Способ относится к области биотехнологии, а именно к производству вакцин.

Известен способ получения ассоциированной паротитно-коревой вакцины, включающий заражение штаммами вирусов эпидемического паротита и кори первичной культуры клеток эмбрионов перепелов с инкубированием в ростовой среде, содержащей ростовые протеины, последующую отмывку клеток, дальнейшее инкубирование и сбор вируссодержащей жидкости (см. авт. свид. СССР 701147, А 61 К 39/165, 13.06.77).

Недостатками этого способа являются непрогнозируемый разброс значений прививочных доз эпидемического паротита и кори в препарате, невозможность получения препарата с заданными концентрациями, высокое содержание белка, невозможность получения моновакцин.

Устранение указанных недостатков достигается тем, что вирусы эпидемического паротита и кори инкубируют раздельно в присутствии антибиотика, собранную вируссодержащую жидкость подвергают осветляющей фильтрации, затем добавляют стабилизатор и объединяют в пропорциях, соответствующих конечным прививочным дозам паротитного компонента - не ниже 20000 ТЦД 50/0,5 мл, коревого - не ниже 1000 ТЦД 50/0,5 мл.

Сущность способа заключается в следующем.

Трипсинизированные первичные культуры клеток эмбрионов перепелов заражают штаммами вирусов эпидемического паротита и кори. В качестве вакцинного штамма вируса эпидемического паротита используют штамм Ленинград-3 (Л-3), в качестве вакцинного штамма вируса кори используют штамм Ленинград-16 (Л-16). Множественность заражения для штамма вируса эпидемического паротита составляет 0,00001-0,001 ТЦД/50 на клетку, для штамма вируса кори 0,001-0,01 ТЦД/50 на клетку соответственно. Затем проводят инкубирование в ростовой среде в присутствии антибиотика и ростовых протеинов при температуре от (+34) до (+36)°С в течение 2-4 суток для эпидемического паротита и в течение 4-8 суток для кори. Затем из роллерных бутылей или стационарных условий (матрасов) удаляют ростовую среду и осуществляют отмывку клеток поддерживающей средой не менее 6 раз как для паротитного, так и для коревого компонентов, что позволяет получить ассоциированную вакцину с количеством белка (протеинов) не более 8 мкг/дозу. После этого проводят дальнейшее инкубирование и сбор вируссодержащей жидкости, которую подвергают осветляющей фильтрации, затем добавляют стабилизатор. В качестве стабилизаторов используют ЛС-18 с желатином или сорбит с желатозой. А также в качестве одного из стабилизаторов вместо желатина или желатозы может быть использован полиглюкин или поли-N-винилпирролидон, который применяют с молекулярной массой не менее 12 кД с целью стандартизации препаратов. Приготовленные жидкие монокомпонентные препараты замораживают и хранят до окончания контролей.

Компоненты эпидемического паротита и кори объединяют в пропорциях, соответствующих конечным прививочным дозам паротитного компонента - не ниже 20000 ТЦД 50/0,5 мл, а коревого - не ниже 1 000 ТЦД 50/0,5 мл.

Ассоциированную вакцину можно получать с заданными концентрациями компонентов, которые определяют по формуле

$$Q=T_2/T_1 \cdot N,$$

где Q - объем каждого исходного компонента, л;

T_1 - исходная активность компонента, ТЦД 50/0,5 мл;

T_2 - заданная активность компонента в ассоциированной вакцине, ТЦД 50/0,5 мл;

N - заданный объем ассоциированного препарата, л.

Жидкую паротитно-коревую вакцину разливают в ампулы или флаконы с последующим замораживанием и лиофилизацией.

Замораживание в процессе лиофилизации препарата осуществляют до температуры (-30) - (-55)°С в течение 3-6 ч. Затем в процессе лиофилизации вакцину высушивают при температуре от (-17) до (-28)°С в течение 24-60 ч с последующим нагревом до температуры (+22) – (+28)°С в течение 8-14 ч.

Пример 1.

Свежеприготовленную суспензию первичной культуры клеток эмбрионов перепелов в среде 199 разливают в одноразовые роллерные бутыли по 200 тыс. клеток на 1 $см^2$ поверхности и заражают вирусом эпидемического паротита (штамм Л-3) с множественностью заражения 0,00001 ТЦД/50 на клетку во взвесь. Аналогичную операцию проводят для вируса кори (штамм Л-16) с множественностью заражения 0,008 ТЦД/50 на клетку во взвесь. Культуры инкубируют в ростовой среде, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота или телячью, или эмбриональную сыворотку, а также антибиотик - гентамицина сульфат в концентрации 100 ед/мл - и инкубируют при температуре +35,2°С для эпидемического паротита в течение 72 ч, для кори - в течение 96 ч. После этого проводится шестикратное отмывание как для одного, так и для другого компонента. На четвертые сутки от момента заражения начинается сбор вируссодержащей жидкости для эпидемического паротита, а на восьмые сутки - для кори. После получения результатов контроля на стерильность и специфическую активность индивидуальные вирусные сборы каждого компонента объединяются отдельно друг от друга и подвергаются осветляющей фильтрации. Проводится контроль на остаточный белок, отсутствие интактных клеток и стерильность. Затем добавляется стабилизатор, и еще раз проводится

контроль на специфическую активность и стерильность. Монопрепараты объединяются непосредственно перед лиофилизацией в соответствующих пропорциях для получения ассоциированной вакцины.

Для получения ассоциированной паротитно-коревой вакцины в объеме 6,0 л при исходной активности паротитного компонента ($T_{1П}$) - 141300 ТЦД 50/0,5 мл и исходной активности коревого компонента ($T_{1К}$) - 35480 ТЦД 50/0,5 мл берут 3,0 л паротитного компонента и 3,0 л коревого компонента и объединяют их. В результате объединения получилось 6,0 л ассоциированной вакцины с конечной концентрацией паротитного компонента - 70650 ТЦД 50/0,5 мл и коревого компонента - 17740 ТЦД 50/0,5 мл.

Разлитый в ампулы жидкий полуфабрикат паротитно-коревой вакцины со стабилизатором ЛС-18 в процессе лиофилизации замораживают на полке при температуре ниже -35°С в течение 3 ч, вакуумируют при той же температуре. Затем полки нагревают до -20°С. Сублимация (высушивание) проводится при температуре (-20) - (-22)°С в течение 45 ч. После этого полки нагревают до +25°С в течение 10 ч. Досушивание проводят при температуре полки от (+25) до (+28)°С в течение 8 ч.

Пример 2.

Свежеприготовленную суспензию первичной культуры клеток эмбрионов перепелов в среде 199 разливают в стационарные условия (матрасы) по 200 тыс. клеток на 1 $см^2$ поверхности и заражают вирусом эпидемического паротита (штамм Л-3) с множественностью заражения 0,00009 ТЦД/50 на клетку во взвесь. Аналогичную операцию проводят для вируса кори (штамм Л-16) с множественностью заражения 0,0095 ТЦД/50 на клетку во взвесь. Культуры инкубируют в ростовой среде, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота или телячью, или эмбриональную сыворотку, а также антибиотик - гентамицина сульфат в концентрации 100 ед/мл - и инкубируют при температуре +34,5°С для эпидемического паротита в течение 60 ч, для кори - в течение 96 ч. После этого проводится шестикратное отмывание как для одного, так и для другого компонента. На третьи сутки от момента заражения начинается сбор вируссодержащей жидкости для эпидемического паротита и на восьмые сутки - для кори. После получения результатов контроля на стерильность и специфическую активность индивидуальные вирусные сборы каждого компонента объединяются отдельно друг от друга и подвергаются осветляющей фильтрации. Проводится контроль на остаточный белок, отсутствие интактных клеток и стерильность. Затем добавляется стабилизатор и еще раз проводится контроль на специфическую активность и стерильность. Монопрепараты объединяются непосредственно перед лиофилизацией в соответствующих пропорциях для получения ассоциированной вакцины.

Для получения ассоциированной паротитно-коревой вакцины в объеме 7 л (N - здесь и далее обозначение параметра согласно формуле, приведенной на стр. 2) с конечной активностью паротитного компонента ($T_{2П}$) - 100000 ТЦД 50/0,5 мл и коревого компонента ($T_{2К}$) - 10000 ТЦД 50/0,5 мл рассчитывают объемы каждого компонента по формуле, приведенной на стр. 2, исходя из известной активности монопрепаратов.

Исходная активность паротитного компонента ($T_{1П}$) - 141300 ТЦД 50/0,5 мл.

Исходная активность коревого компонента ($T_{1К}$) - 35480 ТЦД 50/0,5 мл.

Подставляя в формулу известные значения, получаем необходимые для сведения объемы монопрепаратов:

$Q_П=(100000/141300)\cdot 7=4.95$ л (~5,0 л)

$Q_К=(10000/35480)\cdot 7=1,97$ л (~2,0 л)

А именно, паротитного компонента необходимо 5 л, а коревого - 2 л, которые затем объединяют перед лиофилизацией.

Разлитый в ампулы жидкий полуфабрикат паротитно-коревой вакцины со стабилизатором - сорбит с желатозой - в процессе лиофилизации замораживают на полке при температуре ниже -30°С в течение 4 ч, вакуумируюг при той же температуре. Затем полки нагревают до -27°С. Сублимация (высушивание) проводится при температуре (-25) – (-28)°С в течение 52 ч. После этого полки нагревают до +25°С в течение 8 ч. Досушивание проводят при температуре полки от (+25) до (+28)°С в течение 11 ч.

Настоящий способ позволяет увеличить урожайность вирусов эпидемического паротита и кори с единицы площади поверхности. Объединение индивидуальных вирусных сборов с последующей осветляющей фильтрацией стандартизирует вирусный материал по специфической активности и остаточному белку при гарантированном отсутствии интактных клеток субстрата. Неиспользованные в ассоциации материалы могут быть применены для получения монопрепаратов. Способ также позволяет уменьшить поствакцинальные осложнения, такие как аллергические проявления и реактогенность, за счет снижения содержания белка в препарате.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ассоциированной паротитно-коревой вакцины, включающий заражение штаммами вирусов эпидемического паротита и кори первичной культуры клеток эмбрионов перепелов с инкубированием в ростовой среде, содержащей ростовые протеины, последующую отмывку клеток, дальнейшее инкубирование и сбор вируссодержащей жидкости, отличающийся тем, что вирусы эпидемического

паротита и кори инкубируют в присутствии антибиотика раздельно, собранную вирусодержащую жидкость подвергают осветляющей фильтрации, затем добавляют стабилизатор и объединяют в пропорциях, соответствующих конечным прививочным дозам паротитного компонента не ниже 20000 ТЦД 50/0,5 мл, коревого - не ниже 1000 ТЦД 50/0,5 мл, затем препарат лиофилизируют.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве вакцинных штаммов используют для вируса эпидемического паротита штамм Л-3, для вируса кори - штамм Л-16.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что множественность заражения для штамма вируса эпидемического паротита составляет 0,00001-0,001 ТЦД/50 на клетку, для штамма вируса кори - 0,001-0,01 ТЦД/50 на клетку.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что инкубирование проводят при температуре от +34 до +36°С.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что инкубирование проводят в роллерных установках.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что инкубирование проводят в стационарных условиях.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что отмывку клеток поддерживающей средой осуществляют не менее 6 раз как для паротитного, так и для коревого компонентов.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве стабилизаторов используют ЛС-18 с желатином или сорбит с желатозой.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что в качестве одного из стабилизаторов вместо желатина или желатозы используют полиглюкин или поли-N-винилпирролидон.

10. Способ по п.8 или 9, отличающийся тем, что поли-N-винилпирролидон используют с молекулярной массой не менее 12 кД.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что количество протеина в ассоциированной вакцине не превышает 8 мкг/дозу.

12. Способ по п.1, отличающийся тем , что замораживание в процессе лиофилизации проводят при температуре в пределах Т=(-30) –(-55)°С в течение 3-6 ч.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что высушивание в процессе лиофилизации проводят при температуре от Т=(-17) – (-28)°С в течение 24-60 ч с последующим нагревом до температуры Т=(+22) – (+28)°С в течение 8-14 ч.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что ассоциированную вакцину получают с заданными концентрациями компонентов, которые определяют по формуле:

$$Q=T_2/T_1 \cdot N,$$

где Q - объем каждого исходного компонента, л;

T_1 - исходная активность компонента, в ТЦД 50/0,5 мл;

T_2 - заданная активность компонента в ассоциированном препарате, в ТЦД 50/0,5 мл;

N - заданный объем ассоциированного препарата, л.

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, ГСП-9 101999, Москва, Центр, М. Черкасский пер., 2/6