

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201800511** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.28

(22) Дата подачи заявки
2018.08.03

(51) Int. Cl. *A61K 35/76* (2015.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

**(54) ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ
ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ**

(96) 2018000108 (RU) 2018.08.03

(71) Заявитель:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П.
ЧУМАКОВА РАН" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Ткаченко Евгений Александрович,
Дзагурова Тамара Казбековна,
Ишмухаметов Айдар Айратович,
Синюгина Александра
Александровна, Баловнева Мария
Владимировна, Егорова Мария
Сергеевна, Курашова Светлана
Сергеевна, Коротина Наталья
Александровна (RU)**

(74) Представитель:
**Пустовалова М.Л., Котлов Д.В.,
Яремчук А.А. (RU)**

(57) Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к получению вакцины для профилактики вирусных инфекций, а именно инфекции геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС). Способ получения комбинированной трехвалентной, культуральной, концентрированной, очищенной, инактивированной вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом путём репродуцирования штаммов вирусов "ПУУМАЛІА" и "ДОБРАВА", "ХАНТААН" в монослойной перевиваемой культуре клеток почек зеленой мартышки линии Vero, включающий предпочтительно осветляющую фильтрацию вирусосодержащей культуральной жидкости для удаления клеточного детрита, концентрирование ультрафильтрацией в тангенциальном потоке, очистку концентрата от балластных белков гель-хроматографией, инактивацию бетапропиолактоном, сорбцию на гидроокиси алюминия.

A1

201800511

201800511

A1

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к получению вакцины для профилактики вирусных инфекций, а именно инфекции геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Возбудителями ГЛПС являются 4 ортохантавируса, относящиеся к семейству *Hantaviridae*, отряд *Bunyavirales*, ареал распространения которых совпадает с ареалом их резервуарных хозяев на территории Евразии. Вирусы "ПУУМАЛА" и "ДОБРАВА" вызывают тяжелое заболевание на территории европейской части России и других европейских стран, в то время как два других вируса "ХАНТААН" и "СЕУЛ" распространены в азиатских странах, главным образом в Китае и Корее, а также на Дальнем Востоке России. В настоящее время коммерческие вакцины против ГЛПС производятся только в Китае и Корее, однако ни одна из этих вакцин не может применяться в европейских регионах России и других странах Европы, поскольку они производятся на основе вирусов "ХАНТААН" и "СЕУЛ", которые не обладают защитным действием против вирусов "ПУУМАЛА" и "ДОБРАВА" [Yong-K Chu, et. al., A vaccinia virus-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus, *Journal of virology*, Oct. 1995, p. 6417–6423; Е.А.Ткаченко и С.Г.Дроздов. Хантавирусы и хантавирусные лихорадки, *Эпидемиология и вакцинопрофилактика* 2002, 6, с.14-18].

Для технологии изготовления вакцинных препаратов, которые могут быть использованы для специфической профилактики ГЛПС, известны нижеследующие аналоги.

Известен аналог [Y.Choi et.al. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. *Vaccine* 21 (2003) 1867-1873], где клетки VERO E6 культивировали в спиннерных колбах на микроносителе Cytodex 3. После сбора вирусосодержащей жидкости, проводили центрифугирование для удаления клеточного детрита. Концентрирование проводили на ультрафильтрационных кассетах (Millipore) с молекулярным весом проходимых частиц 300 000 Дальтон и последующим ультрацентрифугированием при 80000g. Осадок ресуспендировали в трис-HCl буфере и проводили ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы. Недостаток данного метода получения и очистки вирусного концентрата состоит в том, что дважды используется центрифугирование. Применение высоко скоростного центрифугирования нельзя считать технологичным в масштабах промышленного производства вакцинных препаратов, т.к. требует больших временных затрат и

дополнительных условий, обеспечивающих безопасность работы персонала с особо опасными вирусами, к которым относятся возбудители ГЛПС.

Другим аналогом можно считать патент [Huang Yongcheng et.al. Production of vaccine for epidemic hemorrhagic fever using primary kidney cells of golden hamster. CN 1109782], где субстратом для получения вируссодержащей культуральной жидкости служила первичная культура клеток почек золотистых хомячков. Собранную вируссодержащую жидкость фильтровали и инактивировали формальдегидом. Концентрирование вирусного антигена проводили при помощи ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы с последующей гель-фильтрацией с целью удаления сахарозы. Очистку осуществляли при помощи ионнообменной хроматографии на Cellufine Sulfate геле. Недостатками данного метода получения вирусного концентрата можно считать использование первичной культуры клеток почек золотистых хомячков. Применение первичных культур клеток связано с риском микробной и вирусной контаминации целевого продукта. Можно отметить, что использование первичной культуры клеток в производстве вирусных вакцин связано с использованием большого числа животных, и, следовательно, с удорожанием технологического процесса. Применение перевиваемых культур клеток в качестве субстрата для репродуцирования вирусов позволяет уменьшить риск микробной и вирусной контаминации целевого продукта и существенно снизить себестоимость конечного продукта. Перевиваемые культуры клеток позволяют получать более стандартные результаты по репродуцированию вирусов, по сравнению с первичными культурами клеток. Использование ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы требует дополнительной стадии очистки от сахарозы. Ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы концентратов вирусов позволяет эффективно разделять вирусные частицы от балластных белков, но требует большого числа единиц оборудования для работы в промышленных масштабах.

В работе [Агафонов А.П. и др. Способ получения концентратов вирусов, вызывающих геморрагические лихорадки и обладающих иммуногенной и протективной активностью. RU 2029561] авторы культивируют вирус Марбург на культуре клеток фибробластов человека с добавлением человеческого сывороточного альбумина. Полученную вируссодержащую жидкость фильтруют на фильтрах МФА-С-0,6-1,5. После фильтрации её концентрируют на ультрафильтрационной системе в 20 раз. Очистку проводят при помощи диафильтрации с десятикратным объемом раствора Хэнкса. Существенным отличием данного примера получения вирусных концентратов и заявленного изобретения является тот, факт, что в процессе репродуцирования вирусов-

возбудителей ГЛПС в клетках Vero не используется сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота. После проведения диафильтрации вирусного концентрата авторы определяют, что концентрация общего белка в препарате составляет $2,5 \pm 0,5$ мг/мл, тогда как в способе, раскрытом в настоящем изобретении, после хроматографической очистки вирусосодержащего материала содержание общего белка в нем составляет 40 – 70 мкг/мл. Использование хроматографической очистки в способе, раскрытом в настоящем изобретении, позволяет снизить концентрацию общего белка примерно в десять раз.

Также аналогом представленного изобретения можно считать статью [Immunization effect of purified bivalent vaccine to haemorrhagic fever with renal syndrome manufactured from primarycultured hamster kidney cells, Chin Med J. 2005 118(9), 766-768], где вирусные штаммы, выделенные на территории Китая, культивируют на первичной культуре клеток почек хомячков. Полученную вирусосодержащую жидкость инактивируют формальдегидом и проводят очистку на колонке с Сефарозой 4 ФФ. Существенным отличием описанного выше способа от способа, раскрытого в настоящем изобретении, является: применение в качестве субстрата для репродуцирования вирусов первичной культуры клеток, а также отсутствие стадии концентрирования вирусосодержащей жидкости. В заявленном способе используется перевиваемая культура клеток, что позволяет снизить риск микробной и вирусной контаминации вирусосодержащей жидкости. Кроме того, применение предварительной стадии концентрирования вирусосодержащей жидкости позволяет использовать вирусосодержащую жидкость со средними и низкими значениями титра вируса, что в условиях промышленного производства позволяет увеличить эффективность технологического процесса. Хранение концентратов вирусов требует меньших площадей холодильных и морозильных камер, что является ещё одной положительной стороной применения стадии концентрирования вирусосодержащей жидкости. Необходимо отметить, что хроматографическая очистка вирусных концентратов, индекс концентрирования которых может составлять 100-200 раз, требует, соответственно, меньших временных затрат по сравнению с хроматографической очисткой исходного объема вирусосодержащей жидкости.

На сегодняшний день на рынке не существует разрешенных к применению вакцин для профилактики инфекции геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), вызванных ортохантавирусами, циркулирующими на территории Европы (в частности, вирусами "ПУУМАЛА" и "ДОБРАВА"). Данное изобретение использует полученные впервые в мире штаммы ортохантавирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН", которые способны к размножению в

разрешенной для вакцинного производства перевиваемой культуре клеток Vero с накоплением вирусной массы в количествах, достаточных для изготовления вакцинных препаратов для специфической профилактики ГЛПС.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание эффективной и безопасной трехвалентная вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванной ортохантавирусами "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН", циркулирующими на территории Евразии. Указанная задача решается при помощи способа получения вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом, включающего по меньшей мере следующие стадии: а) репродуцируют в перевиваемой культуре клеток линии Vero штаммы ортохантавирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН", вызывающих геморрагическую лихорадку с почечным синдромом, при этом данные штаммы адаптированы к размножению в перевиваемой культуре клеток линии Vero; б) отбирают вируссодержащую культуральную жидкость и производят осветляющую фильтрацию на фильтрах с размером пор 0,6 мкм для удаления клеточного детрита; в) производят концентрацию полученного после фильтрации материала, содержащего вирусные частицы; г) производят очистку концентрата, содержащего вирусные частицы и вирусные белки, от балластных клеточных компонентов и компонентов питательной среды; д) производят инактивацию репродуцированных вирусных частиц; е) предпочтительно, проводят стерилизующую фильтрацию на фильтрах с порами 0,22 мкм.

В некоторых вариантах изобретения данный способ характеризуется тем, что используются либо штаммы вирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН", депонированные в Государственной коллекции вирусов под номерами №1026, №1283 и №1282, соответственно, либо производные этих штаммов.

В предпочтительных вариантах изобретения данный способ характеризуется тем, что вирусы репродуцируют в перевиваемой культуре клеток линии Vero без добавления сыворотки крупного рогатого скота.

В некоторых вариантах изобретения данный способ характеризуется тем, что на стадии б) вируссодержащую культуральную жидкость отбирают пять раз с одного монослоя клеток линии Vero и отобранные жидкости объединяют перед осветляющей фильтрацией. В других вариантах изобретения данный способ характеризуется тем, что на стадии в) производят ультрафильтрацию в тангенциальном потоке, используя систему концентрирования с пределом отсечения 100 кДа. В некоторых других вариантах изобретения данный способ характеризуется тем, что на стадии г) очистку концентрата производят при помощи

гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. В некоторых других вариантах изобретения данный способ характеризуется тем, что на стадии д) инактивацию вирусных частиц производят раствором бетапропиолактона в концентрации 1:4000 при температуре (6 ± 2) °C в течение 2 часов.

В некоторых вариантах изобретения данный способ характеризуется тем, что после инактивации вирусных частиц дополнительно проводят их сорбцию на гидроокись алюминия.

Указанная задача также решается путем получения комбинированной трехвалентной, концентрированной, инаktivированной и очищенной вакцины, содержащей вирионы штаммов ортохантавирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН", для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом, согласно описанному выше способу.

В предпочтительных вариантах изобретения данная вакцина характеризуется тем, что дополнительно содержит один или несколько компонентов, выбранных из следующего списка: фосфатный буфер, альбумин человека, сорбитол, желатоза, L-цистеин, L-тирозин, L-глутамин.

В предпочтительных вариантах изобретения отличительными признаками заявляемого способа являются: репродуцирование хантавирусов в перевиваемой культуре клеток Vero без добавления сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (что улучшает показатели безопасности конечной вакцины), пятикратный сбор вируссодержащей жидкости с одного монослоя клеток (улучшает эффективность процесса получения вакцины), осветление вирус-содержащей жидкости от клеточного детрита на фильтрах с размером пор 0,6 мкм, концентрирование на ультрафильтрационных кассетах в 100 – 200 раз, хроматографическая очистка на колонках с Сефарозой 6 ФФ, инаktivация бетапропиолактоном и стерилизующая фильтрация на фильтрах с порами 0,22 мкм.

Техническим результатом настоящего изобретения является получение впервые в мире трехвалентной, концентрированной, инаktivированной, очищенной вакцины против вирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН" для эффективной специфической профилактики ГЛПС.

Подробное раскрытие изобретения

Если не определено отдельно, технические и научные термины в данной заявке имеют стандартные значения, общепринятые в научной и технической литературе. В описании данного изобретения термины «включает» и «включающий» интерпретируются как означающие «включает, помимо всего прочего». Указанные термины не предназначены для того, чтобы их истолковывали как «состоит только из».

Термин «антиген» обозначает любое вещество, которое организм субъекта рассматривает как чужеродное или потенциально опасное и против которого организм может индуцировать (запускать) иммунный ответ. Это могут быть цельные вирионы, сохранившие, хотя бы частично, присущую им структуру, а также компоненты инфекционного агента, такие как, например, белковые фрагменты вируса.

Термин «производные» для штаммов вирусов, депонированных в Государственной коллекции вирусов (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России) под номерами №1026, №1283 и №1282, обозначает вирусы, полученные из исходных вирусов, депонированных под данными номерами, имеющие схожие характеристики репликации, но отличающиеся в одной или нескольких областях генома. Под характеристиками репликации следует понимать способность и скорость размножения в культуре клеток почек зелёной мартышки Vero. Культура клеток почек африканской зелёной мартышки линии Vero была получена из эпителия почки, взятой у африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus aethiops*).

Под клеточным детритом понимают структурные компоненты клеток Vero (клеточный дебрис, апоптотические структуры и др), образующиеся в культуральной среде в процессе репродуцирования вирусных штаммов.

Известно, что трудности, связанные с разработкой вакцинных препаратов против вирусов «ПУУМАЛА» и «ДОБРАВА», обусловлены особенностями репродукции штаммов этих вирусов в чувствительных клеточных системах. Для них характерен довольно длительный цикл размножения, низкий уровень продукции и отсутствие цитопатогенного действия.

Процесс получения вакцины включает репродуцирование вируса в культуре клеток, сбор вирусосодержащего субстрата, концентрирование, хроматографическую очистку, инаktivирование, а также, при необходимости, сорбцию очищенного вируса на гидроокиси алюминия. Различные технические средства, используемые для концентрирования, хроматографической очистки, инаktivирования или сорбции антиген-содержащего материала известны специалистам в области получения вакцин и могут отличаться от средств, раскрытых в указанных ниже примерах, приведенных в качестве демонстрации возможности осуществления изобретения.

Нижеследующие примеры осуществления способа приведены в целях раскрытия характеристик настоящего изобретения и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

Для получения вирусосодержащего субстрата используют линию перевиваемых клеток почек зелёной мартышки Vero, аттестованную в качестве субстрата для

производства инактивированных вакцин (Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. Edited by A. Doyle, J. Brayan Griffiths. 1999; Cell substrates for the production of viral vaccines. F. Aubrit, F. Perugi, A. Léon, F. Guéhenneux, P. Champion-Arnaud, M. Lahmar, K. Schwamborn. Vaccine. 2015; 33(44):5905-12). Накопление культуры-продуцента достигают путем серийных пассажей культуры клеток, восстановленной из "банка" посевных клеток. Культуру клеток для заражения вирусами выращивают в роллерных бутылках объемом 1 л в среде Игла MEM с двойным набором витаминов и аминокислот и 5% сыворотки крови плодов коров. Для заражения клеток используются штаммы ПУУ-ТКД/VERO, ДОБ-СОЧИ/VERO и ХТН-Р-88/VERO вирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН", депонированные в Государственной коллекции вирусов (НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН) под номерами №1026, №1283 и №1282, соответственно. Заражение проводят на 3-4 сутки после посева клеток, сформировавших монослой, без признаков дегенерации и контаминации посторонней микрофлорой. Перед заражением клетки дважды отмывают рабочим раствором Хенкса, после чего в бутылки вносят пул вируса, предварительно разведённого средой Игла 2MEM до концентрации, обеспечивающей множественность заражения 0,1-0,5 фокусобразующих единиц (ФОЕ)/кл при объёме инокулята 15 мл на 1-литровую роллерную бутылку. Для адсорбции вируса на клетки, зараженные бутылки помещают в роллерную установку и инкубируют 1 час при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. По истечении указанного времени в каждую бутылку вносят 100 мл поддерживающей рост клеток среды Игла MEM с двойным содержанием аминокислот и витаминов (без добавления сыворотки крови плодов коров) и снова помещают в роллерную установку в термостатную комнату с температурой $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Сбор вирусодержащего материала проводят на 5, 6, 7, 8, 9 сутки после заражения и с одного монослоя клеток получают до 5 сборов вирусодержащей жидкости. Сведению подлежат сборы только вирусодержащих культуральных жидкостей, в которых инфекционный титр вируса составляет не менее $5,2 \lg \text{ФОЕ/мл}$.

Объединённый сбор (вирусодержащая культуральная жидкость) подвергают осветляющей фильтрации используя фильтр Poly Pro XL (CUNO) с размером пор 0.6 мкм.

Далее проводят концентрирование вирусодержащей жидкости путем ультрафильтрации в тангенциальном потоке, используя систему концентрирования с пределом отсека 100 кДа. Возможно использование других способов ультрафильтрации. Процесс ультрафильтрации ведут до уменьшения первоначального объёма вирусодержащей культуральной жидкости в 100-200 раз.

На этапе очистки концентрата вируса, содержащего вирусные частицы и вирусные белки, балластные компоненты удаляют с помощью гель-фильтрации с использованием Sepharose 6 FF и хроматографа AKTA purifier (GE Healthcare). Под балластными компонентами понимают балластные клеточные компоненты (фрагменты клеточных белков, фрагменты мембран, белки, РНК и ДНК клеток и др), а также компоненты питательной среды, в которой растут клетки.

Для оптимизации процессов, осуществляемых на каждом из этих этапов, предварительно определяют параметры взаимодействия вируса с разными пористыми сорбентами. Выбирают гельфильтрационную схему очистки вируса, приводящую к получению высокоактивных препаратов, удовлетворяющих требованиям к чистоте конечного продукта.

Очищенный вирус в виде вируссодержащей жидкости (пул фракций после хроматографической очистки, каждый ортохантавирус в отдельности) подвергают инаktivированию бетапропиолактоном (β -ПЛ). Бетапропиолактон перед внесением в бутыль с вируссодержащей жидкостью разводят 1:10 в дистиллированной воде, перемешивая на магнитной мешалке или вручную. Раствор β -ПЛ в концентрации 1:10 вносят в бутыль с очищенным вирусом до конечной концентрации 1:4000; смесь перемешивается на магнитной мешалке. Процесс инаktivации длится 2 часа при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$. Вируссодержащую жидкость после добавления бетапропиолактона, подвергают стерилизующей фильтрации через мембрану Millipore с диаметром пор 0,22 мкм. В некоторых вариантах полуфабрикаты моновалентных вакцин против вирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН" разводят 10-кратным раствором среды 199 в соответствии с их антигенной активностью, добавляют в качестве стабилизатора 1,0 мг/мл альбумина человека (донорский для внутривенного капельного введения). Среда 199 с солями Хенкса, с глутамином представляет собой растворённую в очищенной воде смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозы и фенолового красного, простерилизованную через фильтры с размером пор 0,1 мкм (ПанЭко). В готовый вариант вакцины могут быть добавлены один или несколько компонентов, выбранных из следующего списка: фосфатный буфер (соли буферной системы: натрия хлорид (Eur.Ph.) - 4 мг; калия хлорид (Eur.Ph.) - 0,1 мг), натрия фосфат (Eur.Ph.) - 0,71 мг; калия фосфат (Eur.Ph.) - 0,12 мг.), альбумин человека, сорбитол, желатоза, аминокислоты (L-цистеин, L-тирозин, L-глутамин). Фосфатный буфер используют в качестве растворителя, альбумин человека - в качестве стабилизатора, среда 199 - в качестве стабилизатора, аминокислоты - в качестве стабилизатора, сорбитол и желатоза - в качестве стабилизатора.

Для приготовления трехвалентной вакцины против этих вирусов определяют антигенную активность моновалентных вакцинных полуфабрикатов и рассчитывают их рабочие дозы (РД). В соответствии с предварительно установленным соотношением зависимости между количеством содержащегося в вакцине специфического антигена и её иммуногенной активностью минимальная иммунизирующая доза (МИД), то есть максимальное разведение исходного препарата, обеспечивающее продукцию вируснейтрализующих антител у 50% мышей BALB/c, соответствует 8 антигенным единицам (АЕ). Разведение исходного препарата, содержащего 4 МИД или 32 АЕ, принимают за 1 рабочую дозу (РД) моновалентной вакцины. После сведения равных объёмов моновалентных препаратов в разведениях, содержащих по 1 РД для каждой из моновакцин, и добавления адсорбента-гидроокиси алюминия (конечная концентрация $1,5 \pm 0,5$ мг/мл) получают готовую комбинированную (трехвалентную) вакцину против вирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН".

Иммуногенную активность трехвалентной вакцины против вирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН" определяют в опытах на мышах линии BALB/c по образованию вируснейтрализующих антител в ответ на введение вакцины внутримышечно 3-хкратно с 2-х недельным интервалом. Следует отметить, что вируснейтрализующие антитела к хантавирусам образуются в ответ на взаимодействие организма с поверхностными белками вирусной частицы, представляющими собой комплекс гликопротеинов G1 и G2. Выявление у вакцинированных животных способности продуцировать вируснейтрализующие антитела указывает, во-первых, на сохранение полноценных структурных вирусных белков класса G1-G2 в процессе приготовления вакцины и, во-вторых, на протективную эффективность вакцины – способность защищать от заражения вирусами-возбудителями геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС).

Для определения вируснейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных мышей используют следующий метод. Сыворотки в 2-х кратных разведениях смешивают с 50-100 ФОЕ вируса "ПУУМАЛА", вируса "ДОБРАВА" и вируса "ХАНТААН" (в параллельных опытах) и инкубируют при (6 ± 2) °C в течение 18-20 часов. На монослой клеток Vero-E6, выращенных в 24 луночных панелях (Costar), вносят по 0,2 мл вирус-сывороточной смеси и инкубируют при (37 ± 1) °C в течение 1 часа. Затем добавляют метилцеллюлозное покрытие и через 6-7 дней инкубации при (37 ± 1) °C монослой фиксируют абсолютным спиртом. Образовавшиеся в культуре клеток фокусы выявляют с помощью твёрдофазного иммуноферментного метода, используя специфические анти-хантавирусные

сыворотки и меченный пероксидазой белок "А". В качестве индикаторной системы применяют 0,05% диаминобензидин тетрахлорид с добавлением 0,02% NiCl_2 и 0,01% H_2O_2 , после чего через 15-20 мин. проводят учёт опыта. Титр вируснейтрализующих антител определяют по 50% подавлению числа фокусообразующих единиц (ФОЕ).

Для выявления в исследуемых образцах вакцины антигенов вирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН" поверхностного протективного (ПВА) и капсидного (КВА), который обеспечивает протективный Т-клеточный иммунитет, применяют вариант непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием моноклональных антител, приготовленных к эпитопам гликопротеинового комплекса хантавируса (моноклон G10 - субтип мышинных иммуноглобулинов IgG2a) и эпитопам капсидного белка (моноклоны A4 и F1 субтип мышинных иммуноглобулинов IgG1a), перекрестно реагирующими со всеми тремя вирусами. Методика постановки ИФА заключается в следующем: в лунки панели «Costar» вносят по 100 мкл моноклона G10 (или F1) в концентрации 4 мкг/мл. В качестве контроля используют мышинные иммуноглобулины класса G, не содержащие специфических антител к хантавирусам (по 100 мкл в контрольные лунки). Панели выдерживают 18 часов при $6 \pm 2^\circ\text{C}$, после чего в лунки добавляют по 100 мкл 2% БСА и оставляют на 1 час при комнатной температуре. Затем лунки промывают 5 раз по 2 мин раствором 0,01 М PBS + 0,05% Tween-20 с помощью отмывочного аппарата «Washer Bio-Rad» и вносят по 50 мкл образцов исследуемых антигенов, разведённых (начиная с 1:2) в ИФА-буфере (PBS + 0,1% BSA + 0,01% Твин-20). После инкубирования панелей в течение 1 часа при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ лунки промывают 5 раз по 5 минут и вносят в них по 50 мкл пероксидазного конъюгата в рабочем разведении, приготовленном на ИФА-буфере. После инкубирования при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1 часа лунки 5-тикратно промывают по 5 минут. Стандартный субстрат (5мг OPD на 12 мл цитратно-фосфатного буфера с pH 5,0 + перекись водорода до 0,05%) вносят по 100 мкл в каждую лунку и выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут. Реакцию останавливают 2М серной кислотой в объеме 50 мкл. Фотометрию проводят на приборе «Multiskan» при длине волны 492 нм. Положительными (содержащими специфические хантавирусные антигены) считают те образцы, для которых отношение оптической плотности в лунке со специфическим иммуноглобулином превышает показатель оптической плотности с нормальным иммуноглобулином в 2,1 (индекс P/N). Следует отметить, что протективный вирусный антиген ассоциирован с белками G1-G2, индуцирующими у экспериментальных животных

образование вирус-нейтрализующих антител обладающих протективными свойствами.

При серологическом исследовании сывороток крови мышей после 3-х кратной иммунизации образцами трехвалентной вакцины против вирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН" выявляются достаточно высокие показатели вируснейтрализующих антител к этим вирусам (таблицы 1, 2, 3), свидетельствующие об иммуногенной и протективной эффективности вакцины.

Таблица 1

Иммуногенная и протективная активность трехвалентной вакцины по отношению к вирусу "ПУУМАЛА"

Вакцина			РН		
Разведение	ПВА титр*	Белок	наличие антител у мышей (полож/обслед)	% мышей с антителами	титр**
н/р	512	100 µg/ml	8 / 8	100	145
1:2	256	50 µg/ml	7 / 7	100	60
1:4	128	25 µg/ml	8 / 8	100	18,75
1:8	64	12 µg/ml	7 / 8	87,5	18,75
1:16	32	6 µg/ml	4 / 8	50	11,25
1:32	16	3 µg/ml	2 / 8	25	7,5
1:64	8	1,5 µg/ml	1 / 8	12,5	2,5
1:128	4	0,5 µg/ml	0 / 8	0	0
1:256	2	0,2 µg/ml	0 / 8	0	0

* обратные значения титров антигена в ИФА

** среднеарифметический титр вируснейтрализующих антител

Таблица 2

Иммуногенная и протективная активность трехвалентной вакцины по отношению к вирусу "ДОБРАВА"

Вакцина			РН		
Разведение	ПВА титр*	Белок	наличие антител у мышей (полож/обслед)	% мышей с антителами	титр**
н/р	512	88 µg/ml	8 / 8	100	150
1:2	256	44 µg/ml	7 / 7	100	70
1:4	128	22 µg/ml	8 / 8	100	18,5
1:8	64	11 µg/ml	7 / 8	87,5	16,7
1:16	32	5,5 µg/ml	5 / 8	62,5	12,2
1:32	16	2,2 µg/ml	4 / 8	50	6,5
1:64	8	1,1 µg/ml	1 / 8	12,5	2,5
1:128	4	0,5 µg/ml	0 / 8	0	0
1:256	2	0,2 µg/ml	0 / 8	0	0

* обратные значения титров антигена в ИФА

** среднеарифметический титр вируснейтрализующих антител

Таблица 3

Иммуногенная и протективная активность трехвалентной вакцины по отношению к вирусу "ХАНТААН"

Вакцина			РН		
Разведение	ПВА титр*	Белок	наличие антител у мышей (полож/обслед)	% мышей с антителами	титр**
н/р	512	97 µg/ml	8 / 8	100	135
1:2	256	51 µg/ml	7 / 7	100	67
1:4	128	24 µg/ml	8 / 8	100	21,8
1:8	64	17 µg/ml	7 / 8	87,5	17,6
1:16	32	6 µg/ml	5 / 8	62,5	11,2
1:32	16	2,5 µg/ml	4 / 8	50	6,8
1:64	8	1,3 µg/ml	1 / 8	12,5	1,75
1:128	4	0,7 µg/ml	0 / 8	0	0
1:256	2	0,3 µg/ml	0 / 8	0	0

* обратные значения титров антигена в ИФА

** среднеарифметический титр вируснейтрализующих антител

Согласно требованиям ВОЗ в вакцинах, изготовленных на основе перевиваемых клеточных культур, жестко лимитируется содержание остаточной ДНК: оно не должно превышать 10 пг на 1 дозу вакцины для исключения потенциальной возможности её онкогенного и трансформирующего действия. Существуют ограничения по содержанию в конечном продукте таких гетерологичных белков, как белки сыворотки крови крупного рогатого скота.

Соответствие национальным и международным требованиям к медицинским иммунобиологическим препаратам, вводимым людям, достигается тем, что заявленный способ предусматривает заражение вирусами-возбудителями ГЛПС культуры клеток с последующей репродукцией и выходом вируса в культуральную среду, его концентрированием, очисткой, инаktivированием и сорбцией на гидроокиси алюминия (гидроокись алюминия – ALUM – применяют в качестве адъюванта). На стадии репродукции вируса используется культуральная среда без добавления сыворотки крупного рогатого скота. Специфическая безопасность (отсутствие живого вируса), бактериологическая стерильность вакцины достигаются использованием режима инаktivации вируса β-ПЛ и фильтрацией через пакет фильтров с конечным размером пор 0,22 мкм. Отсутствие туморогенности обеспечено за счет резкого снижения на стадии гельфильтрации содержания клеточной ДНК (менее чем 10 пг в одной вакцинной дозе). Практически на всех этапах изготовления вакцины, начиная от штаммов вируса и заканчивая готовой формой вакцины, предусмотрен ряд известных и новых физико-химических и молекулярно-биологических тестов, а также контролей на животных и в культуре

клеток. Эта система надёжно обеспечивает безопасность применения новой вакцины, высокий уровень и стабильность её иммунологической активности.

Ниже изложены примеры получения вакцины по настоящему изобретению.

Пример 1.

Вирусосодержащую культуральную жидкость получают путем репродукции штамма ПУУ-ТКД/VERO вируса "ПУУМАЛА" в монослойной перевиваемой культуре клеток почек зеленой мартышки (VERO). Монослой клеток получают в роллерных бутылках объемом 1 л в среде Игла MEM с двойным набором витаминов и аминокислот и 5% сыворотки крови плодов коров. После заражения монослойных культур для поддержки вирусного размножения используется среда, не содержащая компонентов сыворотки крови. Сбор вирусосодержащей жидкости начинают на 6 день. С одного монослоя клеток получают от 3 до 5 сборов вирусосодержащей жидкости. Полученную вирусосодержащую жидкость со средним титром $5,5 \lg \text{ФОЕ/мл}$ осветляют, используя фильтр Poly Pro XL (CUNO) с размером пор 0,6 мкм. Далее проводят концентрирование вирусосодержащей жидкости с помощью ультрафильтрационных кассет (Millipore) с молекулярным весом проходимых частиц 100 000 Дальтон и концентрируют в 100 – 200 раз. Концентрат очищают на колонке 2,6/70 с Сефарозой 6 Фаст Флоу со скоростью 7 мл/мин. Инактивируют бетапропиолактоном в концентрации 1:4000 при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 2 часов. Концентрация общего белка в очищенном концентрате составляет $100 \pm 50 \text{ мкг/мл}$. Очищенный инактивированный концентрат фильтруют через стерилизующий фильтр 0,22 мкм и используют для приготовления сорбированной на гидроокись алюминия моновалентной вакцины.

При серологическом исследовании сывороток крови мышей после 3-х кратной иммунизации образцами моновалентной вакцины против вируса Пуумала выявляются достаточно высокие показатели вируснейтрализующих антител к этому вирусу, свидетельствующие о протективной эффективности вакцины.

Пример 2.

Вирусосодержащую культуральную жидкость получают путем репродукции штамма ДОБ-EAT/VERO вируса "ДОБРАВА" в монослойной перевиваемой культуре клеток почек зеленой мартышки (Vero). Монослой клеток получают в роллерных бутылках объемом 1 л в среде Игла MEM с двойным набором витаминов и аминокислот и 5% сыворотки крови плодов коров. После заражения монослойных культур для поддержки вирусного размножения используется среда, не содержащая компонентов сыворотки крови. Сбор вирусосодержащей жидкости начинают на 6 день. С одного монослоя клеток получают от 3 до 5 сборов вирусосодержащей жидкости. Полученную вирусосодержащую жидкость со средним

титром 5,5 lg ФОЕ/мл осветляют используя фильтр Poly Pro XL (CUNO) с размером пор 0.6 мкм. Далее проводят концентрирование вирусосодержащей жидкости с помощью ультрафильтрационных кассет (Millipore) с молекулярным весом проходимых частиц 100 000 Дальтон и концентрируют в 100 – 200 раз. Концентрат очищают на колонке 2,6/70 с Сефарозой 6 Фаст Флоу со скоростью 7 мл/мин. Инактивируют бетапропиолактоном в концентрации 1:4000 при температуре 6 ± 2 °C в течение 2 часов. Концентрация общего белка в очищенном концентрате составляет 100 ± 50 мкг/мл. Очищенный инактивированный концентрат фильтруют через фильтр 0,22 мкм и используют для приготовления сорбированной на гидроокись алюминия моновалентной вакцины.

При серологическом исследовании сывороток крови мышей после 3-х кратной иммунизации образцами моновалентной вакцины против вируса Доброва выявляются достаточно высокие показатели вируснейтрализующих антител к этому вирусу, свидетельствующие о протективной эффективности вакцины.

Пример 3.

Вирусосодержащую культуральную жидкость получают путем репродуцирования штамма XTH-P-88/VERO вируса "ХАНТААН" в монослойной перевиваемой культуре клеток почек зеленой мартышки (VERO). Монослой клеток получают в роллерных бутылках объемом 1 л в среде Игла MEM с двойным набором витаминов и аминокислот и 5% сыворотки крови плодов коров. После заражения монослойных культур для поддержки вирусного размножения используется среда, не содержащая компонентов сыворотки крови. Сбор вирусосодержащей жидкости начинают на 6 день. С одного монослоя клеток получают от 3 до 5 сборов вирусосодержащей жидкости. Полученную вирусосодержащую жидкость со средним титром 5,5 lg ФОЕ/мл осветляют, используя фильтр Poly Pro XL (CUNO) с размером пор 0.6 мкм. Далее проводят концентрирование вирусосодержащей жидкости с помощью ультрафильтрационных кассет (Millipore) с молекулярным весом проходимых частиц 100 000 Дальтон и концентрируют в 100 – 200 раз. Концентрат очищают на колонке 2,6/70 с Сефарозой 6 Фаст Флоу со скоростью 7 мл/мин. Инактивируют бетапропиолактоном в концентрации 1:4000 при температуре 6 ± 2 °C в течение 2 часов. Концентрация общего белка в очищенном концентрате составляет 100 ± 50 мкг/мл. Очищенный инактивированный концентрат фильтруют через фильтр 0,22 мкм и используют для приготовления сорбированной на гидроокись алюминия моновалентной вакцины.

При серологическом исследовании сывороток крови мышей после 3-х кратной иммунизации образцами моновалентной вакцины против вируса Хантаан

выявляются достаточно высокие показатели вируснейтрализующих антител к этому вирусу, свидетельствующие о протективной эффективности вакцины.

Пример 4.

После сведения (до адсорбции на гидроокиси алюминия) равных объёмов моновалентных препаратов в разведениях, содержащих по 1 РД для каждой из моновакцин, и добавления адсорбента-гидроокиси алюминия (конечная концентрация $1,5 \pm 0,5$ мг/мл) получают готовую комбинированную (трехвалентную) вакцину против вирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН". Специфическую активность (иммуногенность) трехвалентной вакцины проверяют на мышах. Адсорбированный на поверхности гидроокиси алюминия концентрат вводят мышам линии BALB/c 10-12 недельного возраста, весом 18-20 г в объёме 0,5 мл внутримышечно 3-хкратно с 2-х недельным интервалом. В качестве контроля используют мышей BALB/c, которым в те же сроки вводят гидроокись алюминия без вирусного антигена. Через 2 недели после последней иммунизации у животных берут из орбитальной вены кровь и готовят из неё сыворотку. В полученных сыворотках крови определяют титры вирусспецифических антител. На 28 день после первой иммунизации мышей BALB/c выявляются вируснейтрализующие антитела к вирусам "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН" (Таблицы 1, 2, 3), свидетельствующие о высокой иммуногенной и протективной эффективности трехвалентной вакцины.

Несмотря на то, что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные случаи приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть, понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом, включающий по меньшей мере следующие стадии:
 - а) репродуцируют в перевиваемой культуре клеток линии Vero штаммы ортохантавирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН", вызывающих геморрагическую лихорадку с почечным синдромом, при этом данные штаммы адаптированы к размножению в перевиваемой культуре клеток линии Vero;
 - б) отбирают вируссодержащую культуральную жидкость и производят ее осветляющую фильтрацию для удаления клеточного детрита;
 - в) производят концентрирование полученного после фильтрации вируссодержащего материала;
 - г) производят очистку концентрата, содержащего вирионы и вирусные белки, от балластных клеточных компонентов и компонентов питательной среды;
 - д) производят инактивацию репродуцированных вирусных частиц.
2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что используются либо штаммы вирусов "ПУУМАЛА", "ДОБРАВА" и "ХАНТААН", депонированные в Государственной коллекции вирусов под номерами №1026, №1283 и №1282, соответственно, либо производные этих штаммов.
3. Способ по п. 2, характеризующийся тем, что вирусы репродуцируют в перевиваемой культуре клеток линии Vero без добавления сыворотки крупного рогатого скота.
4. Способ по п. 3, характеризующийся тем, что на стадии б) вируссодержащую культуральную жидкость отбирают пять раз с одного монослоя клеток линии Vero и отобранные жидкости объединяют перед осветляющей фильтрацией.
5. Способ по п. 3, характеризующийся тем, что на стадии в) концентрирование производят при помощи ультрафильтрации в тангенциальном потоке, используя систему концентрирования с пределом отсеечения 100 кДа.
6. Способ по п. 3, характеризующийся тем, что на стадии г) очистку концентрата производят при помощи гель-фильтрации и ионно-обменной хроматографии.
7. Способ по п. 3, характеризующийся тем, что на стадии д) инактивацию вирусных частиц производят раствором бетапропиолактона в концентрации 1:4000 при температуре $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 2 часов.
8. Способ по п. 3, характеризующийся тем, что после инактивации вирусных частиц дополнительно проводят их сорбцию на гидроокись алюминия.
9. Комбинированная трехвалентная, концентрированная, инаktivированная и очищенная вакцина, содержащая антигены штаммов ортохантавирусов "ПУУМАЛА",

“ДОБРАВА” и “ХАНТААН”, для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом, полученная по любому из пп.1-8.

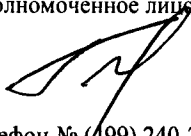
10. Вакцина по п.10, характеризующаяся тем, что дополнительно содержит один или несколько компонентов, выбранных из следующего списка: фосфатный буфер, альбумин человека, сорбитол, желатоза, L-цистеин, L-тирозин, L-глутамин.

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ
ПОИСКЕ(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201800511

Дата подачи: 03 августа 2018 (03.08.2018)		Дата испрашиваемого приоритета:	
Название изобретения: Технология получения вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом			
Заявитель: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН"			
☐ Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа) ☐ Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)			
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:			
МПК:	A61K 35/76 (2015.01)	СПК:	A61K 35/76 (2015-01)
	A61K 39/12 (2006.01)		A61K 39/12 (2013-01)
	A61P 31/12 (2006.01)		A61P 31/12 (2018-01)
	C12N 7/00 (2006.01)		C12N 7/00 (2017-08)
Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК			
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:			
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)			
A61K 35/76, 39/12, A61P 31/12, C12N 7/00			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:			
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ			
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей		Относится к пункту №
Y	RU 2445117 C2 (ТКАЧЕНКО ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ и др.) 20.03.2012, реферат, с. 4, строки 17-26, с. 6, строки 11-15, примеры 1-2, пп. 1-3, 6 формулы		1-10
Y	CHU Yong-K et al. A Vaccinia Virus-Vectored Hantaan Virus Vaccine Protects Hamsters from Challenge with Hantaan and Seoul Viruses but Not Puumala Virus. Journal of Virology, 1995, Vol. 69, No. 10, pp. 6417-6423		1-10
Y	RU 2423520 C1 (ТКАЧЕНКО ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ и др.) 10.07.2011, реферат, пп. 1-2 формулы		2
Y	RU 2495938 C2 (УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК "ИНСТИТУТ ПОЛИОМЕЛИТА И ВИРУСНЫХ ЭНЦЕФАЛИТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАМН") 20.10.2013, с. 4, строки 15-34		7
☐ последующие документы указаны в продолжении графы В ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении			
* Особые категории ссылочных документов:			
"А" документ, определяющий общий уровень техники		"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения	
"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее		"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности	
"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.		"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории	
"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета		"&" документ, являющийся патентом-аналогом	
"D" документ, приведенный в евразийской заявке		"L" документ, приведенный в других целях	
Дата действительного завершения патентного поиска:		19 февраля 2019 (19.02.2019)	
Наименование и адрес Международного поискового органа:		Уполномоченное лицо:	
Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		 М.А. Белугин Телефон № (499) 240-25-91	