гель Sepharose (наприклад CL-2B Sepharose). У деяких втіленнях колонка приблизно 70-120 см у довжині, щоб досягти необхідного поділу, включаючи, але не обмежуючись приблизно 80, 90, 100, і 110. В інших втіленнях колонка приблизно від 80-100 см у довжині, наприклад колонка приблизно 90 см у довжині. У деяких втіленнях довжина досягнута послідовною кратністю колонок, наприклад двома колонками по 45 см або трьома колонками по 30 см (наприклад, колонка 30-32 см у довжині та 30 см у діаметрі). Сконцентрований вірус може бути застосований, використовуючи стандартні способи, наприклад, вірус застосовується 5-10 % від об'єму колонки (ок), звичайно 5-7% від об'єму колонки. Вірусний пік від колонки потім може бути зібраний і додатково сконцентрований використовуючи стандартні способи, наприклад ультрафільтрацію. У деяких втіленнях використовуються 2-3 колонки, що послідовно мають у цілому 90 см довжини, і заключний пік об'єднують і концентрують ультрафільтрацією.

5. Солюбілізація капсульних протеїнів

Вірусний матеріал пікової концентрації може бути солюбілізований, використовуючи стандартні способи, такі як, з неіонним детергентом. Солюбілізація може бути виконана, щоб одержати матеріал для композиції ISCOMS (див. нижче). Приклади неіонних детергентів, включають, але не обмежуються, наступними: нонаноїл-N-Метилфукамід (Мега 9), Тритон X-100, Октилглікозид, Дигітонін, C12E8, Луброл, Нонідет P-40 і Tween (наприклад Tween 20, 80 або 120). Після солюбілізації вірус може використовуватися, щоб одержати вакцину, і/або ад'ювант може бути доданий. Наприклад, для одержання ад'юванта ISCOM, ліпідна суміш може бути додана, щоб сприяти утворенню ISCOM. Ліпідна суміш може включати фосфатидилхолін і синтетичний холестерин. У деяких втіленнях вірус деструктований Мега 9 при кімнатній температурі при перемішуванні, і потім ліпідна суміш (фосфатидилхолін і холестерин) можуть додаватися й безперервно перемішуватися.

6. Утворення ад'ювантів

Відповідні ад'юванти можуть бути додані до вакцини та/або фармацевтичної композиції. Приклади ад'ювантів включають ті, які включають масляну та водну емульсію, так само як ті, що додатково включають гідроксид алюмінію. В останньому випадку, гідроксид алюмінію від комерційного джерела може використовуватися, наприклад, Альгідрогель, (Superfos Biosector, Frederikssund, Данія) і Perідрогель (Reheis Inc). Масляна та водна емульсія звичайно включає мінеральне масло або, що перетворюється в ході обміну речовин масла (наприклад, рослинне масло, риб'ячий жир). Неіонні детергенти або сурфактанти можуть використовуватися як емульгатори. Приклади емульгаторів включають Tween 80/Span 80, Arlecel 80/Tween 80 і Montanides (Seppic, Париж, Франція). У випадку ад'ювантних емульсій взагалі 5-25 % об'єму - масло, і 75-95 % об'єму є водним. У деяких втіленнях ад'ювантна емульсія - 20% масло та 80 % об'єму - вода. Кількість гідроксиду алюмінію звичайно приблизно між 5 % й 15 % водної фази. У деяких втіленнях Emunade® - ад'ювант.

Для деяких втілень ISCOM використовується як ад'ювант. ISCOM - аббревіатура для Імунно-Стимулювального Комплексу, і технологія була описана Morein та ін. (Nature 308:457-460 (1984)). ISCOM's - нова система доставки вакцини та несхожий на звичайні ад'ювантні технології. ISCOM може зручно утворений одним із двох способів. У деяких втіленнях антиген фізично включений у структуру під час її утворення. В інших втіленнях ISCOM-матриця (як поставляється, наприклад, Isconova) не містить антигену, але змішана з антигеном вибору кінцевим користувачем до імунізації. Після змішування антигени присутні в розчині з ISCOM-матрицею, але не включені фізично в структуру.

Взагалі, очищені ISCOM антигени представлені у мультимерній формі, базуючись на здатності Quil A спонтанно утворювати міцели при критичній концентрації і гідрофобним/гідрофільним зв'язком, захоплюючи очищені імуногени. Ці міцелярні структури перебувають у розмірі 35 нм й легко розпізнаються імуною системою. На відміну від звичайних ад'ювантів, ISCOMS швидко звільнявся від ділянки ін'єкції та викликав місцеву, гуморальну і клітинно-опосередковану імунову відповідь. У специфічних втіленнях ISCOMs утворені наступним чином. Вірус солюбілізують, використовуючи стандартні способи, такі як з неіонним детергентом (наприклад, Мега-9, Тритон X-100, Октилглікозид, Дигітонін, Нонідет P-40, C₁₂E₈,

Луброл, Твін-80). Ліпідну суміш додавали, щоб сприяти утворенню ISCOM. Ліпідна суміш може включати фосфатидилхолін і синтетичний холестерин. У деяких втіленнях суміш спочатку обробляють неіонним детергентом при кімнатній температурі при перемішуванні, потім додавали ліпідну суміш (рівні частини фосфатидилхоліну і холестерину, наприклад) й безперервно перемішували. Quil A (очищений глікозид сапоніну) додавали до вірусної ліпідної суміші, і перемішування продовжували. Quil A може бути доданий, щоб отримати кінцеву концентрацію Quil A приблизно 0,01 до 0,1 %, включаючи, але не обмежуючись 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08 і 0,09. У деяких втіленнях кінцева концентрація становить приблизно 0,05 %. Неіонний детергент видаляють (наприклад, діалізацією з ацетатом амонію). Матриця ISCOM утворена Quil A. Морфологія частинки ISCOM, як визначено електронною мікроскопією, показує звичайну клітинно-подібну структуру приблизно 35 нм у розмірі. Стадія утворення ISCOM може бути удосконалена за допомогою діалізації тангенціального потоку. ISCOMs представляють очищені антигени у мультимерній формі, базуючись на здатності Quil A спонтанно утворювати міцели при критичній концентрації і гідрофобним/гідрофільним зв'язком, захоплюючи очищені антигени. Утворення ISCOMs може бути перевірено електронною мікроскопією, щоб перевірити, що типові, подібні до клітини структури були утворені. Імунна реакція від представленого ISCOM, як показано, була принаймні в десять разів краще, ніж від подібного антигену, представленого як міцели одного тільки агрегованого мембранного протеїну. ISCOMs, як також було знайдено, виявляли клітинно-опосередковану відповідь, не помічену у звичайних цільних вірусних вакцин. У деяких втіленнях кінцева концентрація становить приблизно 0,05 %.

Імуностимулятори можуть також бути додані до вакцини та/або фармацевтичної композиції. Імуностимулятори включають: цитокіни, фактори росту, хемокіни, супернатанти від клітинних культур лімфоцитів, моноцитів, або клітин від лімфатичних органів, клітинні препарати та/або екстракти з рослин, клітинні препарати та/або екстракти з бактерій, паразитів, або мітогенів, і нові нуклеїнові кислоти, отримані з інших вірусів та/або інших джерел (наприклад, парно-ланцюгова РНК, CpG), блок-співполімери, нано-гранули або інші композиції, відомі в даній галузі, використовували самостійно або в комбінації.

Конкретні приклади ад'ювантів і інших імуностимуляторів включають, не обмежуючись, наступні: лізолецитин; глікозиди (наприклад, сапонін і похідні сапоніну, такі як Quil A або GPI-0100); катіоноактивні сурфактанти (наприклад, DDA); галогеніди вуглеводнів четвертинного амонію; поверхнево-активні полііоли; поліаніони та поліатомні іони; поліакрилові кислоти, неіоногенні блок-співполімери (наприклад, Pluronic F-127); і MDP (наприклад, N-ацетил-мураміл-L-треоніл-D-ізоглутамін (thr-MDP), N-ацетил-нор-мураміл-L-аланіл-D-ізоглутамін, N-ацетилмураміл-L-аланіл-D-ізоглутамініл-L-аланін-2-(1'-2'-дипальмітоїл-sn-гліцеро-3-гідроксифосфорилокси)етиламін).

D. Ефективність вакцин

Способи є відомі в даній галузі для визначення, чи підтримує субодинична, атенуйована, розщеплена і/або інактивована вірусна вакцина подібну антигенність щодо клінічного ізоляту або адаптованого до культури тканини ізоляту, виділена з них. Такі відомі способи включають використання антисироваток або антитіл, HA і NA активність і інгібування й ДНК скринінг (такий, як гібридизаційний зонд або PCR), щоб підтвердити, що донорські гени, що кодують антигенні детермінанти присутні в інактивованому вірусі. Способи ідентифікації, чи викликає вакцина серологічну відповідь, також відомі в даній галузі й включають імунізацію піддослідної тварини з вакциною, наступною інокуляцією вірусом, що спричиняє захворювання й ідентифікацією присутності або відсутності симптомів захворювання. Таким чином, ефективність вакцини грипу може бути перевірена на тваринах, звичайно, тхори, миші, і морські свинки використовуються. Титр антитіл може бути перевірений, використовуючи інгібування Гемаглютинину (HI) або спосіб інгібування Нейрамінідази (NI), або тестуючи на вірус-нейтралізуючі антитіла (мікротест нейтралізації) у культурі тканини, і такими способами, які є загальновідомими. Дослідження сенсibiliзації можуть надати важливу інформацію, щоб оцінити вакцину.

Фармацевтичні композиції та/або вакцини, що підходять для обробки, включають вірус або вірусну субодиницю в суміші з стерильними водними або неводними розчинами. Процес одержання фармацевтичної композиції та/або вакцини може включати ізоляцію адаптованого до культури тканини штаму, ріст й очищення вірусного ізоляту, інактивування та або атенуацію вірусу та змішування відповідного титру з фізіологічно прийнятним розбавником і імуностимулятором. Альтернативно, вірусні протеїни можуть бути очищені для субодиничної вакцини та відповідну кількість змішують з фізіологічно прийнятним розбавником і імуностимулятором. Вірус може бути досить очищеним, якщо не буде ніякого забруднювального матеріалу або речовини, що інтерферує із стадією інактивації та/або імуногенністю вірусу.

Відповідний титр вірусу або концентрація вірусних протеїнів може бути змішана з розбавником і імуностимулятором. Визначення TCID₅₀ - один спосіб визначити вірусний титр (50% інфікувальної дози культури тканини). Наприклад, титр приблизно від 10⁵ до 10¹² TCID₅₀ (базуючись на пре-інактиваційних титрах) може використовуватися, включаючи, але не обмежуючись 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰ і 10¹¹. Довільно, титр може бути проаналізований шляхом НА титру і може містити від приблизно від 1 до 30 мкг НА на вірус, включений у вакцину, включаючи, але не обмежуючись від 1 до 10 мкг для ад'ювантних композицій і від 1 до 30 мкг для не-ад'ювантних вакцин. У деяких втіленнях титр приблизно 15 мкг. Таким чином, наприклад, коли 3 віруси включені в не-ад'ювантну вакцину, 1 доза для дорослих містить еквівалент 45 мкг НА (15 мкг для кожного з 3 вірусних штамів). В інших втіленнях кількість від кожного штаму може відрізнятися (наприклад, залежно від антигенності), але кінцева концентрація - від приблизно 1 до 60 мкг НА, включаючи 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 і 55 мкг. В іншому втіленні, ад'ювантні вакцини, як очікують, будуть містити кількості НА приблизно від 1 до 30 мкг, включаючи 2, 5, 10 і 20 мкг. Вакцина має звичайно об'єм приблизно між 50 мкл і 5000 мкл, включаючи 100, 500, 1000, 2000 і 5000 мкл.

Стандартні фізіологічно прийнятні розбавники можуть використовуватися, включаючи, наприклад, ЕМЕМ, збалансований сольовий розчин Хенкса, і фосфатний сольовий буфер (PBS) і фізіологічний сольовий розчин.

Прийнятні імуностимулювальні ад'юванти можуть бути додані до вакцини та/або фармацевтичної композиції. Приклади імуностимулюючих ад'ювантів, включають, але не обмежуються: мінеральна масло, рослинне масло, гідроксид алюмінію, сапонін, неіонні детергенти, сквален, блок-співполімери, нано-гранули, ISCOM, матриця ISCOM або інші сполуки, відомі в даній галузі, використовувані самостійно або в комбінації.

На додаток до ад'юванта, будь-які прийнятні антивірусні агенти, які корисні проти грипу, можуть також бути включені у фармацевтичну композицію. Такі антивірусні агенти включають, наприклад, ремантадин, амантадин, інгібітори нейрамінідази (такі як занамівір й оселтамівір), гама інтерферон, гуанідин, гідроксибензімідазол, альфа-інтерферон, бета-інтерферон, тіосемікарбазони, метіасазон, рифампін, рибавірин, піримідин або аналоги пурину, і фоскарнет.

Вакцини, що мають більше, ніж один вірус або штам вірусних протеїнів, можуть бути одержані, використовуючи способи, описані тут. Суміші можуть бути імуногенно протитровані, щоб забезпечити приблизно еквівалентну імуногенність. Імуногенно протитровані означає, що кінцевий продукт одержаний, щоб вирівняти розходження в імуногенності. Наприклад, якщо одержана суміш штамів А і В і штам А в 5 разів більше імуногенний, штами змішані при співвідношенні - штам А:штам В 1:5.

IV. Введення вакцини

Введення вакцинної композиції та/або фармацевтичної композиції може бути в профілактичних цілях. Коли вводяться профілактично, композиції вводять перед будь-якими очевидними симптомами гриптозної інфекції. Профілактичне введення композиції служить для запобігання або зменшення будь-якої наступної інфекції. Фармацевтична композиція та/або вакцина можуть призначатися будь-яким шляхом, відомим в даній галузі, включаючи інгаляційний, інтраназальний (наприклад ослаблені вакцини), оральний і парентеральний. Приклади парентеральних шляхів введення включають інтрадермальний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, інтраперитонеальний і підшкірний. У деяких втіленнях вакцину вводять внутрішньом'язово або глибоко підшкірною ін'єкцією у верхню кінцівку. Друга доза може бути введена після 2-4 тижневого інтервалу деяким дітям, які не були раніше вакциновані для або піддані грипу (непримировані). Одна або більше ревакцинацій можуть призначатися в підходящий час після початкової імунізації.

Вводять ефективну кількість вакцини та/або фармацевтичної композиції. Ефективна кількість - кількість, достатня, щоб досягти бажаного біологічного ефекту, наприклад, викликати достатній гуморальний або клітинний імунітет. Це може залежати від типу вакцини, віку, статі, здоров'я, і ваги реципієнта. Приклади бажаних біологічних ефектів включають, не обмежуючись, наступні: не викликання симптомів, зменшення симптомів, зменшення вірусного титру в тканинах або назальних секретах, повний захист від інфікування вірусом грипу, і частковий захист від інфікування вірусом грипу.

У деяких втіленнях, імунологічно ефективна кількість CIV вакцини є приблизно від 100 HAU до приблизно 1500 HAU на дозу. Композиція звичайно - між 250 й 750 HAU на дозу. В одному втіленні вакцинна композиція включає приблизно 500 HAU на дозу.

Коли вводиться як розчин, вакцина може бути одержана у формі водного розчину, сиропу, еліксиру, або настойки. Такі композиції відомі в даній галузі, і одержані розчиненням антигену та інших відповідних добавок у відповідних розчинюючих системах. Такі розчинники включають

воду, сольовий розчин, етанол, етиленгліколь, гліцерин, і рідина А1, наприклад. Прийнятні добавки включають сертифіковані барвники, ароматизатори, підсолоджувачі, і антибактеріальні консерванти, такі як тимеросал (натрій етилмеркутіосаліцилат). Такі розчини можуть бути стабілізовані, використовуючи стандартні способи, наприклад, додавання частково гідролізованого желатину, сорбітолу, або середовища культури клітини та можуть бути забуферовані, використовуючи стандартні способи, використовуючи, наприклад, реактиви, такі як гідрофосфат натрію, дигідрофосфат натрію, гідрофосфат калію та/або дигідрофосфат калію. Рідкі композиції можуть також включати суспензії і емульсії. Суспензії одержували, наприклад, використовуючи колоїдний млин, і емульсії, наприклад, використовуючи гомогенізатор.

V. Вірусні штами та ВОЗ

Щоб дати час для адекватних запасів вакцин, які будуть одержані, рішення повинно бути прийняте задовго до сезону грипу, щоб щодо якого використовувати штами грипу А і В у цьому році (протягом зимового сезону). В усьому світі є ретельні й складні епідеміологічні системи моніторингу, що допомагає цим рішенням. Крім того, ВОЗ звичайно готує посіви вірусів для використання у виробництві вакцин.

Є 16 відомих НА підтипів і 9 відомих підтипів НА. Багато різних комбінацій НА й протеїнів НА можливі. Тільки деякі підтипи грипу А (тобто, H1N1, H1N2, і H3N2) у цей час перебуває в загальному циркулюванні серед людей. Інші підтипи знайдені звичайно в інших видах тварин. Наприклад, H7N7 і H3N8 віруси викликають захворювання у коней, і H3N8 також, як недавно показано, викликав захворювання у собак.

Три явні підтипи вірусу А пташиного грипу, які, як відомо, інфікують і птахів і людей, є грипом А H5-N5, такі як HPAI H5N1 віруси, грип А H7, і грип А H9. Однак, наступні штами, які інфікують людей і викликають епідемії або пандемії, могли виникнути з будь-яких підтипів.

Вірус може бути отриманий, використовуючи стандартні способи, наприклад, від зразків пацієнтів, від америкаських типів колекцій культури (або інших колекцій) або від певних вірусологічних лабораторій. У деяких втіленнях вірус отриманий від ВОЗ або ЦКЗ (центр контролю захворювань), включаючи сезонні віруси та можливі пандемічні штами.

VI. Виявлення серологічної відповіді

Способи ідентифікації, чи індукує вакцина серологічну відповідь, також відомі в даній галузі. Наприклад, можна ввести тестованій тварині імуногенну сполуку/вакцину та ідентифікувати противірусні антитіла в сироватці крові. Способи ідентифікації, чи є вакцина захисною, відомі в даній галузі й включають імунізацію піддослідної тварини вакциною, наступною інокуляцією вірусом, що спричиняє захворювання та ідентифікацією присутності або відсутності симптомів захворювання.

Тест інгібування гемаглютинації може бути виконаний, щоб ідентифікувати присутність серологічної відповіді на гемаглютинін. Дослідження інгібування гемаглютинації (ДІГ) може бути виконане на еритроцитах індика (RBCs) на всіх тестових зразках сироватки, наприклад, використовуючи відомий підтип грипу, такий як CIV (H3N8). Коротко, серійне двократне розведення тестової сироватки виконано в PBS на 96-лунковому мікротитрувальному планшеті з V-подібним дном. Еквівалентний об'єм вірусної суспензії, що містить 4-8 HAU/50 мкл CIV, додавали у кожен лунку що містить тестову сироватку, і планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Потім, еквівалентний об'єм 0,5 % суспензії еритроцитів індика додавали. Планшети потім інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, і зчитували результати HAI. Аналог найвищого розведення сироватки, що показує НА інгібування, розглядають як титр HAI тестового зразка.

Інші способи визначення присутності антитіл до вірусу грипу включають тест інгібування Нейрамінідази, Western blot, ELISA, PCR, і інші способи для ідентифікації антитіл проти вірусу грипу. Це дослідження відомо в даній галузі.

VII. Приклади

Наступні приклади забезпечують процедури для ізоляції, адаптації і очищення вірусу грипу, щоб створити гомологічну вірусну популяцію для одержання вихідного вакцинного вірусу. Приклади використовують клітини Vero (америкаський тип колекції культури, CCL 81), але будь-який тип клітини міг використовуватися, що є пермісивним для вірусу грипу.

ПРИКЛАД 1: Хімічні і біологічні

Використовуване середовище інфекції містило 1-літр DMEM (Cambrex, Catalog No. 04-096) або еквівалент; зберігали при 2-7°C, 20 мл L-глутаміну (Cellgro, Catalog No. 25 005 ок) або еквівалент; зберігали замороженим при -10°C або більше. Після розтанення, зберігали при 2-7°C протягом 4 тижнів, і Трипсин IX типу (Sigma Product No. T0303, CAS No. 9002-07-7) або еквівалент; робили аліквотним і зберігали замороженим при -5 до -30°C. Середовище інфекції було свіжоодрержаним перш, ніж інфікувати клітини.

Одержання середовища культури клітин було наступне: 1-літр DMEM, L-глутамін 20 мл, Ембріональна Бичача Сироватка 50 мл (Catalog Gibco No. 04-4000DK) або еквівалент (Примітка: Джерело - країна, вільна від коров'ячої губчатої енцефалопатії (КГЕ)). Готове середовище зберігали при 2-7° протягом не більше, ніж 30 днів після виготовлення.

5 EDTA-Трипсин (Catalog Cellgro No. 98 102-CV або еквівалент), використовуваний для пасування клітин, зберігали при -5 -30°, строк придатності, був призначений виробником.

ПРИКЛАД 2: Одержання культури клітин

Оскільки розведення протеази, що буде використовуватися для стадії вірусного інфікування, може варіюватися залежно від серії, нові серії трипсину були протитровані, щоб встановити оптимальний рівень до використання. Приклад титрування - серійне розведення Трипсину IX типу в DMEM, що містить L-глутамін, використовуючи 1/2 log розведення (10^{-1} , $10^{-1.5}$, 10^{-2} , $10^{-2.5}$ і т.д.) . Використовували 96 лунковий планшет, що містить свіжо злитий моношар клітин Vero, кожен лунку планшета промивали 2 рази, використовуючи 280 мкл PBS. негайно після промивання, додавали 200 мкл кожного розведення Трипсину IX типу до ряду планшета. 15 Планшет потім інкубували при 37°C плюс або мінус 2°C з 5% CO₂, і клітини спостерігали після 4 днів. Найнижче розведення трипсину, що не показує або незначний ефект на здоров'я клітин, відбирали як відповідну концентрацію трипсину, щоб використовувати та для ізоляції і для оптимізації гриппозної інфекції. Бажано, щоб була незначна варіація або, щоб була відсутня між лунками, інкульованими в межах кожної концентрації.

20 Для клонування граничного розведення вірусу в клітинах Vero використовувася конфлуентний моношар, звичайно 3-4 денний; культивували при 96 лункових мікротестових планшетах Falcon. Клітини були отримані від ATCC CCL 81 і використовувалися між пасажами 132 й 156.

Одержання клітин Vero з рідкого азоту (LN₂) було наступне: одна ампула клітин Vero була 25 вилучена від LN₂ і танула при 36°C плюс або мінус 2°C на водяній бані. Весь зміст пробірки введений піпеткою в 25 см² флакон культури тканини, що містить 10 мл середовища культури клітини, збагаченого 10% ембріональною бичачою сироваткою. Флакон інкубували при 36°C плюс або мінус 2°C в 4-6 % CO₂. Приблизно після 1 години супернатант і нез'єднані клітини м'яко вилучали і додавали 10 мл свіжого культурального середовища тканини. Клітини були 30 культивовані при 36°C плюс або мінус 2°C в 4-6 % CO₂, поки 90-100 % злиття не було досягнуто.

Пасаж клітин Vero був наступним: моношари промивали, використовуючи 10-20 мл PBS протягом приблизно 3 хвилин. PBS фільтрували і заміщували 3 мл EDTA-Трипсином (Cellgro, Catalog No. 98 102-CV), моношар культивували протягом приблизно 3 хвилин або поки клітини 35 були відділялися від флакону. Суспензію розчиняли, додаючи 17 мл одержаного культивувального середовища (що містить PBS), щоб розчинити та нейтралізувати трипсин. Клітини були потім полічені, використовуючи гемоцитометр, щоб визначити кількість клітини на мл суспензії. Число флаконів, які могли бути одержані, використовуючи цю суспензію, було обчислено: Клітини на мл (суспензія) X мл бажаної суспензії = мл з планшета для кожного 40 флакону. Клітини на мл (бажано) Загальні мл суспензії, загальні мл суспензії повинні бути менше доступного об'єму. Якщо щільність клітин посіву не може бути врегульована, щоб пристосувати це, потрібно відзначити, що відрізок часу поки клітини зливаються, буде більше довгим з більш низькою щільністю клітин посіву. Флакони звичайно висівали на планшети, використовуючи суспензію клітин із щільністю клітин 1×10^4 - 1×10^5 клітин на мл. Клітини були 45 культивовані протягом 3-4 днів, або до злиття.

Ці способи для підтримки та розмноження клітин Vero були так само застосовані до інших клітинних ліній, таких як клітини Madin Darby собачої нирки (MDCK) і HEK 293 (клітини ембріональної нирки людини).

Клітини HEK 293, які особливо прийнятні для розмноження вірусних ізолятів, клонували. 50 Цей субклон HEK 293, позначений GT-D22 (або D22), був ізольований від початкового препарату Клітин HEK 293 (ATCC No. CRL-1573; Партія ATCC No. F-11285 при Пасажі 33). Клітини HEK 293 були субклоновані й відібрані на основі поліпшеної продуктивності рекомбінантного аденовірусу Типу 5, що несе ген для експресії р53. Клон, що мають нормальну морфологію та адекватні темпи росту, були трипсинизовані і посіяні - $1-2 \times 10^6$ 55 клітин на лунку для подальшого аналізу. Головні клони продукування були піддані подальшому субклонуванню й відбору. Субклон D22 був нарешті відібраний. Здатність субклона D22 до розмноження грипу була продемонстрована, використовуючи Вірус Грипу Свині (SIV).

Обережності біологічної безпеки були дотримані, працюючи з живим вірусом грипу. Грип - етіологічний агент 2 класу і рекомендації, знайдені в ЦКЗ (центр контролю захворювань) - NIH, 60 Публікація NNS, No. (ЦКЗ) 88-8395 (Біологічна безпека в Мікробіологічних й Біомедичних

Лабораторія) для того, для послідуочого маніпулювання вірусом у лабораторії.

ПРИКЛАД 3: Клонування методом серійних розведень

Одержання пробірок розведення й зразка розведення для клонування граничного розведення була наступні. Пробірки (12 x 75 мм) були встановлені в стійках і маркіровані. 1 зразок - на планшет і серії розведення для кожного зразка були 10^{-1} - 10^{-10} . Середовище розведення було розподілено в кількості 1,8 мл на кожну пробірку, використовуючи серологічну піпетку. Перша пробірка була маркірована вірусною ідентифікацією. Кілька додаткових пробірок були одержані до використання як контроль розведення й для заміщення, якщо які-небудь помилки будуть одержані під час розведення. Зразки струшували протягом приблизно 5 секунд, потім початкове розведення було зроблено, вносячи піпеткою 200 мкл зразка в 10^{-1} пробірку розведення. Серійні розведення були продовжені до 10^{-10} . Для кожного розведення зразок струшували і наконечник піпетки замінювали між розведеннями.

Розбавлення переносили на планшети з клітинами таким чином. Негайно до використання, середовище асептично зливали з планшетів з клітинами. Кожну лунку промивали, використовуючи піпетор з 12 каналами 2-3 рази з 280 мкл стерильного PBS. Планшети опорожнювали в асептичних умовах, але їм не дозволяли висохнути. Планшети були маркіровані вірусною ідентифікацією, датою, і схемою розведення. Кожне розведення було швидко струшене до додавання до планшетів. Використовуючи моторизований Finn timer або інший відповідний піпетор з 1000 мкл наконечником, 200 мкл на лунку зразка інокулювали в єдиний ряд планшета. Зразки були завантажені відповідно до вірусної концентрації. По-перше, 2 ряди контрольного розведення додавали до планшетів, з наступним найвищим розведенням вірусу (10^{-10}) і залишали з залишками зразків. Зразки були завантажені в послідовності від 10^{-1} до 10^{-10} .

ПРИКЛАД 4: Одержання вірусу

Збір вірусу та CPE оцінювали наступним способом. Після 4-денного інкубаційного періоду цитопатичний ефект (CPE) аналізували мікроскопічним дослідженням. Присутність продуктів розпаду клітин, поява мертвих клітин і нестача життєздатних клітин використовувалися, щоб характеризувати CPE, тому що вони типові для вірусу грипу. Іноді невизначена інтерференція спостерігалася в початкових вірусних розведеннях, тому було важливо досліджувати кілька розчинень для CPE. Оцінюючи CPE було важливо визначити ступінь CPE у лунках найвищого розведення, що демонструють CPE. Найвищі рівні успіху були досягнуті, вибираючи лунки зразка найвищого розведення, що показують CPE, але ті лунки, перевага яким була надана або лунки, які показали найменший ступінь CPE. Після відбору, вміст лунок збирали використовуючи одноканальну 1000 мкл піпетку для аспірації рідини. Звичайно, рідина була взята піпеткою повторно, щоб видалити прикріплені клітини з дна лунки та допомогти зруйнувати будь-які скупчення клітин або вірусу в суспензії. Зібрані рідини потім використовувалися, щоб виконати додатковий цикл, або цикли клонування методом серійних розведень або іноді використовувалися, щоб інокулювати свіжий моношар для одержання посіву після клонування. Звичайно здійснювали 2-3 цикли клонування методом серійних розведень в безпосередній послідовності, щоб одержати однорідну популяцію вірусу. НА титр був проаналізований на кожній стадії процесу і результати показані у Таблиці 1.

A/Indonesia/05/2005 (INDOH5N1), A/Vietnam/1203/04 (VNH5N1), A/New Caledonia/20/99 (A/NC/20/99 (R)), і A/Wisconsin/67/05 (A/Wis/67/05R) є рекомбінатними вірусами грипу, наданими ЦКЗ (центр контролю захворювань). Для рекомбінантних вірусів гени, що кодують поверхневі глікопротеїни HA і NA - від штамів грипу (INDOH5N1, VNH5N1, A/New Caledonia/20/99 ii A/Wis/67/05), у той час внутрішні гени залишаються від A/PR/8/34. Клонування методом серійних розведень застосовували до дикого типу (без рекомбінованого PR8), штам грипу A/New Caledonia/20/99 (A/NC/20/99), A/Wisconsin/67/05 (A/Wis/67/05) і B/Malaysia/2506/04. Віруси були одержані при використанні зворотних генетичних способів і пасажів у яйця ембріонів, що розвиваються. Матеріали яйця безпосередньо використовувалися для клонування граничного розведення в клітинах Vero (процедура для HA титрування показана у Прикладі 5).

Таблиця 1

НА Титр* до і після клонування граничного розведення (КГР, LDC)						
штам грипу	Оригінальні **	До ***	Після 2-ого	Після 3-го	Роллер-флакони	Біо реактор
Indo5N1	20 480	160	1 280	2 560	5 120	7 680
VNH5N1	2560	<40	640	1 280	5 120	7 680
A/NC/20/99	5 600	640	1 280	-----	-----	-----
A/NC/20/99 (R)	10 240	1 280	1 280	-----	2 560	10 240
A/Wis/67/05 (H3)	2 560	640	1 280	-----	-----	-----
A/Wis/67/05 (H3R)	7 680	640	1 280	-----	2 560	5 120
B/Malaysia/2506/04	2 560	<40	640	-----	-----	5 120

*НА Титр, виражений як Од./мл. ** НА титр матеріали курячого ембріону, забезпеченого ЦКЗ. *** НА титр від клітин Vero, інфікованих безпосередньо матеріалом курячого ембріону, забезпеченого ЦКЗ .

Як помічено у вищезгадуваній Таблиці 1, система клітинної культури може продукувати вірусний титр, такий же високий, як і яйця ембріонів, що розвиваються. Додатково, вірусні штами, які не показали виявленого культивування на клітинах Vero на початку, VNH5N1 і B/Malaysia/2506/04, могли бути адаптовані, щоб рости на клітинах Vero, шляхом клонування методом серійних розведень. Розмноження VNH5N1 і B/Malaysia/2506/04 в амніотичній мембрані яєць до клонування методом серійних розведень поліпшували адаптацію цих вірусів до культивування на клітинах Vero.

Використовуючи SRID (однократна променева імунодифузія) для кількісного визначення гемаглютиніну, до 132 мкг/мл гемаглютинінового протеїну одержали для B/Malaysia/2506/04 у сконцентрованому середовищі культури клітини Vero. Вихід в мкг НА/мл культури був 10х краще, ніж відомі опубліковані способи, використовуючи клітини Vero. У цей час, доза людської вакцини еквівалентна приблизно 15 мкг/штам вірусу. Тому, приблизно 8-9 доз можуть бути отримані з одного мл сконцентрованого середовища культури клітини Vero.

ПРИКЛАД 5: Пасаж грипу через амніотичну мембрану поліпшує здатність вірусу до культивування на клітинах культури тканини

Вірус грипу VNH5N1-PR8/ЦКЗ-RG був отриманий від ЦКЗ. Це - рекомбінований вірус, складений з H5 і N1 генів від В'єтнамського штаму вірусу пташиного грипу H5N1 на основі вірусу PR8. Цей вірус бу поширений в 11-денних курячих ембріонах, інюкульованих у алантоїдну порожнину. Алантоїдна рідина була зібрана через 2-3 дні після інюкляції і мала вірусну продуктивність 2560 од. гемаглютиніну (HAU) / мл.

Алантоїдна рідина (~200 мкл) була розчинена в 5 мл DMEM, що містить 1,25 мкг/мл Трипсину IX типу, і дозволяла їй абсорбувати конфлуентний моношар клітин Vero (ATCC CCL No. 81 при пасажі 147) протягом 60 хвилин при $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Культури підживлювали DMEM 25 мл, що містить 1,25 мкг/мл Трипсину IX типу, і культивували протягом 3 днів і збирали супернатанти культури. У зібраних рідинах не виявляли ніякої активності гемаглютиніну.

Алантоїдні рідини, що містять вірус розводили 1:10,000, і інюкульовали 100 мкл в алантоїдну порожнину та амніотичну мембрану 11 денних курячих ембріонів. Яйця інкубували при приблизно 39°C протягом трьох днів та алантоїдну та амніотичну рідини збирали окремо.

Клітини Vero (пасаж 132-152) висівали в 96-лункові планшети при 1×10^4 - 1×10^5 клітин/мл, 200 мкл/лунку в DMEM, що містить 5% ембріональну бичачу сироватку та культивували протягом 3-4 днів (до злиття) при $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 3-5 % CO_2 . Вірус VNH5N1 в алантоїдній або амніотичній рідинах був послідовно розведений 10^{-1} - 10^{-10} в DMEM, що містить 1,25 мкг/мл Трипсину IX типу. Середовище вилучали від клітин Vero, лунки промивали 280 мкл фосфатним сольовим буфером, і потім 200 мкл кожного розведення вірусу інюкульовали в 8 реплікаційних лунок. Планшети інкубували протягом 4 днів при $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 3-5 % CO_2 . Амніотичної рідини надали вірус, що ріс до більш високих титрів на клітинах Vero, як засвідчено цитопатичними ефектами до 10^{-9} розчинень для вірусу з амніотичного джерела в порівнянні з 10^{-7} розведенням для вірусу з алантоїдного джерела (див. Таблиця 2). Вірус від однієї лунки при найвищому розведенні, що показує цитопатичні ефекти, був зібраний і клонований методом серійних розведень в другий раз. Знову, вірус з амніотичного джерела показав цитопатичні ефекти при більш високих розведеннях, ніж вірус з алантоїдного джерела (приблизно в 10 разів більше вірусу).

Таблиця 2

Серійні розведення Пасаж 1

Вірус алантоїдної рідини
Розведення Цитопатичний ефект

10^{-10}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	+	+	-	+	-	-	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+
	A	B	C	D	E	F	G	H

Вірус з лунки H7 був зібраний

Вірус амніотичної рідини
Розведення Цитопатичний ефект (+присутній)

10^{-10}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	+	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	+	+
10^{-7}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+
	A	B	C	D	E	F	G	H

Вірус з лунки G9 був зібраний

Серійні розведення Пасаж 2

Алантоїдний H7 клон
Розведення Цитопатичний ефект

10^{-10}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	-	-	-	-	-	+	-	-
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+
	A	B	C	D	E	F	G	H

Вірус з лунки H3 був зібраний

Амніотичний клон G9
Розведення Цитопатичний ефект (+ присутній)

10^{-10}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+
	A	B	C	D	E	F	G	H

Вірус з лунки G4 був зібраний

Серійні розведення Пасаж 3

Алантоїдний H7N3 клон
Розведення Цитопатичний ефект

10^{-10}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	-	+	+	-	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+
	A	B	C	D	E	F	G	H

Вірус від лунок B4 й F4 був зібраний

Амніотичний клон G9G4
Розведення Цитопатичний ефект(+ присутній)

10^{-10}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+
	A	B	C	D	E	F	G	H

Вірус від лунок C5 & G5, був зібраний

5

Клони грипу, у Таблиці 2, ідентифікували базуючись на комбінації позначення колонки A-H і

ряду 1-10 (серії розведення 10^{-1} - 10^{-10} , відповідно). Наприклад назва клону В4 представляє вірус, зібраний з лунки, знайдений у колонці В і ряді 4 (10^{-4} розведення).

Вірус, зібраний від третього серійного розведення (~100 мкл), розводили в 5 мл DMEM, що містить 1,25 мкг/мл Трипсину IX Типу і інокулювали у конфлуентні клітини Vero (пасаж 132-152) і культивували протягом 60 хвилин при $36\pm 2^{\circ}\text{C}$. Після абсорбції додавали 45 мл DMEM, що містить 1,25 мкг/мл Трипсину IX Типу, і культури інкубували протягом чотирьох днів при $36\pm 2^{\circ}\text{C}$. Зібрані супернатанти культури тестували на гемаглютинін, і обидва клони, отримані з амніону, привели до у чотири - вісім разів більш високого виходу НА вірусу (див. Таблиця 3).

Таблиця 3

Джерело вірусу	Позначення Клону	Вихід (HAU/мл)
Алантаїдна рідина	H7N3F4	320
	H7N3B4	160
Амніотична рідина	G9G4C5	1280
	G9G4G5	1280

Вірус G9G4C5 був згодом підданий експансії культивуванням у клітинах Vero у роллер-флаконах (вихід 5120 HAU/мл), і у 5-літрових біореакторах (вихід 7680 HAU/мл).

Подібні результати були отримані з типом В вірусу грипу, B/Malaysia/2506/04. Цей вірус також був не в змозі привести до будь-якого вимірюваного гемаглютиніну, коли вірус, отриманий з алантаїдної рідини, був розмножений у клітинах Vero. Однак, вірус, отриманий амніотичної експансії, привів до 640 HAU/мл після двох клонувань серійного розведення та 5120 HAU/мл після експансії в 5-літровому біореакторі.

ПРИКЛАД 6: Кількісний аналіз гемаглютиніну

Ціль цієї процедури - кількісне визначення гемаглютинінової активності вірусу грипу у вірусних рідинах у кінцевому продукті.

Використовувані матеріали включали: PBS, Cambrex, 517-16Q або еквівалент, Розчин Alsevers, E8085 або еквівалентні, свіжі еритроцити півня в розчині Alsevers (1:1 відношення). Дозволяли відстоюватись протягом ночі в Alsevers, щоб стабілізувати рецептори. Промивали 2 рази та зберігали як 10% суспензію в PBS, або як 50% суспензію в Alsevers. Використовували протягом 4 днів після збору, Мікротитрувальні планшети, Falcon U-подібні планшети, Catalog No. 3911 або еквівалент, 8 канална мікропіпетка, 5-50 мкл, або еквівалент, центрифуга Beckman TJ-6, або еквівалент, 20-200 мкл мікропіпетка або еквівалент, доступні 200 мкл наконечники піпетки, Позитивний вірусний контроль з відомим титром, інактивованій антиген. Зберігали при $2-7^{\circ}\text{C}$ і використовували як є в день тестування.

А. Стандартизована 0,5 % суспензія півнячих еритроцитів (rRBC) в PBS була одержана першим дозволом rRBC розчину зрівноважитися до кімнатної температури ($15-30^{\circ}\text{C}$). Півнячі еритроцити в Alsevers мали 4-денний експіраційний період від дати забору. Достатній об'єм rRBC's в Alsevers переносили в 50 мл конічну пробірку центрфуги. rRBC's промивали, заповнюючи пробірку до мітки 45 мл PBS або Alsevers і змішували, інвертуючи пробірку кілька разів, потім центрифугували при 400 x g, при 4°C протягом 10 хвилин. Супернатант вилучали піпеткою. Якщо був який-небудь гемоліз у супернатанті, стадію промивання повторювали до трьох раз. Після заключного промивання 0,25 мл упакованих півнячих RBCs були додані до PBS 49,75 мл й були інвертовані, щоб змішатися. Суспензію клітин маркірували датою одержання, номером використовуваної серії PBS, і 0,5 % півнячі еритроцити у PBS, зберігали при $2-7^{\circ}\text{C}$ (максимальний час зберігання становить 4 дні).

В. Кількість мікротитрувальних планшетів, необхідних, для тестування матеріалу зразка, була визначена. Всі тестові зразки були перевірені, використовуючи два ряди, кожний з 1:2 й 1:3 схемою розведення. Два ряди позитивного вірусного контролю в 1:2 схемі розведення й два ряди, як PBS контроль також використовувалися. Інші зразки тестували за необхідністю. Використовуючи чорний перманентний маркер, позначали ряд на мікротитрувальній пластині. Приклад показаний нижче як Таблиця 2.

Таблиця 2

Мікротитрувальний планшет

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Серійний No.	A	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
1:2 Розведення	B	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Серійний No.	C	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
1:3 Розведення	D	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Вірусний позитивний контроль	E	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
1:2 Розведення	F	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
PBS	G	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
PBS	H	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

50 мкл PBS додавали до кожної лунки мікротитрувального планшета. Додаткові 50 мкл PBS додавали у лунку No. 1 з тих рядів, використовуючи 1:3 схему розведення й PBS ряди контролю. Кожний мікротитрувальний планшет від точки додавання зразка до додавання rRBC's був заповнений перш, ніж перейти до наступного мікротитрувального планшета. 50 мкл зразка та позитивного вірусного контролю додавали до лунки одного з обумовлених рядів. Серійні двократні розведення зразків були одержані, використовуючи багатоканальну піпетку, переносячи 50 мкл аліквоти. Прийнятні наконечники асептично виштовхувалися у багатоканальну піпетку, запевняючи, що піпетор був встановлений на 50 мкл вміст лунки однієї колонки змішували витягненням і видаленням матеріалу мінімум сім разів. Від наконечника, використовуюваного для того, щоб змішати, відмовилися. Багато наконечників виштовхувалося, і 50 мкл матеріалу в кожній лунці переносили до наступних лунок колонки. Ці стадії повторювали, поки всі ряди не були послідовно розбавлені. Видалення 50 мкл з ряду дванадцять мікротитрувального планшета було гарантовано. 50 мкл 0,5 % rRBC суспензії було доставлено у кожну лунку, використовуючи мультиканальний піпетор. Суспензію rRBC додавали від лунок найвищого розведення до найнижчого розведення. Кожний планшет м'яко струшували, щоб змішати вміст.

Кришку поміщали надмірно на мікротитрувальний планшет і планшети складали й культивували при кімнатній температурі (приблизно 20-25°C) протягом 45-60 хвилин.

Після інкубаційного періоду планшети встановлювали на оглядовому мікротитрувальному планшеті, щоб зчитати та визначити, чи є контрольні лунки PBS прийнятними (лунки PBS не повинні показувати гемаглютинацію). Особливості були також визначені. RRBC's, повинні осаджуватися як повний бутон без будь-яких дисків. Реакція диску - дисперсія rRBC's. Якщо контрольні лунки PBS були прийнятними, інші лунки були оцінені щодо гемаглютинації. Якщо контрольні лунки PBS не були прийнятними, тест був недійсний і був повторений. Результати гемаглютинації були зареєстровані як позитивні (+) для гемаглютинації, часткові (+/-) і негативні (0). Позитивна реакція показала повний диск або повну дисперсію rRBC клітин. Негативна реакція показала повний бутон, сформований rRBC. Лунки, що показали "+/-" розглядалися як негативні з метою обчислення кінцевої крапки. Найвище розведення, при якому відбулася гемаглютинація (без бутону) було ідентифіковано для кожного реплікату кожного розведення (тобто 1:2 й 1:3), і титри були обчислені як інверсія останнього розведення, що демонструє повну гемаглютинацію. Рівень титру зразків і перевіреного позитивного вірусного контролю був ідентифікований. Середнє арифметичне титру кінцевої крапки кожного набору подвійних розчинень було визначено. Одиниці HA на 0,5 мл (50 мкл) зразка, PBS й позитивного вірусного контролю були також визначені. Одиниці HA на 1 мл обчислювали множенням значення 0,05 мл на 20.

Обчислення було виконано таким чином: для кожного 1:2 й 1:3 розведення тестового зразка, було зареєстроване середнє арифметичне дублікатів. Найвищий титр був зареєстрований. $HA/0,05 \text{ мл} \times 20 = HA/1 \text{ мл}$ був помножений. Від Тестової Дати та Результатів як Одиниці HA в 1 мл (вірусні рідини) або Одиниці HA на дозу (кінцевий продукт) були зареєстровані. Дійсний тест на основну масу або кінцеві продукти включає повну гемаглютинацію (без бутону) при найнижчому розчиненні й без гемаглютинації (бутон) при найвищому розбавленні. Партія позитивного контролю повинна бути в межах установленого діапазону. Діапазон титру поза перерахованими параметрами становить «нема тесту» або недійсний тест і повинен бути повторений неупереджено.

ПРИКЛАД 7: Виробництво вакцини

Вірусний штам - пандемічний штам або сезонні штами, визначені ВОЗ, ЦКЗ, або іншими державними організаціями. З метою ратифікації виробничого процесу людської вакцини, гібридний вірус грипу VNH5N1-PR8/ЦКЗ-RG використовується еталонний штам, наданий ЦКЗ (центр контролю захворювань). Фосфатний сольовий буфер використовується як розбавник для вакцинного препарату та ISCOM як ад'ювант. Ліпідна суміш рівних частин холестерину та фосфатидилхоліну використовується, щоб сприяти гідрофільному/гідрофобному комплексоутворювальному процесу в утворенні ISCOM. Неіонний детергент, що використовується для деградації вірусу, був вилучений діафільтрацією. Утворення ISCOMS перевірене електронною мікроскопією. Бінарний етиленімін (BEI) використовується, щоб інактивувати вірус, і потім BEI нейтралізують тіосульфатом натрію. Процес викладений більш докладно на стадіях 1-19 нижче.

Штам грипу одержували у Vero (нірка африканської зеленої мавпи) клітинах, інактивували азиридиною сполукою бінарного етиленіміну (BEI), концентрували, очищували й очищували фільтрацією й гель-хроматографією. Вірус одержували з ад'ювантом з Quil A і ліпідною сумішшю, щоб одержати медикамент.

Стадія 1A - клітини Vero відновлювали від Робочого Банку Клітини (WCB, Working Cell Bank). Кількість пасажів була обмежена 20 пассажами від Основного Банку Клітини (MCB). Одна ампула від WCB танула у рідкому азоті й засіяна при $4-5 \times 10^4$ клітин/см² у Зміненому Мінімальному Основному Середовищі Dulbecco's (DMEM), що містить 20 % об/об опроміненої ембріональної бичачої сироватки новозеландського або австралійського походження, 4 мМ L-глутаміну (звичайно) у 25 см² флаконі Nunc. Флакон інкубували при 36°C плюс або мінус 2°C, супернатант і незв'язані клітини вилучені приблизно після 1 години, і флакон повторно підживлювали свіжим середовищем й культивували як раніше.

Стадія 2A - експансію клітин продовжували, збираючи конфлуентні моношари, використовуючи розчин Трипсин/EDTA і клітини пересаджували в більшу кількість статичних флаконів або роллер-флаконів. Подальша експансія може бути виконана в біореакторах за допомогою мікроносіїв при 20-30 г/л.

Стадія 3A - Коли бажаний об'єм продукування субстрату культури досягається або в біореакторі або в роллер-флаконах, клітини промивають двічі зі Зміненим Мінімальним Основним Середовищем Dulbecco's (DMEM), щоб видалити залишкову сироватку, що інактивує трипсин у середовищі інфекції.

Стадія 1B - Робочий Посів Вірусу (WVS, Working Virus Seed) одержували окремо та заморожували перед великомасштабним виробництвом. Основний посів вірусу або Робочий Посів Вірусу (MSV+1), зберігали при -70°C, піддавали таненню й розводили у середовищі вірусної інфекції, що містить Тип IX свинячий трипсин, щоб досягти бажаної кратності інфікування (KI). Визначений об'єм інокулювали у моношар конфлуентних клітин Vero у роллер-флаконах або біореакторі й культивували при 36°C плюс або мінус 2,0°C, звичайно протягом 40-72 годин, до 100% ідентифікування цитопатичного ефекту. Вірус збирали і заморожували при -50° або більше.

Стадія 4 - Робочий посів вірусу (не вище, ніж пасаж MSV+2) піддавали таненню й розводили у середовищі вірусної інфекції, що містить 0,5-5,0 мкг/мл Свинячий Трипсин Тип IX, щоб досягти бажаної кратності інфекції. Використання трипсину в середовищі сприяє з'єднуванню й проникненню вірусу в клітину.

Стадія 4A-одержання вірусу грипу, використовуючи біореактор. 5-літровий біореактор був одержаний із SoloHill Plastic Plus мікроносіями при щільності 30 г/л. Біореактор засівали при 2×10^5 клітин Vero/мл у Зміненому Мінімальному Основному Середовищі Dulbecco's з 5 % об/об опроміненої ембріональної бичачої сироватки новозеландського або австралійського походження, 4 мМ L-глутаміну та культивували при 36°C плюс або мінус 2°C. Після того, як конфлуентність клітини досягала 80-100 %, мікроносії, що містять клітини Vero, осаджували і двічі промивали 2 літрами на промивання DMEM без сироватки. Середовище інфекції, що містить 2,5 мкг/мл трипсину IX додавали у біореактор. Вірусний посів, наприклад VNH5N1, також додавали у біореактор при кратності інфікування (KI) 0,0001-0,0003. Одержання вірусу продовжували протягом 5 днів. Зразки з біореактору брали щодня для спостереження CPE і НА титрування. Вірус збирали після того, як досягався 80-100% CPE .

Стадія 5 - бінарний етиленімін (BEI) додавали до зібраного вірусу, щоб одержати кінцеву концентрацію 1,5 мМ і зберігали при 36°C плюс або мінус 2°C протягом 1 години (струшуючи) при pH 7,3 плюс або мінус 0,3.

Стадія 6 - після завершення стадії 5, зібраний матеріал переносили у другу судину, і процес інактивації продовжували при 36°C \pm 2°C протягом 48 годин (струшуючи). Після цього додавали тіосульфат натрію до кінцевої концентрації 3 мМ, щоб нейтралізувати будь-який залишковий

BEI.

Стадія 7 - культуру очищували через 7 мк і 1 мк фільтр і зберігали при 2°C - 8°C очікуючи кліренс нетоксичності. Виконання тесту нетоксичності займає десять днів.

5 Стадія 8 - Антиген концентрували, використовуючи тангенціальний потік, системи ультрафільтрації, використовуючи полісульфонову мембрану з молекулярною масою (MWCO) 100 K. Приблизно до 50 разів досягається концентрат.

Стадія 9 - одержані концентровані рідини культури врівноважені у відповідному буфері та оброблені дезоксирибонуклеазою (Бензоназою) для деградації клітинної ДНК.

10 Стадія 10 - концентрат очищували, використовуючи ексклюзійну гель-хроматографію. Гель, використовуваний у цей час, є поперечно-зшитим сефарозою (CL-2B, Pharmacia). Колонка - 90 см у довжину, щоб досягти необхідного поділу. CL-2B - м'який гель, для підтримки, що залежить від стінки колонки. Звичайно, довжина 90 см досягнута послідовними 2 x 45 см або 3 x 30 см колонками (наприклад, 30-32 см - висота, 30 см - діаметр). Сконцентрований вірус застосовують при приблизно 5-7 % від об'єму колонки.

15 Стадія 11 - Піковий вірусний матеріал повторно концентрували, використовуючи настільні ваги системи ультрафільтрації тангенціального потоку з 100 K MWCO полісульфоною мембраною.

20 Стадія 12 - реконцентрований піковий вірусний матеріал солюбілізують, додаючи 5 мл з 10 % (ваг./об) розчин детергенту Мега 9 (Нонаноїл-N-Метилглюкамід) до 200 мл розчину антигену. Розчин повільно перемішували магнітною мішалкою протягом 1 години при 20-25°C у скляному контейнері.

25 Стадія 13 - Ліпідну суміш додавали в кількості 50 мкл на 20 мл реконцентрованого вірусного піка. Ліпідна суміш містить 10 мг/мл, фосфатидилхоліну і холестерину, виділених з яйця. Перемішування продовжували при 20-25°C, щоб гарантувати розподіл ліпідів у вірусі. Quil A (10 % ваг./об від вихідного розчину) додавали, щоб отримати кінцеву концентрацію 0,05 %. Розчин перемішували протягом приблизно 30 хвилин при 20-25°C.

30 Стадія 14 - детергент Мега 9 вилучали з цієї суміші (щоб дозволити утворитись ISCOM) діалізацією з 50 мМ ацетатом амонію. Це виконано, використовуючи настільні ваги системи ультрафільтрації тангенціального потоку з 100 K MWCO полісульфоною мембраною. Об'єм використовуваного ацетату амонію є мінімумом приблизно 10X об'ємом реконцентрованої пікової вірусної суміші. Діалізація діє, підтримуючи постійний об'єм усюди, урівноважуючи подачу та проникність потоку. Детергент інтерферує з утворенням ISCOM. Електронною мікроскопією перевіряли, що типові подібні до клітини структури були утворені.

35 Стадія 15 - ISCOM реконцентрували як заключну стадію діалізації.

Стадія 16 - після задовільного вивільнення QC, серії ISCOMs утворені, щоб одержати вакцину в 1-20 мкг НА людського грипу на 1 мл дози. Фосфатний сольовий буфер (PBS) використовують як розбавник.

40 Стадія 17 - змішану вакцину заповнювали в єдині контейнери заключної дози при умовах класу А. Бнали зразки на стерильність, безпеку щодо видів лабораторних тварин, екстракційний об'єм й візуальні ознаки. Вакцину маркірували та упаковували та витримували при карантині від 2 ° до 7°C.

Стадія 18 - Після заключного QA очищення, продукт переносили до холодильної камери (2 °-7°C) готових виробів, що чекають відправлення.

ПРИКЛАД 8: ефективність вакцини, виділеної від клітин vero у тхорів

45 Здатність вакцини, виділеної від клітин Vero до сероконверсії у тхорів була оцінена. Тривалентна людська вакцина грипу, заснована на 2006-2007 сезонних штаммах грипу (A/NC/20/99, A/Wis/67/05, обидва - PR8 гібриди та B/Malaysia, всі отримані від ЦКЗ), була одержана в клітинах Vero після клонування граничного розведення. Одержана вакцина, "SPflu0607", з або без ад'юванта ISCOM, була введена в ліву ногу самки тхора 4-6 місячного віку. Як порівняння контролю, комерційно доступні людські вакцини грипу Fluzone® (виготовлені Sanofi-Pasteur) і Fluvirin® (виготовлені Chiron) були перевірені щодо SPflu0607, Однократна променева імунна дифузія (SRID) використовувалася, щоб визначити кількість Гемаглютиніну (НА) у вакцині. Сероконверсію у тхорів визначали інгібуванням гемаглютиніну (HI). HI титри більше або еквівалентні 1:40 вважали позитивними. Див. Таблицю 3.

55

Таблиця 3

Дні після вакцинації→	14 днів		28 днів		60 днів		90 днів	
Вакцина	ГЗТ	% Позитивний	ГЗТ	% Позитивний	ГЗТ	% Позитивний	ГЗТ	% Позитивний
SPflu0607+ISCOM 7,5 мкг/мл	403	100	118	89	40	56	29	56
3,8 мкг/мл	1186	100	254	100	127	100	54	67
1,9 мкг/мл	274	100	93	89	50	67	25	44
SPflu0607 15 мкг/мл	118	67	43	67	29	56	20	33
7,5 мкг/мл	137	89	52	78	23	44	16	44
Chiron 15 мкг/мл	131	89	66	78	27	56	16	33
7,5 мкг/мл	148	78	63	67	32	56	29	56
Sanofi 15 мкг/мл	101	89	101	89	25	44	15	22
7,5 мкг/мл	135	88	80	88	28	50	12	25
PBS самостійно	7	0	6	0	6	0	5	0

ГЗТ = Геометричне значення титру антитіл

% Позитивний = Відсоток тварин із HI рівнями антитіл $\geq 1:40$

5

Вищезгадані результати вказують, вакцина, виділена з клітин Vero порівнянна комерційно доступній вакцині, виділеній з яйця.

Приклад 9: Спосіб розмноження собачого вірусу грипу для одержання вакцини CIV

Вірус собачого грипу виділяли з назального секрету хворої собаки. Назальні мазки були взяті й поміщені в 2 мл культуральних середовищ тканини, що містять гентаміцин та амфотерицин. 0,8 мл одержаного матеріалу мазка інокулювали у конфлуентні клітини нирки собаки Madin Darby (MDCK) в 10 мл середовища культури тканини DMEM, що містить 1,3 мкг/мл трипсин IX типу і культивували протягом 2 днів при $36\pm 2^\circ\text{C}$. Флакон збирали декантуванням середовища, і вірус був ідентифікований як H3N8 Національною Ветеринарною Державною Лабораторією, використовуючи стандартні антисироватки. MDCK пасирований вірус містив 160 одиниць гемаглютиніну на мл. Вірус клонували інокуляцією 10-кратних серійних розведень конфлуентні MDCK клітини в 96-лункові планшети, і збирали однократно лунку при найвищому розбавленні, показуючи цитопатичні ефекти (середовище культури тканини - DMEM, що містить 1,3 мкг/мл трипсин IX типу). Ця процедура була повторена в другий раз. Клон потім піддавали експансії клітин MDCK у 75 см^2 флаконах. Одержаний вірус (пасаж 4) надав вихід 640 одиниць гемаглютиніну на мл. Вірус потім піддавали пасажу у клітини MDCK, інокуляцією при 0,23 кратності інфікування (KI) у конфлуентний моношар у 1050 см^2 роллер-флаконах, використовуючи 300 мл DMEM, що містить 0,8 мкг/мл трипсину IX типу. Роллер-флакон інкубували протягом 3 днів при $36\pm 2^\circ\text{C}$. Зібраний надав вихід 2560 HAU/мл. Через збільшений вихід НА на клітинах MDBK, ця лінія клітини була обрана для збільшеного масштабу вірусу для вакцинного препарату. Вірус був розмножений у біореакторі. 5Л біореактор засівали клітинами MDBK при $3,0 \times 10^5$ клітин/мл, з'єднаних з мікроносіями Cytodex III при 5 грамах на літр. Клітини культивували протягом 4 днів в DMEM, що містить 5% ембріональну бичачу сироватку без антибіотиків при $36\pm 2^\circ\text{C}$. Після врегулювання мікроносіїв, 90 % середовища вилучали та заміняли DMEM без сироватки. Тип IX трипсину, додавали до концентрації 10 мкг/мл у заключних 5 000 мл. Клітини інфікували вірусом при кратності інфікування (KI) 0,01. Вірус інкубували з клітинами MDBK на мікроносіях протягом 2 днів при $36\pm 2^\circ\text{C}$, і потім збирали супернатант. Одержаний вірус надав вихід 10 240 HAU/мл.

ПРИКЛАД 10: Клонування методом серійних розведень клінічного ізоляту без пасажу у яйця створює однорідну популяцію і покращує TCID₅₀/мл і НА титр

Вірус собачого грипу H3N8 (дикий тип) був отриманий з діагностичної лабораторії і ізольований з назального мазка. Після отримання назальний мазок обробляли і використовували для інокуляції у 25 см^2 флакон, що містить конфлуентний моношар клітин

MDCK. Середовище інфекції складалося з наступних: DMEM, 4-мМ L-глутамін/мл, 1,3 мкг/мл трипсин IX типу і гентаміцин. Флакон інкубували при $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ з 3-5 % CO_2 і збирали на початку CPE. НА дослідження було попередньо сформоване на зібраній рідині з виходом 160 HAU/мл і титром $\text{TCID}_{50}/\text{мл}$ 7,94,

Клітини MDCK інокулювали в 96-лункові планшети 1 x від 10^4 - 1 x 10^5 клітин/мл, 200 мкл/лунку в DMEM, що містить 5% ембріональну бичачу сироватку та культивували протягом 3-4 днів (до злиття) при $36\pm 2^{\circ}\text{C}$, 3-5 % CO_2 . CIV H3N8 вірус розводили, як визначено в розділі: серійних розведень, цикл 1. Розбавлення були виконані в DMEM, що містить наступні: 1,3 мкг/мл Трипсин IX типу, 4-мМ L-глутамін, і гентаміцин. Середовище вилучали від клітин MDCK, лунки промивали 280 мкл фосфатним сольовим буфером, і потім 200 мкл кожного розведення вірусу інокулювали в 8 реплікаційних лунок. Планшети інкубували протягом 4 днів при $36\pm 2^{\circ}\text{C}$, 3-5 % CO_2 . Два цикли клонування методом серійних розведень були визначені, циклом серійних розведень негайно після циклу 1 серійного розведення. Процес надав вихід ізоляту вірусу, що продукує вищі $\text{TCID}_{50}/\text{мл}$ й титри гемаглютинації. Вірус з лунки в більш високих розведеннях, що демонстрував найнижчий ступінь цитопатичного ефекту, був зібраний і клонований методом серійних розведень другий раз.

Цикл 1 серійних розведень

Пасаажний матеріал титрували з результатом 7,5 $\text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Використовуючи це значення, вірус розводили, щоб одержати 5 зразків.

- A. 10^{-4}
- B. 10^{-5}
- C. 10 вірусних частинок / лунку ($10^{-6,5}$)
- D. 3 вірусні частинки / лунку ($10^{-7,02}$)
- E. 1 вірусна частинка / лунку ($10^{-7,5}$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Контрольний розбавник	10^{-4}	10^{-5}	$10^{-6,5}$	$10^{-7,02}$	$10^{-7,5}$						
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Лунку A11 збирали для одержання циклу 2 клонування розведення методом серійних розведень.

Серійне розведення, цикл 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Контрольний розбавник	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	Контрольний розбавник
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Вірус з лунки A5 був зібраний

Вірус, зібраний від другого циклу клонування методом серійних розведень (~200 мкл), використовувався, щоб інокулювати 75 cm^2 флакон, що містять конфлуентний моношар клітин MDCK і DMEM, збагачений наступними: 1,3 мкг/мл трипсин IX типу, 4-мМ L-глутамін/мл, і 25 мкг/мл гентаміцин. Зібрану культуру супернатантів титрували, щоб визначити $\text{TCID}_{50}/\text{мл}$ й титр гемаглютинації (див. Таблицю 4).

Таблиця 4

Вірусний Пасаж	TCID ₅₀ /мл	HAU/мл
Пасаж 1 від області ізоляту	7,94	160 HAU/мл
Пасаж 4, пре-базовий посів	7,69	640 HAU/мл

У лабораторних експериментах, виконаних для досліджень імуногенності, вірус культивували на клітинах MDBK в 5л біореакторі з з виходом титру гемаглютинації 10 240 HAU/мл.

ПРИКЛАД 11: Ефективність інактивованої вакцини собачого грипу у собак

Вірус собачого грипу (CIV), серотип H3N8 викликає серйозне респіраторне захворювання у собак. Однак, немає ніякої ефективної вакцини проти CIV, доступної у цей час. Ціль цього дослідження полягає в тому, щоб оцінити ефективність інактивованої вакцини CIV, одержаної серійним розведенням і розмноженням CIV у клітинах культури тканини у профілактиці клінічного захворювання й легневих пошкоджень, викликаних імунізацією вірулентним CIV. Вакцина складається з бінарного етиленіміну (BEI) - інактивованим CIV антигеном з ад'ювантом Emunade® із вхідним рівнем антигену 500 одиниць гемаглютинації (HAU) на дозу. Група з восьми 7-тижневих CIV серонегативних собак була вакцинована внутрішньом'язово вакциною, і ревакцинації проводили через 21 день після первинної вакцинації. Через два тижні після ревакцинації, вакциновані собаки показали значно більш високі рівні титру антитіл інгібування НА в порівнянні з невакцинованими, що демонструє стимуляцію імунної відповіді вакциною у собак. Невакцинований контроль й вакциновані собаки імунізували імунізовані гетерологічним вірулентним ізолятом CIV через 16 днів після ревакцинації, і підлягали щоденному моніторингу протягом 10 днів після вакцинації на клінічні симптоми, ректальну температуру та назальні виділення CIV. Усі контрольні собаки (100 %) показали клінічні симптоми, включаючи очні і назальні виділення, чхання й кашель, що вказує вірулентність вірусу вакцини. Вакцинована група показала істотно нижчі клінічні симптоми (медіана шкали=4,3) порівняно з контрольною групою (медіана шкали=6,8; $p=0,0051$). Тільки одна із собак у вакцинованій групі (12,5 %) показала назальне виділення CIV, і це було тільки протягом одного дня, потім, усі собаки контрольної групи (100 %) мали істотно вище виділення вірусу у порівнянні з вакцинованими ($p=0,0003$). Виділення вірусу протривала протягом 7 днів після вакцинації в групі контролю. Усі собаки були піддані евтаназії через 10 днів після вакцинації і некропсію виконували для оцінки легневих пошкоджень. Усі собаки в групі контролю (100 %) показали різні ступені ущільнення легенів, тоді як, тільки одна у вакцинованій групі (12,5 %) показала помірне ущільнення легенів. Легенева шкала була значно вище у контрольних собак (медіана шкали=4,9) у порівнянні із вакцинованими собаками (медіана шкали=0; $p=0,0005$). Ці результати недвозначно демонструють, що вакцинна композиція, протестована в цьому дослідженні, захищає собак від CIV інфекції, значно зменшуючи клінічні симптоми, зменшуючи виділення вірусу, і запобігає CIV-індукованому ущільненню легенів.

Короткий огляд дослідження

Ціль дослідження полягала в тому, щоб перевірити ефективність Emunade®-ад'ювантної CIV-вакцинної композиції, у захисті собак проти CIV-імунізації.

Собаки були спочатку акліматизовані протягом восьми днів. Для тестової групи першу інокуляцію проводили в день 0, і ревакцинацію проводили в день 21. Група контролю не була вакцинована. CIV-імунізація проводилась обом групам у день 37. Собаки були піддані моніторингу та спостерігалися протягом дослідження, як описано нижче. Собаки були піддані евтаназії через 10 днів після вакцинації і здійснювали некропсію.

Тестові тварини

Тестові тварини були мали середній вік 48,25 у день 0. Було 8 собак контрольній групі й 8 собак в тестовій групі. Середня вага становила 1,8 кг. У собак, використовуваних у дослідженні, не було історії респіраторної інфекції або CIV-вакцинації. Щоб підтвердити, що собаки були негативні щодо антитіл CIV (НА титр <10), зразки крові були зібрані в день-1, і перевірені дослідженням інгібування гемаглютинації. Назальні мазки були також узяті в день-1, щоб гарантувати, що собаки були вільні від CIV під час вакцинації.

Превакцинаційний моніторинг

Зразки крові були зібрані у всіх собак в вакуумні пробірки сепарації сироватки в день перед введенням першої вакцини, щоб підтвердити, що собаки були негативні для антитіл CIV. Назальні мазки були взяті того самого дня, щоб підтвердити, що собаки були вільні від CIV.

Загальне здоров'я собак було оцінено медичним оглядом собак за два дні до першої

вакцинації. Клінічні оцінки та ректальна температура були виконані від двох днів перед початковою вакцинацією і ревакцинацією протягом дня вакцинації.

Вакцинація

Вакцина вірусу собачого грипу CIV H3N8-Emunade® використовувалася в цьому дослідженні. Вірус собачого грипу (H3N8) був спочатку ізолюваний від собаки із серйозним респіраторним захворюванням. Клітини Madin-Darby бичачої нирки (MDBK)-КС клітини при рівні пасажу MCS+19, тобто, наступні 19 пасажів Базової клітинної маси, використовувалася, щоб розмножити CIV H3N8, Вірус потім був інактивованій з 6мМ BEI протягом 60 годин при 36°C. BEI був нейтралізований 60мМ тиосульфату натрію.

Вакцина для цього дослідження була одержана в запасі на 800 мл до для аліквоування на 1 мл 800 доз. Розчин на 800 мл одержували, як показано в Таблиці 5.

Таблиця 5

Компонент	Використовуваний Об'єм
Водна Фаза:	
Інактивованій CIV (2560 HAU/мл)	156 мл
Сольовий розчин	342 мл
Гідроксид алюмінію (Оксид алюмінію 2,1 %)	77 мл
Етиловий спирт	16 мл
Гліцерин	40 мл
HEPES 1M	8 мл
1% розчин червоного барвника	0,8 мл
Масляна Фаза:	
Мінеральна Масло	107 мл
Tween 80	34,5 мл
Span 80	18,4 мл
Консервант:	
Гентаміцин	0, 373 мл
Загальний Об'єм	800,0 мл

Інактивованій CIV H3N8 вірус розводили у нормальному сольовому розчині та потім надавали ад'ювантних властивостей гідроксидом алюмінію. Залишкові компоненти водної фази були додані до ад'ювантного антигену. Масляна фаза була одержана окремо та потім додана до водної фази протягом 10 хвилин з безперервним змішуванням протягом однієї години. Серію гомогенізували, використовуючи гомогенізатор Silverson протягом 30 хвилин.

Пробірки вакцини CIV, які зберігали при 2-7°C, були врівноважені до кімнатної температури мінімум 30 хвилин. Вакцина була завантажена в шприці на 3 мл (1 мл на шприц) і використовувалася для імунізації. Першу дозу вакцини вводили внутрішньом'язово в праву задню ногу в день 0, і другу дозу вводили внутрішньом'язово в ліву задню ногу в день 21.

Поствакцинальні процедури

Повні клінічні оцінки, включаючи ректальні температури і спостереження ділянки ін'єкції були виконані на всіх собаках у межах 3-6 годин після кожної вакцинації, щоб визначити будь-які негайні реакції. Клінічні оцінки були продовжені щодня протягом 7 днів після кожної вакцинації і оцінені відповідно до Керівництва клінічної оцінки нижче. У собак відбирали кров в дні дослідження 20 і 36, і зразки сироватки використовувалися, щоб визначити CIV антитіла інгібуванням гемаглютинації.

Пре-імунізаційні процедури

Клінічні оцінки були виконані, і ректальні температури були зареєстровані для всіх собак протягом двох днів до імунізації (дні 35 і 36) і в день імунізації (день 37) перед проведенням імунізації. Клінічні симптоми були оцінені відповідно до Керівництва клінічної оцінки.

Імунізація

Матеріал імунізації: вірус CIV14-06A, ізолюваний від клітин MDCK і використовуваний, щоб сенсibilізувати вакцинованих собак, був спочатку ізолюваний від природного зразка, зібраного у собаки, що страждає собачим респіраторним захворюванням. Середній титр вірусу імунізації був 7,7 Log₁₀ TCID₅₀/мл. У день імунізації, матеріал імунізації розводили до 1:4 у стерильному холодному DMEM для цільової дози імунізації 7,4 Log₁₀ TCID₅₀ на собаку.

Проведення імунізації: усім собаками проводили імунізацію у день 37. Чотири собаки були

поміщені в камеру Plexiglas, і 8 мл вірусу імунізації (2 мл/собаку) використовували, щоб одержати аерозоль протягом приблизно 20 хвилин. Собаки були піддані дії аерозолі протягом у цілому 40 хвилин.

Пост-імунізаційний моніторинг

Ректальна температура була зареєстрована, і клінічні оцінки були виконані для кожного собаки щодня протягом 10 днів після імунізації. Назальні мазки були зібрані щодня в кожного собаки протягом 10 днів після імунізації. Назальні мазки були оброблені й титровані щодня після кожного збору, як описано тут. Зразки крові були зібрані в вакуумні пробірки сепарації сироватки в день 10 після імунізації, саме перед евтаназією.

Некропсія

Усі імунізовані собаки, що, були піддані евтаназії в день 10 після імунізації (День 47), використовуючи AVMA схвалений спосіб (кетаміновий коктейль і Beuthanasia-D), і некропсію виконували. Негайно після евтаназії легені були оцінені. Області видимого ущільнення були визначені та оцінені як відсоток ущільнення кожної долі легенів. Відсотки були конвертовані у вагову шкалу, і загальні оцінка для кожного собаки була обчислена. Під час некропсії тканини легенів були зібрані для ізоляції вірусів і титрування, і для гістопатології.

Вірусне титрування

Аналіз гемаглютинації (HA), був виконаний для вірусного титру. Вірус був серійно двократно розведений на мікротитрувальній пластині з V-подібним дном і еквівалентний об'єм 0,5 % суспензії еритроцитів індика (RBC) додавали до вірусної суспензії. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин і зчитували результати HA. Найвище розведення вірусу, що показує HA активність, приймали за 1 HA одиницю. Все дослідження було виконано в подвійному екземплярі і кінцева точка HA титру була визначена.

Щоб підтвердити потенцію матеріалу імунізації і визначити виділення вірусу у імунізованих собак, вірусний титр у імунізаційному матеріалі, назальному мазку та легеневій тканині визначали титруванням у клітинах MDCK. Клітини MDCK були засіяні в 96-лункові планшети культури тканини протягом двох днів, і інокулювали десятикратно серійно розбавленою вірусною суспензією або зразками, одержаними від тканини легенів і назальних мазків. Планшети інкубували при $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ і 5% CO_2 . Сім днів після інфікування планшети спостерігалися щодо цитопатичного ефекту (CPE), і 50% кінцева точка для інфекційності була обчислена, використовуючи спосіб Spearman-Kärber. Вірусні титри були виражені як $\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50}/\text{мл}$.

Виявлення серологічної відповіді

Антитіла до CIV у зразках сироватки собаки були визначені дослідженням інгібування гемаглютинації (HAI). Коротко, серійне двократне розведення тестової сироватки було виконано в PBS на 96-лунковому мікротитрувальному планшеті з V-подібним дном. Еквівалентний об'єм вірусної суспензії, що містить 4-8 HAU CIV25-06B, додавали у кожну лунку, що містить тестову сироватку, і планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин для здійснення реакції антиген-антитіло. Потім додавали еквівалентний об'єм 0,5 % суспензії еритроцитів індика. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, і результати HAI були прочитані. Аналог найвищого розведення сироватки, що показує HA інгібування, розглядали як HAI титр тестового зразка. Все дослідження було виконано в подвійному екземплярі й кінцева точка титру HAI була визначена.

Результати: клінічна оцінка

Усі собаки підлягали щоденному моніторингу, за два дні до імунізації протягом 10 днів після імунізації, щодо клінічних симптомів, включаючи виділення з очей, назальне виділення, чхання, кашель, диспное й депресію. Щодня клінічна оцінка для виділення з очей, назального виділення, чхання, кашлю, депресії і диспное протягом 10 днів після вакцинації була підсумована, щоб одержати підсумовану клінічну оцінку для кожного собаки. Підсумована клінічна оцінка для вакцинованої і контрольної групи була порівняна, використовуючи Тести Wilcoxon Exact Rank Sum й двостороннє р-значення було обчислене.

Собаки контрольних і вакцинованих груп показали діапазон клінічних симптомів, що починаються від двох пост-імунізаційних днів (Fig.). Всі вісім собак (100 %) у контрольній групі показали різні ступені кашлю, що протривав до п'яти днів у межах 10-денного пост-імунізаційного періоду спостереження. З іншого боку, тільки два собаки (25 %) у вакцинованій групі показали помірний кашель, що спостерігався тільки один раз під час усього 10-денного пост-імунізаційного періоду. Кашель був переважним симптомом, продемонстрованим собаками в групі контролю. Навпаки, тільки помірне виділення з очей було переважним клінічним симптомом, показаним вакцинованими собаками. Клінічна оцінка була значно вище ($p=0,0051$) у контрольній групі (медіана шкали=6,8) у порівнянні із вакцинованими собаками (медіана шкали=4,3). Ці дані припускають, що вакцина CIV захищає собак проти CIV-індукованих

клінічних симптомів.

Результати: Назальне вірусовиділення

Назальне вірусовиділення підлягало моніторингу у всіх собак, збираючи та обробляючи назальні мазки в день перед імунізацією (день 1), і потім, щодня від дня 1 протягом 10 днів після імунізації. Вірусні титри (Log_{10} TCID₅₀/мл) назальних мазків були визначені й графічно зображені проти часу. Область під кривою порівнювали між контролем і вакцинованими групами, що використовують Wilcoxon Exact Rank Sum тести. Середній вірусний титр для кожної групи, вираженої як Log_{10} TCID₅₀/мл, був графічно зображений проти пост-імунізаційних днів (Фіг.2).

Група контролю починала вірусовиділення у назальних секретах з 1 дня пост-імунізації. Виділення вірусу досягало свого піку в день 5 після імунізації ($1,25 \text{ Log}_{10}$ TCID₅₀/мл), з наступним крутим зниженням у день 7 (Фіг. 2). Усі собаки в групі контролю (100 %) були позитивними щодо вірусовиділення в одному або більше моментах часу під час 10-денного пост-імунізаційного спостереження. З іншого боку, тільки один собака (12,5 %) у вакцинованій групі (ID No. СХТАММ) виділяв вірус через назальні секрети тільки протягом одного дня (день 3). Невакциновані собаки контролю показали значно більш високе назальне вірусовиділення у порівнянні із вакцинованими собаками ($p=0,0003$). Ці результати ясно вказують, що вакцина CIV значно інгібує назальне вірусовиділення вакцинованими собаками.

Результати: серологічна відповідь

Середні геометричні титри антитіла (GMT) від дослідження HAI, були обчислені після первинної вакцинації і ревакцинації. Кратне збільшення титрів між імунізаціями було повідомлене. Титри антитіл порівнювали між контролем і вакцинованими групами, використовуючи Wilcoxon Exact Rank Sum тести. Всі 16 собак, зареєстрованих у дослідженні, були здорові й серонегативні (тобто, негативні для антитіл CIV) (титр HAI <10) під час первинної вакцинації. Назальні мазки, зібрані в день перед вакцинацією (День-1), підтвердили, що собаки були вільні від назального вірусовиділення CIV. Контрольні собаки залишалися серонегативними під час імунізації.

HAI титри антитіл були зведені в таблицю й порівнювалися між між контрольною і вакцинованою групами. Всі вакциновані собаки генерували вимірювані рівні титрів антитіл після першої вакцинації. HAI титри антитіл розташовувалися між 10 і 40 із ГЗТ 22, і титри були істотними у порівнянні з контрольними собаками ($p=0,0070$). Друга вакцинація підвищила титри антитіл шестикратно (GMT=135), які були значно вище, ніж контроль ($p=0,0002$). Титри антитіл розташовувалися між 80 й 160, більшість собак демонстрували титр HAI 160 (75 %). Усі контрольні собаки залишалися вільними від антитіл CIV до часу імунізації (титр HAI <10). З наступною імунізацією титри антитіл у вакцинованих собак досягли дуже високих рівнів (GMT=546), що демонструє ефективність вакцини в примуванні імунної системи проти вірулентного CIV. Титри HAI у цих собак розташовувалися між 120 й 1920. Невакцинований контроль також надав антитіла після вакцинації CIV із GMT 149.

Результати: ущільнення легенів, вірусна ізоляція, і гістопатологія

Ущільнення/пневмонія легені - головне патологічне ушкодження при всій інфекції грипу. У попередньому дослідженні розвитку моделі імунізації ми спостерігали серйозне ущільнення легенів у собак на пост-імунізаційний 6 і 14 день. Тому, щоб оцінити, чи захищає вакцина CIV проти CIV-індукованого ущільнення легенів, усі собаки в контрольній і вакцинованих групах були піддані евтаназії в день 10 після імунізації, і здійснювали некропсію. Ушкодження легенів були оцінені й виражені як відсоток ущільнення кожної долі легенів. Відсоток ущільнення кожної долі легенів, оцінені під час некропсії, конвертували у вагову шкалу, базуючись на системі оцінки легенів у собак (подібна до вірусу свинячого грипу система оцінки легенів у «Захворювання у Свиней» (1999) 8- видання, Ch. 61, стор. 913-940). Медіана легеневої шкали для контрольної і вакцинованої груп була порівняна, використовуючи тести Wilcoxon Exact Rank Sum й двосторонні р-значення були повідомлені. Про оцінювання ефективності пом'якшеної фракції вакцини щодо контролю та 95% довірчого інтервалу для оцінки також повідомили.

Усі собаки в групі контролю (100 %) показали різний ступінь ущільнення легенів, тоді як тільки один собака в вакцинованій групі показав помірне ущільнення легенів (12,5 %). Ушкодження легенів в невакцинованих собаках контролю були характеризовані геморагією, червонуватим ущільненням і гепатизацією. Легенева шкала в групі контролю розташовувалася між 0,10 і 14,70 із середньою оцінкою легенів 4,9. Легенева шкала в групі контролю була значно вищою, ніж у вакцинованій групі ($p=0,0005$; оцінка пом'якшеної фракції - 93,5 %). Легенева шкала недвозначно демонструє, що композиція CIV-вакцини, використовувана в цьому дослідженні, захищає собак проти CIV-індукованого ущільнення легенів.

На додаток до оцінки ушкодження під час некропсії, тканини легенів були також зібрані

асептично для ізоляції вірусів і у формалін для гістопатології. CIV не виявляли у зразках тканини легенів і у вакцинованого та у собаки контролю, що корелювало з відсутністю назального вірусовиділення. Це очікувалося, тому що віруси грипу викликають гостру інфекцію з піковим вірусовиділенням й клінічними симптомами протягом перших семи днів. Вірус був очищений повністю від тканини легенів через 10 днів після інфікування. Ці результати відповідають результатам попереднього дослідження. Гістопатологічна експертиза показала різні ступені гістопатологічних змін, що наводить на міркування про запалення в тканинах легенів у контролі, так само як вакцинованих собак. Це виявлення не було несподіваним, тому що імунна реакція на будь-який патоген, імовірно, викличе певний ступінь запальної відповіді навіть за наявності патоген-специфічного імунітету. Крім того, серйозність гістопатологічних легеневих пошкоджень в контролі й у вакцинованих собак не могла бути порівняна, тому що тканини не були зібрані вибірково з областей з ушкодженнями легенів. Тому, гістопатологія не могла використовуватися як критерій, щоб оцінити ефективність вакцини в цьому дослідженні.

Висновки

Вакцина індукує значно більш високу гуморальну імунну відповідь, як визначено дослідженням HAI, після першої (GMT=22) і другої вакцинації (GMT=135), що вказує на стимуляцію імунної відповіді вакциною.

Вакцина значно зменшила CIV-викликані клінічні симптоми, особливо кашель, у дозі 500 HAU на собаку, що демонструє ефективність вакцини в контролюванні CIV-індукованого клінічного захворювання.

Вакцина значно зменшувала назальне вірусовиділення у вакцинованих собак, що демонструє ефективність вакцини в редукуванні інфекції.

Вакцина успішно захищала собак проти CIV-індукованого ущільнення легенів, що доводить ефективність вакцини проти самого серйозного клінічного результату, пневмонії.

Вакцина не викликала основних несприятливих реакцій у собак, що демонструє безпеку вакцини.

Критерії клінічної оцінки

Назальні виділення

0 = Відсутні

0,5 = Серозні виділення: водна рідина сочиться з ніздрів. Рідини, що витікають з носу, зареєстровані тут.

1 = Виділення слизувато-гнійні, від слабких до помірних: мутна рідина змішана із слизовими виділеннями, що течуть принаймні на півшляху вниз від носової порожнини до ротової.

2 = Виділення слизувато-гнійні, серйозні: Слиз просочувалася у ротову порожнину.

Виділення з очей

0 = Відсутні: незначна кількість висушеного покритого кіркою матеріалу у куті ока не вважали виділенням із очей.

0,5 = Серозні виділення: прозоре рідинне виділення, що витікає за межі ока.

1 = Виділення слизувато-гнійні, від слабких до помірних: мутна рідина змішана із слизом, що течуть принаймні на півшляху вниз від ока до ротової порожнини.

2 = Виділення слизувато-гнійні, серйозні: Рідина або слиз течуть на півшляху вниз від носа або краю ока та змочування волосся на внутрішньому або зовнішньому куті ока.

Кашель

0 = Відсутній

0,5 = Помірний: спостерігався тільки один короткий кашель.

1,0 = Помірний: кашель постійний, відбувається неодноразово в період спостереження.

2,0 = Серйозний: задушливий кашель з позивом до блювоти.

Чхання

0 = Відсутнє

2 = Присутнє

Задихка

0 = Відсутня(Нормальне дихання)

2 = Присутня (Задихка)

Депресія

0 = Відсутня (Нормальна активність)

2 = Присутня: собака менш активний або грайливий, у порівнянні з нормальним. Собаки зареєстровані, якщо вони були апатичні або в лежачому положенні і неохоче стоять під час спостереження.

Хоча попередній винахід був описаний докладно з метою ясності розуміння, буде очевидно, що певна модифікація може бути здійснена в рамках доданої формули винаходу. Всі публікації і

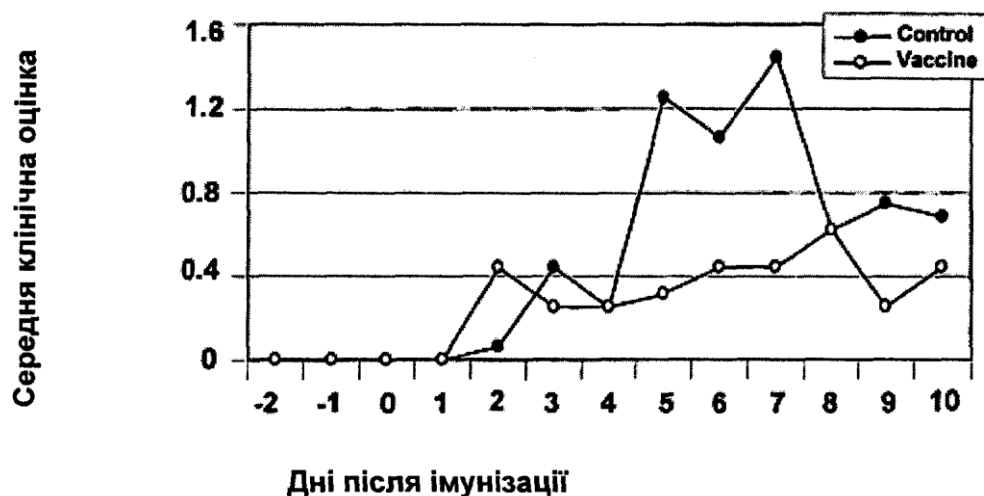
доступні документи, процитовані тут, тим самим включені посиланням у всій їх повноті для всіх цілей у тій же мірі, як кожний був так індивідуально позначений.

З вищевикладеного буде очевидно, що винахід передбачає чисельні застосування. Наприклад, винахід передбачає застосування будь-яких недавно ідентифікованих патогенних штамів вірусу грипу для одержання адаптованих до клітинної культури ізолятів та/або для вакцин, так само як відомих патогенних штамів. Винахід передбачає застосування будь-яких недавно ідентифікованих клітин клітинної культури, які є або можуть бути одержані і прийнятні для культивування грипу. Винахід передбачає препарат штаму, адаптованого до культури тканини у вигляді вакцини, що є принаймні атенуйованою, субдиничною, розщепленою або містить убитий вірус, і також має ад'юванти, носії, наповнювачі, протигрипозні фармацевтичні препарати і інші агенти, які збільшують імунну реакцію щодо вірусу. Вакцини можуть використовуватися перед контактуванням із грипом або після контактування.

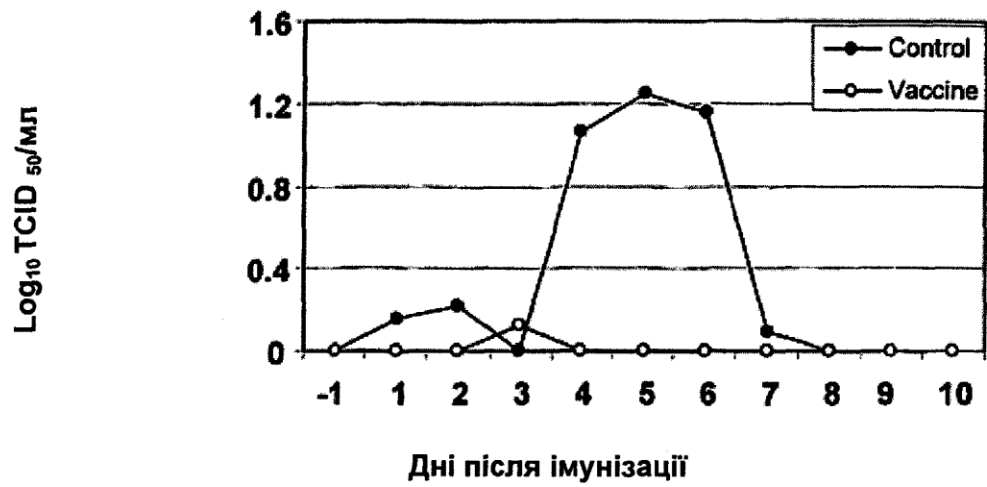
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб селекції людського вірусу грипу для культивування у клітинах культури тканини шляхом клонування методом серійних розведень, що включає:
 - серійне розведення ізоляту вірусу грипу та взаємодію кожного розведення з культивованими клітинами;
 - культивування клітин протягом достатнього часу, щоб одержати цитопатичні ефекти (CPE);
 - збирання вірусу від найвищого розведення, що викликає CPE; і
 - повторення процесу із зібраним вірусом.
2. Спосіб за п. 1, що додатково включає змішування ізоляту вірусу грипу з ефективною кількістю трипсину перед взаємодією з культивованими клітинами.
3. Спосіб за п. 2, в якому трипсин є трипсином типу IX.
4. Спосіб за п. 2, в якому стадію взаємодії адаптованого до культури тканини ізоляту з клітинами культури тканини виконують при кратності інфікування (KI) менше ніж приблизно 0,01.
5. Спосіб за п. 1, в якому клітини культури тканини є клітинами ембріональної нирки ссавця.
6. Спосіб за п. 5, в якому клітини ембріональної нирки ссавця є Madin-Darby клітинами бичачої нирки (MDBK) клітини.
7. Спосіб за п. 5, в якому клітини ембріональної нирки ссавця є клітинами ембріональної нирки людини.
8. Спосіб за п. 1, в якому вірус грипу є вірусом грипу А, В або С.
9. Спосіб за п. 8, в якому вірус грипу А є штамом H5N1.
10. Спосіб за п. 1, в якому ізолят вірусу грипу спочатку культивують у яйцях з ембріоном, що розвивається, щоб одержати великий інокулят для адаптації до культури тканини.
11. Спосіб за п. 10, в якому ізолят вірусу грипу спочатку культивують в амніотичній мембрані.

Фіг.1 Клінічна оцінка після імунізації CIV



Фіг.2 Пост-імунізаційне назальне виділення CIV



Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601
