



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **9 574** ⁽¹³⁾ **U**
(51)МПК ⁷ **A 61K 39/12, 31/197 //C 12N**
7/00

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12)

(21), (22) Заявка: 20041210763, 27.12.2004

(24) Дата начала действия патента: 17.10.2005

(46) Дата публикации: 15.10.2005

(72) Изобретатель:

Лозицкий Виктор Петрович, UA,
Федчук Алла Семеновна, UA,
Гридина Татьяна Леонидовна, UA,
Григорашева Ирина Михайловна, UA,
Славина Нина Георгиевна, UA,
Бощенко Юрий Анатольевич, UA

(73) Патентовладелец:

УКРАИНСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ
ИМ.И.И.МЕЧНИКОВА, UA

(54) СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ВИРУСНЫХ ВАКЦИН

(57)

Способ изготовления вирусных вакцин заключается в накоплении вирусосодержащего материала, инаktivации его инфекционности и добавлении стабилизатора. В качестве стабилизатора используют эпсилон-аминокапроновую кислоту в конечной концентрации 7,0-10,0 %, которую добавляют к

вакцине после ее инаktivации.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2005, N 10, 15.10.2005. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

У
А
9
5
7
4
U

U
A
9
5
7
4
U



(19) **UA** (11) **9 574** (13) **U**

(51) Int. Cl.⁷ **A 61K 39/12, 31/197 //C 12N
7/00**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12)

(21), (22) Application: 20041210763, 27.12.2004

(24) Effective date for property rights: 17.10.2005

(46) Publication date: 15.10.2005

(72) Inventor:

Lozytskyi Viktor Petrovych, UA,
Fedchuk Alla Semenivna, UA,
Hrydina Tetiana Leonidivna, UA,
Hryhorasheva Iryna Mykhailivna, UA,
Slavyna Nina Heorhiivna, UA,
Boschenko Yurii Anatoliiovych, UA

(73) Proprietor:

MECHNYKOV UKRAINIAN RESEARCH
ANTIPLAGUE INSTITUTE, UA

(54) METHOD FOR MANUFACTURING VIRAL VACCINES

(57)

The method for manufacturing viral vaccines comprises the yield of the virus-containing material, its inactivation, and the addition of the stabilizer. ϵ -aminocaproic acid is used as stabilizer at the final concentration of 7.0-10.0%.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2005, N 10, 15.10.2005. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U
A
9
5
7
4
U

U
A
9
5
7
4
U



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **9 574** ⁽¹³⁾ **U**

(51)МПК ⁷ **A 61K 39/12, 31/197 //C 12N
7/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12)

(21), (22) Дані стосовно заявки:
20041210763, 27.12.2004

(24) Дата набуття чинності: 17.10.2005

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.10.2005

(72) Винахідник(и):

Лозицький Віктор Петрович, UA,
Федчук Алла Семенівна, UA,
Гридіна Тетяна Леонідівна, UA,
Григорашева Ірина Михайлівна, UA,
Славіна Ніна Георгіївна, UA,
Бощенко Юрій Анатолійович, UA

(73) Власник(и):

УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ
ПРОТИЧУМНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. І.І.МЕЧНИКОВА,
UA

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ВІРУСНИХ ВАКЦИН

(57)

Спосіб виготовлення вірусних вакцин, що
полягає у накопиченні вірусомісного матеріалу,
інактивації його інфекційності та додаванні

стабілізатора. Як стабілізатор використовують
епсилон-амінокапронову кислоту в кінцевій
концентрації 7,0-10,0 %, яку додають до вакцини
після її інактивації.

U
A
9
5
7
4
U

U
A
9
5
7
4
U

Опис винаходу

Запропонована корисна модель відноситься до галузі медицини, біотехнології та ветеринарії, зокрема, до вірусології, конкретно, до способів виготовлення різних вакцин, які можуть бути використані для специфічної профілактики сказу у людей та тварин, грипу, герпесу у людей т.ін.

Пошук нових ефективних засобів проти масових (грип, герпес) та особливо небезпечних інфекцій (сказ) є актуальною проблемою для медичної науки та закладів охорони здоров'я усього світу. Розробка нових способів виготовлення вакцинних препаратів, які можуть ефективно захищати організм, не ушкоджуючи його, а також дозволяють використовувати вакцини з метою як профілактики, так і для лікування, дозволить успішно вирішувати цю задачу.

У сучасній вакцинології використовують різноманітні засоби для стабілізації вакцин [патенти РФ №№2157700, 2191003, 2149022, 2144369, 2127604]. Проблема стабілізації у запатентованих винаходах вирішується різними способами, залежно від виду вакцини, методу її аплікації та вимог, щодо строків зберігання вакцинних препаратів.

Для отримання високоімунних вакцин з пролонгованим строком зберігання антигенів використовували, наприклад, в одному випадку лактозопептонний стабілізатор [патент РФ №2181296], в іншому - сорбіт-желатозний [патент РФ №2194530].

У патенті РФ №2181296 [МПК7 А61К39/295, А61К39/07, А61К39/275] заявлена асоційована вакцина проти сибірки та віспи овець, стабільність якої було забезпечено додаванням лактозопептонного стабілізатору. Вакцину характеризують як ареактогенну, нешкідливу та стабільну при зберіганні. Однак, враховуючи високі первинні концентрації як спор сибірки ($180-360\text{млн.спор/см}^3$), так і вірусу віспи овець (не менше $5,0\text{lg TCID}_{50}/\text{см}^3$), слід відмітити, що висока імуногенність вакцини (імунітет високої напруги) обумовлений скоріше за рахунок високої активності інфікуючих доз збудників, а не складом використаного стабілізатору.

Відома також інша асоційована вакцина для профілактики захворювань хутряних звірів [патент РФ №2134530]. Вакцина діє водночас проти трьох збудників (чуми, аденовірусу та сальмонельозу). До складу вакцини входять декілька активних компонентів: живі атенуйовані штами збудників чуми та сальмонельозу, а також вірусна суспензія інактивованого аденовірусного штаму. У даному технічному рішенні стабілізація вакцини здійснюється сорбіт-желатозним стабілізатором. Його роль скоріше полягає в асоціюванні окремих компонентів і антигенів різних збудників у комплекс, ніж у підвищенні імуногенності.

Найбільш близьким аналогом (прототипом) запропонованої корисної моделі за суттю технічного рішення та результату, який може бути отриманий, є патент РФ №2134590 - Спосіб изготовления инактивированной вакцины против бешенства животных [МПК7 А61К39/295, А61К39/112, А61К39/235, А61К39/175].

Винахід підвищує імуногенність вакцини і може бути використаний для специфічної профілактики сказу усіх видів сільськогосподарських та свійських тварин. Фіксований вірус сказу культивують у суспензійній культурі клітин ВНК-21 при $35-37^\circ\text{C}$ впродовж 96-144 годин. Після закінчення репродукції вірусу, до суспензії вносять, як стабілізатор, поліакрилово кислоту або феракрил до кінцевої концентрації 0,7-1,0%. Потім, як інактиватор, додають димер етиленіміну до концентрації 0,1-0,3%. Суміш інкубують при $35-37^\circ\text{C}$ на протязі 20-24 годин.

До недоліків прототипу можна віднести використання препарату феракрил стабілізатором, який зазвичай в медичній практиці рекомендують для місцевого зовнішнього використання, як кровоспинного фактору; рН цього препарату знаходиться у дуже кислій зоні $\text{pH}=3,0-4,0$. Відомо, що вірус сказу є дуже чутливим до низьких значень рН, а з другого боку відомо, що феракрил утворює згусток з білками крові та нерозчинні у воді полікомплекси з білками різного походження. Такими чином, використання вакцин зі стабілізатором феракрилом для парентерального введення може викликати ускладнення у вигляді тромбозів судин.

Задача корисної моделі полягає у стабілізації вірусної вакцини шляхом застосування у якості стабілізатору такої сполуки, що є нешкідливою для організму тварин та людей, сприяє збереженню вірусних антигенів та одночасно має забезпечити підвищення імуногенності вакцин впродовж усього терміну їх придатності.

Задача вирішується тим, що при виготовленні вірусних вакцин за відомим способом, в якості стабілізатора використовують епсилон-амінокапронову кислоту - ЕАКК в кінцевій концентрації 7,0-10,0%, яку додають до вакцини після її інактивації.

Новим у винаході є те, що як стабілізатор пропонується використання епсилон-амінокапронової кислоти, яка раніше таким чином не використовувалась.

Стабілізуючі властивості ЕАКК забезпечуються у разі використання 7,0-10,0% розчину інгібітора протеолізу. ЕАКК здатна попереджувати аутоліз (природне розщеплення вірусних антигенів протеолітичними ферментами, які присутні у вірусовмісному вакцинному матеріалі). рН розчинів ЕАКК складає 7,2-7,4, що є близьким до фізіологічного значення. Збереження цілісних вірусних антигенів у процесі зберігання вакцин сприяє підвищенню імуногенності таких вакцин. Крім того, такі вакцини мають бути менш алергенними, тому що стабілізатор ЕАКК здатен перешкоджати розщепленню та деструкції білкових молекул вірусного антигену, тобто додавання його до вакцини сприяє зберіганню непошкодженими вірусних антигенів у вакцині подовжуючи термін придатності препарату.

Стабілізатор ЕАКК може бути використаний для стабілізації різноманітних інактивованих вакцин, наприклад, проти сказу, грипу, герпесу та ін. (Табл.1). При виготовленні цих вакцин, інфіковані матеріали інкубують певний час для кожної вакцини у термостаті при визначеній температурі. Стабілізатор вносять до вакцини на технологічній стадії, що є наступною після інактивації вірусовмісного вакцинного матеріалу. Спосіб реалізують наступним чином:

1. Визначають матеріал для їх виготовлення.

Вакцини проти сказу (антирабічна) та герпесу є культуральними вакцинами. Матеріалом для їхнього виготовлення є первинно-трипсинізовані культури клітин.

- Для виробництва антирабічної вакцини сформований моношар первиннотрипсинізованої культури клітин нирок сирійського хом'яків (НСХ) інфікують вірусом сказу, штам Внуково-32.

- При виготовленні культуральної інактивованої вакцини проти герпесу, яку виготовляють з двох штамів вірусів звичайного герпесу (ВЗГ), ВЗГ-1 (штам УС) та ВЗГ-2 (штам ВН) шляхом інфікування 24-48 годинного моношару життєздатних первинно-трипсинізованих клітин курячих фібробластів (ККФ) 10-11-добових курячих ембріонів.

- Вакцина проти грипу, на відміну від двох попередніх, є ембріональною. При виготовленні інактивованої вакцини проти грипу інфікують безлейкозні курячі ембріони (БЛКЕ) епідемічне актуальними штамми вірусів грипу.

2. Інкубування інфікованих матеріалів здійснюється:

- у відношенні вірусу сказу на клітинах НСХ при 32°C впродовж 96-168 годин.

- для штамів вірусу звичайного герпесу на клітинах ККФ - при 37°C±1°C до моменту розвитку цитопатичного ефекту (ЦПЕ), який полягає в ураженні клітин на 70-90%.

- для штамів вірусів грипу на БЛКЕ - при температурі 32-3 8°C протягом 3 днів.

По закінченні строків інкубації вірусомісні матеріали збирають у вигляді клітинних суспензій, згідно з правилами техніки безпеки та технології виготовлення культуральних (антирабічної і протигерпетичної) вакцин, та алантоїсної рідини - для отримання вакцини проти грипу.

3. Етап інактивації вакцин також має свої особливості для різних вакцин:

- вакцинний матеріал антирабічної вакцини інактивують ультрафіолетовим опромінюванням (УФО);

- вірусомісну рідину протигрипозної вакцини інактивують УФО після додаткового очищення за допомогою диференціального й градієнтного центрифугування;

- вірусомісний матеріал герпетичної вакцини (після розщеплення вірусів на складові антигени за допомогою октоксинол-9 або твін-ефіру) також інактивують формаліном.

4. Стабілізація вакцин здійснюється додаванням ЕАКК у всі вакцини після інактивації вірусів. До антирабічної та герпетичної вакцин ЕАКК додають до кінцевої концентрації її у вакцині 10,0%, до грипозної вакцини достатньо було внести цей стабілізатор до його вмісту в вакцині 7,0% (Табл.1). Підбір концентрації стабілізатору ЕАКК здійснювався емпірично. Було встановлено, що ЕАКК у концентрації менше 7,0% не приводила до вираженого стабілізуючого ефекту; в інтервалі концентрацій 7,0-10% мав місце оптимальний стабілізуючий вплив, а збільшення концентрації понад 10,0% - цей ефект вже не підвищувало.

Параметри етапів виготовлення вірусних вакцин					
Вакцина проти вірусів	Матеріал для накопичення вірусу	t°C інкубації	Час накопичення вірусу, год.	Інактиватор	Кінцева концентрація ЕАКК,%
сказу	культура клітин НСХ	32	96-168	УФО	10,0 ЕАКК
герпесу	культура клітин ККФ	37±1,0	24-58	формалін	10,0 ЕАКК
грипу	безлейкозні курячі ембріони	32-38	72	УФО	7,0 ЕАКК

Контроль якості усіх вакцин проводять на кожній стадії виробництва. Перевіряють активність вірусів після інфікування культур клітин (ембріонів), концентрацію вірусу у зібраному матеріалі. Після завершення усіх процедур очищення перевіряють якість очищеного препарату. Після інактивації вакцина перевіряють на наявність залишкової активності нативного вірусу. Фінальна перевірка якості вакцини полягає у визначенні відсутності вірусів людини та птахів, якими можуть бути контаміновані використані біологічні матеріали. Кожна виробнича серія вакцини має власний паспорт якості.

Використання запропонованого способу дає можливість водночас стабілізувати отриманий вакцинний матеріал, захищаючи через інгібування процесу аутолізу антигенні білкові структури від природного розщеплення, та подовжувати строки зберігання як матеріалу. Окрім того, інгібування протеолітичних процесів дозволяє підвищити імуногенність вакцин та зменшити їх алергенність.

Приклад 1

Виготовлення антирабічної вакцини

Була вивчена можливість стабілізувати її та підвищити імуногенність антирабічної вакцини за допомогою ЕАКК, яку додавали до інактивованої вакцини. Вакцину готували шляхом інфікування вірусом сказу (штам "Внуково-32") культури первинно-трипсинізованих клітин нирок сирійського хом'яка. Інфекційний титр вакцинного матеріалу дорівнював 5,5lg ТІД⁵⁰. Імунізацію контрольних та дослідних тварин (білих мишей) проводили внутрішньочеревне, двічі з інтервалом у тиждень, інактивованою антирабічною вакциною. Контрольних тварин імунізували вакциною без стабілізатора, а дослідних мишей - вакциною, яка вміщувала як стабілізатор ЕАКК в кінцевій концентрації 10%. Через 7 днів після другої імунізації тварин інфікували інтрацеребрально патогенним для мишей вірусом сказу, штам CVS. Ефективність вакцинації підраховували за загинулими тваринами на протязі 14 днів після зараження. Результати, наведені у таблиці 2, свідчать, що тварини, які були проімунізовані вакциною з ЕАКК мали на 21% більший ступінь захисту проти летальної інфекції, яка викликана вірусом сказу штаму CVS.

Вплив ЕАКК на захист білих мишей при їх імунізації антирабічною вакциною	
--	--

Умови експерименту	Кількість тварин по групах	Кількість загинув тварин	% загибелі тварин
Вакцина без ЕАКК	25	12	48
Вакцина з ЕАКК (10%)	25	7	28

Отже, можна дійти висновку, що антирабічна вакцина, за умов додавання ЕАКК, сприяє утворенню більш високого рівня віруснейтралізуючих антитіл проти сказу. Ці антитіла забезпечують більш надійний захист тварин від загибелі при моделюванні у них летальної інфекції. Таким чином, ЕАКК проявляє у вакцині нову якість - імуномодулюючу дію.

Приклад 2

Виготовлення грипозної вакцини. Була вивчена властивість ЕАКК щодо стабілізації та імуностимуляції при введенні її до інактивованої грипозної хроматографічної вакцини (ІГХВ), виготовленої із штаму вірусу грипу А /Ленінград/3 35/8 (Н3N2). Вакцинний матеріал отримували шляхом інфікування курячих ембріонів вірусом грипу штаму А /Ленінград/3 3 5/8 (Н3N2) з очищенням вірусомісної алантоїсної рідини методом диференційного центрифугування і подальшою фільтраційною хроматографією на макропористому силехромі. Цей вірусний матеріал інактивували ультрафіолетовим опромінюванням. Потім до вакцинного матеріалу додавали ЕАКК до кінцевої концентрації 7,0%. Проводили вакцинацію білих безпородних мишей, імунізуючи їх внутрішньочеревне два рази з інтервалом 14 днів вакцинним матеріалом з додаванням ЕАКК (дослід) або без додавання стабілізатору (контроль). Кров забирали проводили через 14 днів після повторної імунізації і в сироватках крові визначали титри антитіл в реакції гальмування гемаглютинації. Дослідження показали, що після імунізації тварин вакциною з 7,0% Е-АКК титри антитіл після дворазової імунізації були у 1,86 раз вище, ніж у тварин, вакцинованих без додавання у вакцину ЕАКК. Рівень антитіл у імунізованих тварин визначали після імунізації їх аналогічними вакцинними матеріалами через 3 та 12 місяців зберігання вакцини. По трьох місяцях зберігання препаратів було показано, що за умов дворазової імунізації мишей вакциною з ЕАКК титри віруснейтралізуючих антитіл у крові імунізованих тварин підвищились у 2,2 рази, а через рік зберігання вакцини зі стабілізатором титри віруснейтралізуючих антитіл підвищились в 1,31 рази у порівнянні з результатами імунізації тварин вакциною, яка зберігалася без стабілізатора (Табл.3).

Таблиця 3

Вплив ЕАКК на результати імунізації білих мишей грипозною вакциною				
Умови експерименту	Кількість тварин по групах	Титри антитіл до вірусу грипу після зберігання вакцини		
		0 міс	3 міс	12 міс
Вакцина без ЕАКК	10	1:208	1:168	1:112
Вакцина з ЕАКК (7,0%)	10	1:388	1:375	1:147

Приклад 3

Вакцину проти герпесу отримували шляхом інфікування культури клітин ККФ двома штамами вірусу звичайного герпесу: ВЗГ-1 (штам УС) та ВЗГ-2 (штам ВН), за стандартною методикою культуральних вакцин. Інактивацію вірусів проводили формаліном, який додавали до кінцевої концентрації 1:2000. Через 10 днів для нейтралізації формаліну до вакцини додавали 2,2% розчин бісульфату натрію з розрахунку 22мл на 1 літр вакцини і доводили рН до 7,2-7,4. Далі завісь центрифугували на 2500об/хв впродовж 30±2 хвилин при температурі 4±2°C. Вірусомісну надосадову рідину витримували при 4°C на протязі 7 днів при періодичному помішуванні. Після проведення контролей на стерильність (відсутність бактерій та мікоплазми) і імуногенність, напівфабрикати вакцини кожного штаму ВЗГ поєднували в серію мультивалентної вакцини у співвідношенні об'ємів 1:1. На наступній стадії до вакцини додавали ЕАКК у кінцевій концентрації 10%. Вакцину розміщували у холодильнику на 2 тижні при температурі 3±1°C, фільтрували і стерильно розливали в ампули. Для вивчення можливості ЕАКК стабілізувати вакцину та підвищувати її імуногенність, білих щурів масою 100-150г імунізували вакцинними матеріалами, що містили ЕАКК (дослід), та вакциною без додавання ЕАКК (контроль). Імунізацію як дослідних, так і контрольних тварин проводили тричі, послідовно через 3 дні, вводючи вірус внутрішньочеревне по 1,0мл. Забор крові проводили з хвостової вени щурів на 10 и 32 день після останньої імунізації. Сироватки крові прогрівали при 60°C на протязі 30 хвилин. У цих сироватках визначали титри протигерпетичних антитіл, використовуючи реакцію нейтралізації цитопатичної дії, що спричиняється вірусомісними матеріалами, на культурі тканини ККФ (Табл.4).

Таблиця 3

Вплив ЕАКК на результати імунізації білих щурів герпетичною вакциною		
Умови експерименту	Кількість тварин по групах	Титри антитіл до вірусу грипу
Вакцина без ЕАКК	10	2,5 lg
Вакцина з 10% ЕАКК	10	3,5 lg

Аналіз отриманих результатів титрування показав, що при додаванні до протигерпетичної вакцини для стабілізації ЕАКК, забезпечує підвищення титрів антитіл до герпесу у 10 разів у порівнянні з вакцинним матеріалом, що не містив ЕАКК.

Наведені приклади ілюструють здійсненність способу на 3-х вакцинах. Але, враховуючи ту властивість ЕАКК, що її використано для стабілізації, а саме, інгібування протеолітичного процесу, цей засіб може бути використаний так само і для інших інактивованих вакцин.

Таким чином, на відміну від прототипу, запропонований стабілізатор для вакцин є не тільки нешкідливим для організму людини та тварини, але й здійснює імуностимулюючий вплив при введенні вакцини, підвищуючи антителоутворення, що підтверджує підвищення імуногенності самої вакцини.

5

Формула винаходу

Спосіб виготовлення вірусних вакцин, що полягає у накопиченні вірусовмісного матеріалу, інактивації його інфекційності та додаванні стабілізатора, який відрізняється тим, що як стабілізатор використовують епсилон-амінокапронову кислоту в кінцевій концентрації 7,0-10,0 %, яку додають до вакцини після її інактивації.

10

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2005, N 10, 15.10.2005. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

U
A
9
5
7
4
U

U
A
9
5
7
4
U