



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2011120996/10, 24.05.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
24.05.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.05.2011

(45) Опубликовано: 20.10.2012 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2318871 C1, 10.03.2008. STEPHENSON I  
et al.. Safety and antigenicity of whole virus  
and subunit influenza A/Hong Kong/1073/99  
(H9N2) vaccine in healthy adults: phase I  
randomised trial. Lancet, 2003 Dec 13, Vol.362  
(9400), p.p.1959-66.

Адрес для переписки:

197376, Санкт-Петербург, ул. Акад.  
Павлова, 12, ФГБУ " НИИЭМ" СЗО РАМН,  
НОО отдел

(72) Автор(ы):

Дешева Юлия Андреевна (RU),  
Руденко Лариса Георгиевна (RU),  
Александрова Галина Ибрагимовна (RU),  
Смолоногина Татьяна Анатольевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение "Научно-исследовательский  
институт экспериментальной медицины"  
СЗО РАМН (RU)**(54) ШТАММ ВИРУСА ГРИППА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЖИВОЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ  
ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинской  
вирусологии и касается штамма вируса гриппа.  
Представленный штамм  
A/17/перепел/Гонконг/97/84(H9N2) получен  
методом генетической реассортации путем  
скрещивания апатогенного птичьего вируса  
A/перепел/Гонконг/6/97(H9N2) с  
холодоадаптированнымтемпературочувствительным штаммом  
A/Ленинград/134/17/57(H2N2) - донором  
аттенуации. Полученный штамм депонирован в  
коллекции вирусов Научно-исследовательского  
института вирусологии им. Д.И.Ивановского  
РАМН под №2631 и может быть использован  
для производства живой интраназальной  
вакцины или инактивированной гриппозной. 3  
табл.

RU 2 4 6 4 3 0 9 C 1

RU 2 4 6 4 3 0 9 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 7/00* (2006.01)  
*A61K 39/145* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011120996/10, 24.05.2011**

(24) Effective date for property rights:  
**24.05.2011**

Priority:

(22) Date of filing: **24.05.2011**

(45) Date of publication: **20.10.2012 Bull. 29**

Mail address:

**197376, Sankt-Peterburg, ul. Akad. Pavlova, 12,  
FGBU " NIIeHM" SZO RAMN, NOO otdel**

(72) Inventor(s):

**Desheva Julija Andreevna (RU),  
Rudenko Larisa Georgievna (RU),  
Aleksandrova Galina Ibragimovna (RU),  
Smolonogina Tat'jana Anatol'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
uchrezhdenie "Nauchno-issledovatel'skij institut  
ehksperimental'noj meditsiny" SZO RAMN (RU)**

**(54) INFLUENZA VIRUS STRAIN FOR PRODUCING LIVE AND INACTIVATED INFLUENZA VACCINE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: A/17/quail/Hong

Kong/97/84(H9N2) strain is prepared by genetic reassortation by crossing of apatogenic avian virus A/quail/Hong Kong/6/97(H9N2) and the cold-adapted thermally sensitive A/Leningrad/134/17/57(H2N2) strain - an attenuation donor. The prepared strain is

deposited in the Collection of Viruses of Ivanovsky Research Institution of Virology of the Russian Academy of Medical Sciences, No. 2631.

EFFECT: applicability of the strain for producing the live intranasal vaccine or the inactivated influenza vaccine.

3 tbl

R U 2 4 6 4 3 0 9 C 1

R U 2 4 6 4 3 0 9 C 1

Изобретение относится к медицинской вирусологии и может быть использовано в здравоохранении для профилактики гриппа, вызванного пандемически опасными вирусами гриппа птиц. Для производства интраназальной живой гриппозной вакцины (ЖГВ) или инактивированной гриппозной вакцины (ИГВ) предложен реассортантный штамм вируса гриппа А/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2)(Orthomyxoviridae, рода Influenzavirus А).

Современная эпидемическая ситуация по гриппу характеризуется не только одновременной циркуляцией эпидемических вирусов гриппа А(Н1N1), А(Н3N2) и В, но и широким распространением вирусов птичьего гриппа подтипов А(Н5N1), А(Н7N3) и А(Н9N2), способных инфицировать людей. Вирусы птичьего гриппа А(Н9N2) обладают даже большим сродством к дыхательным путям человека, чем высокопатогенные вирусы подтипа А(Н5N1). Необходимость разработки срочных противопандемических мер, в том числе и для борьбы с вирусами птичьего гриппа, отражена в приказе Минздрава РФ [Приказ №40 МЗ РФ РФ от 28.12.2004].

Применяемые в настоящее время для профилактики эпидемического гриппа А вакцины подтипов Н1N1 и Н3N2 не могут вызывать защитную реакцию в случае широкомасштабной вспышки, вызванной вирусами гриппа подтипа А(Н9N2), к которым у подавляющего большинства населения нет иммунитета.

В настоящее время известен реассортантный штамм А/17/утка/Потсдам/86/92(Н5N2) [Патент №2318871, опубл. 10.03.2008], предназначенный как для производства живой, так и инактивированной вакцины против птичьего гриппа подтипа Н5. Но он не может дать профилактический эффект в случае распространения вирусов гриппа подтипа А(Н9N2).

За рубежом для производства ИГВ подтипа А(Н9N2) был использован вирус гриппа А/Гонконг/1073/99(Н9N2) антигенной линии G9 [Lancet. - 2003. - Vol. 362. - P.1959-1966]. Однако в процессе производства гриппозных вакцин на основе вирусов птичьего гриппа возникают трудности с накоплением вирусного материала в связи с высокой токсичностью подобных вирусов для куриных эмбрионов. Для создания высокоурожайных вакцинных штаммов применяют генетическую реассортацию с лабораторными штаммами, характеризующимися высокой репродуктивной активностью и безвредностью для человека.

Задачей, на решение которой направлено заявляемое изобретение, является получение вакцинного штамма новой антигенной разновидности на основе холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(Н2N2) с использованием в качестве источника поверхностных антигенов апатогенного вируса гриппа птиц А/перепел/Гонконг/6/97(Н9N2), принадлежащего к антигенной линии G1.

Вакцинный штамм А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2) получен в развивающихся куриных эмбрионах (КЭ) методом классической генетической реассортации апатогенного птичьего вируса А/перепел/Гонконг/6/97(Н9N2) с холодоадаптированным штаммом А/Ленинград/134/17/57(Н2N2) с последующей селекцией в присутствии антисыворотки к донору аттенуации А/Ленинград/134/17/57(Н2N2). Донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57(Н2N2) - холодоадаптированный температурочувствительный штамм вируса гриппа, разрешенный для получения безвредных интраназальных вакцин для взрослых и детей [Александрова Г.И. Новое в эпидемиологии и профилактике вирусных инфекций. Л., 1986. - С.66-83].

Применяемые в настоящее время вакцинные штаммы ЖГВ получают методом реассортации современных эпидемических вирусов с холодоадаптированными (ХА)

донорскими штаммами, в результате чего образуются реассортанты, имеющие смешанный геном. Гены, кодирующие гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA), наследуются от антигенно актуального эпидемического штамма, а шесть генов внутренних и неструктурных белков (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) - от безвредного ХА донора аттенуации. Из полученных реассортантов выбирают вакцинный кандидат с формулой генома 6:2, наиболее отвечающий требованиям антигенной специфичности, характерной для родительского вируса «дикого» типа, а также соответствующий признакам холодовой адаптации по способности к репродукции при пониженной температуре.

Анализ генома созданного вакцинного штамма был выполнен с использованием рестрикционного анализа ДНК-копий сегментов РНК, полученных с помощью обратнo-транскриптазной полимеразно-цепной реакции (ОТ-ПЦР) [Klimov A.I. J. Virol. Method. - 1995. - №55. - P.445-446]. Полученные с помощью ОТ-ПЦР ДНК-копии сегментов PB2, PB1, PA, NP, M и NS обрабатывали соответственно эндонуклеазами рестрикции Tru9I, HindIII, BamHI, AsnI, EcoRI, PvuI, NciI соответственно. Дополнительно копии сегментов PB1, PA и M были обработаны рестриктазами BstXI, AsnI и VciVI. Было показано, что сайты рестрикции в положениях нуклеотидной цепи, характерные для донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(Н2N2), присутствуют в генах PB2 (1459), PA (107 и 1045), NP (1066) и M (68 и 969). В то же время было установлено, что утрачены сайты рестрикции в генах PB1 (819 и 975) и NS (798), что также характерно для донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(Н2N2). Таким образом, было установлено, что реассортант А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2) унаследовал 6 генов негликозилированных белков от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(Н2N2) (формула генома 6:2). Принадлежность гемагглютинина родительскому штамму «дикого» типа А/перепел/Гонконг/6/97(Н9N2) определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Помимо этого было проведено прямое нуклеотидное секвенирование ДНК-копий генов. Штамм является температурочувствительным (разность титров при 33°С и 39°С-7,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл) и холодоадаптированным (разность титров при 33°С и 25°С-2,8 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл).

Таким образом, представленный вакцинный штамм А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2) характеризуется сочетанием полезных признаков, необходимых вакцинному штамму - антигенной специфичностью гемагглютинина вируса «дикого» типа А/перепел/Гонконг/6/97(Н9N2), структурой генома, необходимой для реассортантных вакцинных штаммов, температурочувствительностью, адаптацией к пониженной температуре культивирования, что коррелирует с аттенуацией, характерной для аттенуированного донорского штамма.

Штамм депонирован в коллекции Научно-исследовательского института вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН под №2631. Морфология штамма - полиморфная, типичная для вируса гриппа.

#### ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛУЧЕННОГО ШТАММА.

Инфекционная активность при репродукции в развивающихся куриных эмбрионах при 33°С в течение 48 часов - 7,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл.

Гемагглютинирующая активность - 1:512

Паспорт на вакцинный штамм А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2) прилагается (стр.5)

#### ПАСПОРТ ШТАММА

1. Название штамма - А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2)

2. Серия - серия 1.

3. Метод получения - реассортация; характеристика родительских вирусов:

а) апатогенный птичий вирус - А/перепел/Гонконг/6/97(Н9N2)

б) донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57(Н2N2)

4. Количество пассажей - 7 в процессе реассортации

5. Характеристика штамма до лиофилизации:

а) оптимальные условия репродукции - 34°, 28-30 часов;

б) гемагглютинирующая активность 1:512;

в) инфекционная активность 9,3 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл;

г) чувствительность к ингибиторам: ингибиторорезистентный;

д) разность в показателях инфекционной активности при 34°C и 40°C - 7,8 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл;

е) разность в показателях инфекционной активности при 34°C и 25°C - 2,8 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл;

ж) структура генома реассортанта:

- гены от апатогенного птичьего вируса - НА, NA

- гены от донора аттенуации - РА, РВ1, РВ2, NР, М, NS,

6. Характеристика штамма после лиофилизации:

а) дата лиофилизации: 20.12.2010 г.;

б) объем материала во флаконе: 1 мл;

в) количество доз в серии: 2

г) инфекционная активность - 8,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл

д) гемагглютинирующая активность - 1:512

7. Рекомендованное разведение при вакцинации 1:1

8. Антигенная специфичность:

а) гемагглютинина - идентичен вирусу А/перепел/Гонконг/6/97(Н9N2) по данным РТГА с крысиной антисывороткой;

б) нейраминидазы - идентична вирусу А/перепел/Гонконг/6/97(Н9N2) по данным секвенирования.

9. Безвредность для мышей при подкожном введении - безвреден.

10. Бактериологический контроль лиофилизированного материала: дата проведения - 25 декабря 2010 г. - стерилен.

11. Контроль на отсутствие посторонних вирусов - посторонние вирусы отсутствуют.

Результаты доклинических испытаний заявляемого штамма.

1. Штамм А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2) проявляет свойства температурочувствительности и холодовой адаптации при культивировании в куриных эмбрионах.

Пример. Полученные данные по репродуктивной активности кандидата в вакцинные штаммы в развивающихся куриных эмбрионах свидетельствовали о приобретении вирусом А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2) в результате реассортации ts- и са-фенотипов, являющихся маркерами аттенуации (Табл. 1).

2. Штамм А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2) безвреден для мышей при интраназальном и введении.

Пример. При интраназальном введении в дозе 6-7 lg ЕИД<sub>50</sub> реассортант был аттенуированным для мышей, репродуцируясь более эффективно в носовых ходах (3,5 lg ЕИД<sub>50</sub>/мл), чем в легочной ткани (1,8 lg ЕИД<sub>50</sub>/мл) (Табл.2).

3. Штамм А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2) иммуногенен при введении мышам в

виде прототипа ЖГВ интраназально или прототипа ИГВ внутримышечно.

Пример. Оценка гуморального иммунного ответа в сыворотках подопытных животных проводилась через 28 дней после введения препаратов. В иммуноферментном анализе выявлено наличие в сыворотках мышей,

иммунизированных реассортантом А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2), специфических иммуноглобулинов классов G и A (IgG и IgA) к вирусам подтипа Н9N2 (Табл.3).

Выработка локальных антител при интраназальном введении в виде прототипа ЖГВ была значительно выше по сравнению с парентеральным введением

инактивированного антигена.

Таким образом, было показано, что реассортантный вакцинный штамм, содержащий НА апатогенного птичьего вируса гриппа А(Н9N2), был безвредным и иммуногенным при введении мышам. Заявляемый вакцинный кандидат по результатам испытаний на мышах может быть рекомендован для получения как живой, так и инактивированной гриппозных вакцин, поскольку способен индуцировать иммунный ответ как при интраназальном введении в виде прототипа ЖГВ, так и парентерально в виде прототипа ИГВ. Использование для получения вакцинных штаммов непатогенных вирусов гриппа обеспечивает необходимый уровень безопасности не только при работе с уже готовыми реассортантами, но и в процессе их подготовки.

Таблица 1

Результаты изучения репродукции реассортанта А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2) и родительских вирусов различной температуре культивирования в куриных эмбрионах.

Вирус	Характеристика	Репродуктивная активность (m±δ) при температуре инкубации:		
		34°C	25°C	40°C
А/Ленинград/134/17/57(Н2N2)	ХА донорский штамм	9,5±0,3	7,3±0,2	1,5±0,0
А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2)	вакцинный кандидат	9,8±0,5	7±0,2	1,8±0,3
А/перепел/Гонконг/6/97(Н9N2)	апатогенный вирус птичьего гриппа	8,6±0,3	1,5±0,0	9,2±0,2

Таблица 2

Результаты изучения безвредности реассортантного штамма А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2) при интраназальном введении мышам.

Место выделения вируса	Титры вируса (lg ЭИД <sub>50</sub> /0,1 мл, m±δ на 3-й день после интраназального введения:			
	Лен17/Н9 (10 <sup>6</sup> ЭИД <sub>50</sub> )	Лен17/Н9 (10 <sup>7</sup> ЭИД <sub>50</sub> )	Лен 17 (10 <sup>6</sup> ЭИД <sub>50</sub> )	Н9N2-дт (10 <sup>6</sup> ЭИД <sub>50</sub> )
носовые ходы	1,1±0,3	3,8±0,2	2,5±0,3	1,8±0,5
легкие	1,5±0,0	1,5±0,0	2,3±0,5	4,9±0,5

Таблица 3

Выработка сывороточных и локальных антител после иммунизации мышей реассортантным вакцинным штаммом А/17/перепел/Гонконг/97/84(Н9N2) в виде ЖГВ или ИГВ.

Препарат	Сывороточные антитела				Локальные антитела	
	РТГА (СГТ)	Тест микронейтрализации (СГТ)	ИФА, log <sub>10</sub> (m±δ)		ИФА, log <sub>10</sub> (m±δ)	
			IgG	IgA	IgG	IgA
Лен17/Н9-ЖГВ	5,0	9,1	2,7±0,6	2,9±0,2	1,6±0,9	2,6±0,7
Лен17/Н9-ИГВ	11,9	21,8	3,1±0,2	2,3±0,3	1,0±0,5	1,6±0,7
Н9N2-дт	6,6	11,9	2,8±0,2	2,9±0,1	1,5±0,5	1,6±0,4
ИГВ+ЖГВ	11,5	13,2	2,6±0,1	2,5±0,4	1,4±0,5	1,5±0,8
ЖГВ+ИГВ	20,0	17,4	3,2±0,3	2,6±0,1	1,2±0,3	1,3±0,4
Контроль	5,0	10,0	2,2±0,6	2,2±0,5	1,0±0,0	1,0±0,0

Формула изобретения

Штамм вируса гриппа, депонированный в Государственной коллекции вирусов  
Научно-исследовательского института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН под  
5 №2631, используемый для производства живой интраназальной и производства  
инактивированной гриппозной вакцины.

10

15

20

25

30

35

40

45

50