



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010114819/15, 14.04.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.04.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.04.2010

(43) Дата публикации заявки: 20.10.2011 Бюл. № 29

(45) Опубликовано: 27.10.2012 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 6534065 B1, 18.03.2003. WO 97/20576 A1, 12.06.1997. Influenza virus vaccine live intranasal-Medlimmune vaccines: CAIV-T, influenza vaccine live intranasal, Drugs R.D., 2003, v.4, №3, pp.312-319. RAUW F. et al., Improved vaccination against Newcastle Disease by an ovo recombinant HVT-ND combined with an adjuvanted live vaccine at day-old, Vaccine, 2010, Jan8, v.28, №3, pp.823-833.

Адрес для переписки:

105064, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН,
директору В.В. Звереву

(72) Автор(ы):

Гендон Юрий Захарович (RU),
Маркушин Станислав Георгиевич (RU),
Акопова Ирина Ивановна (RU),
Кривцов Георгий Георгиевич (RU),
Переверзев Александр Дмитриевич (RU),
Сухно Анатолий Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Учреждение Российской академии
медицинских наук научно-исследовательский
институт вакцин и сывороток им. И.И.
Мечникова РАМН (НИИВС им. И.И.
Мечникова РАМН) (RU)

(54) СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинской промышленности и касается производства живой гриппозной ха вакцины. Способ повышения иммуногенности холодоадаптированной гриппозной вакцины характеризуется тем, что к вакцине добавляют в качестве адьюванта глютамат хитозония с

конечной концентрацией 0,5%, имеющий степень деацетилирования в пределах 66-99% и молекулярную массу в пределах 70-500 kDa. Способ прост в исполнении и позволяет эффективно повысить иммуногенность холодоадаптированной гриппозной вакцины. 5 табл., 5 пр.

RU 2 4 6 5 0 0 6 C 2

RU 2 4 6 5 0 0 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2010114819/15, 14.04.2010**(24) Effective date for property rights:
14.04.2010

Priority:

(22) Date of filing: **14.04.2010**(43) Application published: **20.10.2011 Bull. 29**(45) Date of publication: **27.10.2012 Bull. 30**

Mail address:

**105064, Moskva, Malyj Kazennyj per., 5a, NIIVS
im. I.I. Mechnikova RAMN, direktoru V.V.
Zverevu**

(72) Inventor(s):

**Gendon Jurij Zakharovich (RU),
Markushin Stanislav Georgievich (RU),
Akopova Irina Ivanovna (RU),
Krivtsov Georgij Georgievich (RU),
Pereverzev Aleksandr Dimitrievich (RU),
Sukhno Anatolij Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Uchrezhdenie Rossijskoj akademii meditsinskikh
nauk nauchno-issledovatel'skij institut vaktsin
i syvorotok im. I.I. Mechnikova RAMN (NIIVS
im. I.I. Mechnikova RAMN) (RU)**

(54) METHOD FOR IMPROVING IMMUNOGENICITY OF COLD-ADAPTED LIVE INFLUENZA VACCINE

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medical industry and concerns production of a live influenza xa vaccine. The method for improving immunogenicity of the cold-adapted influenza vaccine is characterised by the fact that the vaccine is added by an adjuvant presented by chitosonium

glutamate of final concentration 0.5% having a degree of deacetylation within 66-99% and molecular weight within 70-500 kDa.

EFFECT: method is easy to implement and enables effectively improving immunogenicity of the cold-adapted influenza vaccine.

5 tbl, 5 ex

RU 2 4 6 5 0 0 6 C 2

RU 2 4 6 5 0 0 6 C 2

Изобретение относится к медицинской промышленности и касается повышения иммуногенности ха доноров аттенуации, используемых для получения живых гриппозных вакцин.

Профилактическая вакцинация является наиболее эффективным средством предотвращения гриппозной инфекции. Наряду с инактивированными гриппозными вакцинами широкое распространение в последнее время получали живые холодоадаптированные (ха) гриппозные вакцины, которые в отличие от инактивированных гриппозных вакцин индуцируют не только нейтрализующие сывороточные IgG и IgA антитела, но также являются хорошими стимуляторами клеточного иммунного ответа. Эти вакцины получают путем реассортации ха штамма-донора аттенуации и антигенно актуальных вирулентных штаммов вируса гриппа. Они применяются интраназально, обладают длительным сроком защитного действия и вызывают иммунную защиту от дрейфовых NS вариантов. Однако существующие ха штаммы-доноры аттенуации обладают сниженным потенциалом размножения в верхних отделах респираторного тракта, что обуславливает сниженную профилактическую активность живых гриппозных вакцин.

Одним из возможных способов повысить иммуногенность гриппозных ха штаммов-доноров аттенуации является использование адъювантов. Недавно группа американских исследователей добилась повышения иммуногенности штамма вируса гриппа А, донора аттенуации с усеченным геном NS, применив в качестве адъюванта альфа-С-галактозилцерамид. Было показано, что альфа-С-галактозилцерамид повышал иммуногенность данного гриппозного штамма-донора аттенуации в десять раз (Kopezky-Bromberg et al., 2009). Данный источник информации мы рассматриваем в качестве наиболее близкого аналога.

В последнее время было показано, что для повышения иммуногенности в качестве адъювантов для гриппозных инактивированных вакцин можно использовать аминокполисахарид хитозан, соли которого усиливают иммуногенность инактивированных гриппозных вакцин как при интраназальном (Illum et al., 2001; Vason et al., 2000), так и при парентеральном введении этих вакцин (Zaharoff et al. 2007). Известен способ (US 6534065) получения интраназальной мукозальной гриппозной вакцины при использовании в качестве мукозаадгезивного адъюванта солей хитозония, полученных из деацетилированного на 80-90% хитозана с молекулярным весом от 10 до 100 kDa. При этом концентрация солей хитозония в вакцине составляла до 0,5%. Однако до настоящего времени применение препаратов хитозана в качестве адъювантов для повышения иммуногенности ха-штаммов вируса гриппа - доноров аттенуации для живых гриппозных вакцин, вводимых интраназально, не проводилось.

Техническим результатом заявленного изобретения является способ повышения иммуногенности холодоадаптированного (ха) гриппозного штамма-донора аттенуации, характеризующийся тем, что к препарату данного штамма одновременно добавляют до конечной концентрации 0,5% препараты глутамата хитозония с молекулярным весом в пределах 70-500 kDa и степенью деацетилирования 66-99%.

В качестве модели использовали ха-штамм А/Краснодар/101/35/59. Этот штамм был получен методом серийных пассажей в куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK при постепенно снижающейся температуре инкубации с последующим трехкратным клонированием методом блюшек в культуре клеток MDCK, что обеспечивает генетическую однородность штамма. Полученный штамм обладает хорошей продуктивной активностью в куриных эмбрионах и клетках MDCK при пониженных температурах и не размножается при повышенных температурах.

Полученный вариант вируса обладает уникальными мутациями нуклеотидов в генах, кодирующих белки PB2, PB1, PA, NP и M1/M2. Штамм зарегистрирован в коллекции депозитария НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН под номером 2439 от 09.06.2008. Получен патент «Аттенуированный холодоадаптированный штамм вируса гриппа А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) для получения штаммов живой интраназальной гриппозной вакцины». Патент на изобретение №2354695.

Известно, что препараты солей хитозана (СХ) при попадании на слизистую оболочку носоглотки вызывают выраженные биологические эффекты. В частности, препараты СХ вызывают замедление активности ресничек мерцательного эпителия, ослабление межклеточных контактов и, как следствие, значительное повышение проницаемости слизистых оболочек. Имеются также сведения о том, что СХ в комплексе с плазмидной ДНК повышают эффективность трансфекции эукариотических клеток. В сумме эти биологические эффекты могут способствовать более быстрому попаданию вирусного материала в процессе повышенного размножения вируса в регионарные носоглоточные лимфатические узлы и стимулировать контакт вирусспецифических молекул с антигенпрезентирующими клетками, тем самым повышая как местный секреторный, так и системный иммунный ответ.

Хитозан не растворим при физиологических значениях рН. При снижении рН ниже 6,5 (рК протонирования аминогрупп хитозана) начинается набухание, а при рН 4-4,5 происходит полное растворение исходного препарата, который при этом превращается в соль хитозония с использованной кислотой,

Однако как Vascon с сотр., так и Plum с сотр., наблюдали адьювантный эффект СХ при нанесении на слизистую оболочку носоглотки лабораторных животных и человека, которая характеризуется физиологическими значениями рН (7.0-7.2). Данные другой группы исследователей сообщают о высоких адьювантных свойствах наночастиц триполифосфата хитозония в составе интраназальных инактивированных микробных и вирусных препаратов (van der Lubben et al., 2003; Amidi et al., 2006).

Исследования, проведенные в НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАМН, показали высокие адьювантные свойства высокополимерного препарата глютамата хитозония (М.В. 200-300 kDa, степень деацетилирования исходного хитозана=85%), вводимого парентерально вместе с инактивированными гриппозными вакцинами (Ghendon et al., 2008; Ghendon et al., 2009).

С другой стороны, было показано, что контакт СХ с лимфоидными тканями в отсутствие белкового антигена при мукозальном применении приводил к стимуляции продукции регуляторных цитокинов (IL-12, IL-10, IL-4, TGF-beta), увеличению продукции ОХ62+дендритных клеток и активации CD3+Т клеток (Porporatto et al., 2004; Porporatto et al., 2005).

Примеры осуществления способа

Пример 1

К десятикратным разведениям ха штамма-донора аттенуации А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) добавляли 1% раствор глютамата хитозония (ГХ), чтобы получить 0,5% конечную концентрацию ГХ. Конечная смесь содержала также 0,9% хлорида натрия. Мышей линии Balb/c весом 10-12 г под легким эфирным наркозом иммунизировали интраназально двукратно различными разведениями ха штамма-донора аттенуации с препаратами ГХ в объеме 50 мкл. Вторую дозу вакцинного вируса с ГХ вводили на 21 день после первой иммунизации и через 10 дней у мышей брали кровь. В контрольных опытах мышам вводили вирусный материал без

ГХ. В опыте наблюдали увеличение образования сывороточных антител, задерживающих гемагглютинацию к ха штамму-донору в 4 раза при вакцинации дозой вируса $10^{5.0}$ ЭИД₅₀/ 50 мкл и в 8 раз при вакцинации дозой вируса $10^{3.0}$ ЭИД₅₀/ 50 мкл по сравнению с контролем. На основании этих фактов можно сделать вывод, что добавление ГХ к ха штамму-донору А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) при интраназальной иммунизации мышей увеличивало титры антител, задерживающих гемагглютинацию в 4-8 раз (таблица 1).

Пример 2

К десятикратным разведениям нативного ха штамма-донора аттенуации А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) добавляли 1% раствор ГХ, чтобы получить 0,5% конечную концентрацию ГХ. Конечная смесь также содержала 0,9% хлорида натрия. Мышей иммунизировали интраназально двукратно, вводя по 50 мкл различных доз ха штамма-донора от $10^{6.0}$ ЭИД₅₀/0.05 мл до $10^{2.0}$ ЭИД₅₀/ 0.05 мл с ГХ в ноздри каждого животного под легким эфирным наркозом. В контрольных опытах мышам вводили интраназально аналогичные дозы вирусного материала без ГХ. Вторую иммунизацию проводили через 21 день после первой иммунизации. Через 10 дней после второй иммунизации мышей инфицировали интраназально вирулентным штаммом А/Краснодар/101/59 (H2N2) дозой $10^{5.5}$ ЭИД₅₀/50 мкл под легким эфирным наркозом. Через 3-4 дня мышей забивали и извлекали легкие. Из легких готовили 10% суспензию. После центрифугирования суспензии в низкоскоростной центрифуге надосадов титровали путем заражения 10-дневных куриных эмбрионов. Изучение защитного эффекта у мышей, иммунизированных интраназально ха штаммом А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) с хитозаном, выявило отсутствие размножения вирулентного вируса в легких мышей, иммунизированных дозами вируса $10^{6.0}$, $10^{5.0}$, $10^{4.0}$, $10^{3.0}$, $10^{2.0}$ ЭИД₅₀/ 0.05 мл ха вакцинного варианта. Размножение вирулентного вируса в легких мышей наблюдалось только в группе, иммунизированной $10^{2.0}$ ЭИД₅₀/ 0.05 мл ха вакцинного варианта (см. таблицу 2).

В контрольной группе мышей, иммунизированной интраназально соответствующими дозами ха штамма А/Краснодар/101/35/59 без ГХ, наблюдалось активное размножение вирулентного варианта в дозах $10^{5.0}$, $10^{4.0}$, $10^{3.0}$ ЭИД₅₀/0.05 мл. Только в группе мышей, иммунизированной дозой $10^{6.0}$ ЭИД₅₀/ 0.01 мл ха штамма, наблюдалось подавление размножения вирулентного варианта (см. таблицу 2).

Полученные результаты свидетельствуют о значительном повышении защитного эффекта интраназальной вакцинации живым вирусом при введении в вакцинный материал ГХ.

Пример 3

Мышей инфицировали интраназально различными дозами ха штамма-донора аттенуации А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), содержащими ГХ в конечной концентрации 0.5%, или различными дозами вирулентного штамма А/Краснодар/101/59 (H2N2) без ГХ. Мышей инфицировали дозой 50 мкл под легким эфирным наркозом. Инфицированных мышей забивали на 3-й день или на 4-й день после инфицирования, у мышей извлекали легкие и из легких готовили 10% суспензии. Надосадов суспензий после центрифугирования на низкоскоростной центрифуге титровали путем заражения 10-дневных куриных эмбрионов. Было показано, что вирулентный вариант А/Краснодар/101/59 активно размножался в легких мышей, инфицированных различными дозами этого вируса (Таблица 3), как через 3, так и через 4 дня после инфицирования. Однако в легких мышей, инфицированных

интраназально различными дозами ха штамма А/Краснодар/101/35/59 в комбинации с ГХ не наблюдалось размножения вируса в легких ни на 3-й, ни на 4-й день после инфицирования (Таблица 3). Ха штамм-донор А/Краснодар/101/35/59 при интраназальном введении мышам не размножается в легких мышей в отличие от вирулентного штамма А/Краснодар/101/59. Как видно из полученных данных, добавление ГХ к ха штамму-донору не приводило к размножению ха штамма в легких мышей.

Пример 4

Мышей иммунизировали интраназально разными дозами ха штамма-донора аттенуации А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), содержащими 0.5% ГХ. Контрольную группу мышей иммунизировали интраназально аналогичными дозами, содержащими ГХ, того же вируса, инаktivированного УФ-облучением. Через 21 день после первой иммунизации делали повторную иммунизацию соответственно нативным вирусом или вирусом, инаktivированным УФ-облучением. Через 10 дней в каждой группе у части мышей брали кровь для определения сывороточных антител, а другую часть инфицировали интраназально вирулентным штаммом А/Краснодар/101/59(H2N2) в дозе $10^{5.5}$ ЭИД₅₀/ 50 мкл с целью определения защитного эффекта иммунизации.

Результаты изучения индукции сывороточных антител у мышей, иммунизированных различными дозами нативного ха штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), показали наличие антител в титре 1:80 при иммунизации дозами $10^{4.0}$ и $10^{3.0}$ ЭИД₅₀/ 0.05 мл и в титре 1:20 при иммунизации $10^{2.0}$ ЭИД₅₀/0.05 мл. В сыворотке крови мышей, иммунизированных аналогичными разведениями вируса, инаktivированного УФ-облучением антитела к вирусу не обнаруживались. Изучение защитной эффективности иммунизации нативным вирусом и вирусом, инаktivированным УФ-облучением с ГХ с последующим заражением вирулентным вирусом, показало, что в легких мышей, иммунизированных различными дозами инаktivированного УФ-облучением вакцинного варианта, наблюдалось активное размножение вирулентного варианта. При этом инфекционный титр в некоторых случаях превышал $10^{5.5}$ ЭИД₅₀/0.2 мл. Однако в легких мышей, иммунизированных разведениями ха штамма-донора с ГХ, при заражении вирулентным вирусом титры вирулентного вируса не превышали $10^{2.0}$ ЭИД₅₀/0.2 мл. Эти данные свидетельствуют о том, что инаktivированный препарат ха штамма-донора А/Краснодар/101/35/59 с ГХ при интраназальной иммунизации мышей в дозах $10^{4.0}$, $10^{3.0}$, $10^{2.0}$ ЭИД₅₀/0.05 мл не защищает от инфекции вирулентным вирусом А/Краснодар/101/59 (таблица 4) в отличие от тех же доз интактного ха штамма-донора с ГХ.

Пример 5

Мышам весом 10-12 г вводили интраназально ха штамм-донор А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) в дозе $10^{7.0}$ ЭИД₅₀/ 0.05 мл, содержащей 0,5% ГХ, под легким эфирным наркозом. Контрольной группе мышей вводили интраназально аналогичную дозу того же вируса без ГХ. Через 2 часа, через 24 часа и через 48 часов после интраназального введения вируса часть мышей забивали и из носовых полостей мышей готовили 10% суспензии. Эти суспензии центрифугировали в низкоскоростной центрифуге и надсадок титровали путем заражения 10-дневных куриных эмбрионов. Через 2 часа после введения вируса титры инфекционного вируса превышали $10^{4.0}$ ЭИД₅₀/ 0.2 мл как при введении вируса с ГХ, так и без него. Через 24 часа и через 48 часов после интраназального введения вируса инфекционные титры вируса также были одинаковы как при введении вируса с ГХ, так и без него, что свидетельствовало

о том, что ГХ не стимулировал повышение размножения вируса в носоглотке животных (таблица 5).

Общий вывод

5 Добавление ГХ к ха штамму-донору А/Краснодар/101/35/59, вводимому интраназально, существенно увеличивает образование гуморальных антител и защиту от последующего заражения мышей вирулентным штаммом вируса гриппа. Полученные данные позволяют сделать вывод, что добавление ГХ к ха штамму вируса гриппа - донору аттенуации для живых гриппозных вакцин может существенно
10 увеличить иммуногенность этого препарата.

Таблица 1		
Влияние хитозана на повышение титров сывороточных антител при интраназальной иммунизации мышей ха штаммом-донором А/Краснодар/101/35/59 (H2N2)		
Инфекционный титр вируса в дозе иммунизирующего материала	Титры антител, ингибирующих гемагглютинацию в сыворотке крови мышей, иммунизированных интраназально	
	без ГХ	с добавлением ГХ
$10^{5.5}$ ЭИД ₅₀ /50 мкл	1:640	1:2560
$10^{3.5}$ ЭИД ₅₀ /50 мкл	1:80	1:640

20 К ха штамму-донору аттенуации А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) в дозах $10^{3.5}$ и $10^{5.5}$ ЭИД₅₀/0.05 мл добавляли 1% раствор ГХ (рН 6,5), чтобы получить 0,5% конечную концентрацию ГХ. Конечная смесь содержала также 0.9% хлорид натрия. Мышей весом 10-12 г под легким эфирным наркозом интраназально иммунизировали
25 двукратно различными разведениями ха штамма с ГХ или без ГХ, вводя по 25 мкл в каждую ноздрю. Вторую иммунизацию проводили на 21 день после первой иммунизации и через 10 дней после второй иммунизации у мышей брали кровь. Сыворотки мышей перед постановкой РТГА обрабатывали рецептор-разрушающим ферментом. С этой целью 3 объема рецептор-разрушающего фермента фирмы Denka
30 Seiken CO.,LTD добавляли к 1 объему сыворотки и инкубировали в термостате 16-18 ч при 37°C. Затем смесь прогревали при 56°C 30 мин. и добавляли 6 объемов фосфатного буфера, после чего анализировали титры антител.

Таблица 2		
Влияние ГХ на повышение защитного эффекта при интраназальной иммунизации мышей ха штаммом-донором А/Краснодар/101/35/59		
Дозы ха штамма-донора А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), используемые при интраназальной иммунизации (ЭИД ₅₀ /0.05 мл)	Размножение вирулентного штамма А/Краснодар/101/59 (H2N2) в легких мышей, иммунизированных интраназально ха штаммом-донором А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) с ГХ и без ГХ хитозана	
	иммунизация с добавлением	иммунизация без ГХ
$10^{6.0}$	$<10^{1.0*}$	$10^{1.5*}$
$10^{5.0}$	$<10^{1.0}$	$10^{2.5}$
$10^{4.0}$	$<10^{1.0}$	$10^{3.0}$
$10^{3.0}$	$<10^{1.0}$	$10^{3.0}$
$10^{2.0}$	$10^{3.0}$	$10^{3.0}$

*) ЭИД₅₀/0.2 мл

50 Мышей весом 10-12 г иммунизировали интраназально двукратно разными дозами ха штамма-донора аттенуации А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), содержащими 0,5% ГХ или без ГХ. Вирусосодержащий материал вводили в объеме 50 мкл. Вторую иммунизацию проводили на 21 день после первой иммунизации. Через 10 дней после второй иммунизации мышей инфицировали интраназально вирулентным штаммом А/Краснодар/101/59 (H2N2) в дозе $10^{5.5}$ ЭИД₅₀/0.2 мл. Через 3 или 4 дня мышей

забивали, извлекали легкие и готовили из них 10% суспензию. Суспензию центрифугировали на низкоскоростной центрифуге и надосадок титровали путем заражения 10-дневных куриных эмбрионов.

5

Таблица 3

Сравнительное изучение размножения ха штамма-донора А/Краснодар/101/35/59 и вирулентного штамма А/Краснодар/101/59 (H2N2) в легких мышей при интраназальном введении

исследуемые штаммы и дозы заражения (ЭИД ₅₀ / 0.05 мл) ха штамм А/Краснодар/101/35/59.0	Размножение вирусов в легких мышей			
	вирус без ГХ вирус с ГХ			
	3-й день после инфекции	4-й день после инфекции	3-й день после инфекции	4-й день после инфекции
10 ^{7.0}	<10 ^{1.0*}	<10 ^{1.0*}	<10 ^{1.0*}	<10 ^{1.0*}
10 ^{6.0}	<10 ^{1.0}	<10 ^{1.0}	<10 ^{1.0}	<10 ^{1.0}
10 ^{5.0}	<10 ^{1.0}	<10 ^{1.0}	<10 ^{1.0}	<10 ^{1.0}
вирулентный штамм А/Краснодар/101/59 10 ^{7.0}	10 ^{3.5}	10 ^{3.5}	н.д.	н.д.
10 ^{6.0}	10 ^{3.0}	10 ^{3.0}	н.д.	н.д.
10 ^{5.0}	10 ^{3.0}	10 ^{2.5}	н.д.	н.д.

10

15

*) ЭИД₅₀/0.2 мл

20

Использовали различные дозы ха штамма-донора А/Краснодар/101/35/59 (H2N2), содержащие 0,5% ГХ и без ГХ. Мышей весом 10-12 г инфицировали интраназально различными этого штамма. В качестве контроля использовали различные дозы вирулентного штамма А/Краснодар/101/59 без хитозана. Через 3 или 4 дня после инфицирования мышей забивали и извлекали легкие, из которых готовили 10% суспензии. Надосадок суспензий после центрифугирования в низкоскоростной центрифуге титровали путем заражения 10-дневных куриных эмбрионов.

30

35

40

45

50

Иммуногенность и защитная эффективность нативного и инактивированного
УФ-облучением ха штамма-донора А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) при интраназальной
иммунизации мышей в комбинации с ГХ

5

Исследуемый вирус и дозы	Титр антител (РЗГА)	Титры инфекционности в легких мышей, иммунизированных интраназально ха штаммом-донором А/Краснодар/101/35/59 с последующим заражением вирулентным штаммом А/Краснодар/101/59
нативный вирус А/Краснодар/101/35/59 дозы: (ЭИД ₅₀ / 0.05мл)		
10 ^{5.0}	1:80	10 ^{2.0} *
10 ^{4.0}	1:80	10 ^{1.0}
10 ^{3.0}	1:20	10 ^{2.0}
А/Краснодар/101/35/59, инактивированный УФ-облучением дозы: (ЭИД ₅₀ / 0.05 мл)		
10 ^{5.0}	< 1:10	10 ^{3.0}
10 ^{4.0}	< 1:10	10 ^{5.0}
10 ^{3.0}	< 1:10	10 ^{4.5}

*) ЭИД₅₀/ 0.2мл

Мышей иммунизировали интраназально различными дозами ха штамма-донора
А/Краснодар/101/35/59 или того же штамма, инактивированного УФ-облучением.
Разведения вирусов содержали 0,5% ГХ. Через 21 день после первой иммунизации
делали повторную иммунизацию интактным вирусом, или вирусом,
инактивированным УФ-облучением. Через 10 дней после повторной иммунизации у
части мышей брали кровь с целью определения сывороточных антител в РЗГА, а
другую часть мышей инфицировали интраназально вирулентным штаммом
А/Краснодар/101/59 (H2N2) в дозе 10^{5.5} ЭИД₅₀/ 50 мкл. Через 3 дня после
инфицирования мышей забивали, извлекали легкие и из легких делали 10% суспензии.
После центрифугирования суспензии в низкоскоростной центрифуге десятикратными
разведениями надосадка путем заражения 10-дневных куриных эмбрионов. При
анализе титра сывороточных антител мышинные сыворотки обрабатывали
рецепторразрушающим ферментом.

Размножение ха штамма А/Краснодар/101/59/35 (H2N2) в носоглотке мышей при интраназальном введении без хитозана и с добавлением ГХ		
Время после интраназального введения вируса	Титры размножения ха штамма А/Краснодар/101/59/35 в носоглотке мышей при интраназальном введении (ЭИД ₅₀ / 0.2 мл)	
	Без ГХ	С добавлением ГХ
2.0 часа	10 ^{4.0}	10 ^{4.0}
24 часа	10 ^{3.0}	10 ^{3.0}
48 часов	10 ^{3.0}	10 ^{3.0}

Мышам весом 10-12 г вводили интраназально ха штамм-донор А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) в дозе 10^{7.0} ЭИД₅₀/ 0.05 мл, содержащей 0,5% ГХ под легким эфирным наркозом. Контрольной группе мышей вводили интраназально аналогичную дозу того же вируса без ГХ. Через 2 часа, через 24 часа и через 48 часов после интраназального введения вируса часть мышей забивали и из носовых полостей мышей готовили 10% суспензии. Эти суспензии центрифугировали в низкоскоростной центрифуге и надосадов титровали путем заражения 10-дневных куриных эмбрионов.

Формула изобретения

Способ повышения иммуногенности холодоадаптированного гриппозного штамма-донора аттенуации А/Краснодар/101/35/59 для живых гриппозных вакцин, характеризующийся тем, что для усиления иммунного ответа, достигаемого в процессе иммунизации, к препарату вируса в качестве адъюванта добавляют глютамат хитозония до конечной концентрации 0,5% в используемой вакцине.