

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(43) Дата международной публикации
07 ноября 2019 (07.11.2019)

WIPO | PCT



(10) Номер международной публикации
WO 2019/212378 A1

(51) Международная патентная классификация :
А 61К 39/00 (2006.01) С 07К 14/005 (2006.01)

(21) Номер международной заявки : PCT/RU20 18/000291

(22) Дата международной подачи :
04 мая 2018 (04.05.2018)

(25) Язык подачи : Русский

(26) Язык публикации : Русский

(72) Изобретатели ; и

(71) Заявители : ФАРБЕР , Борис Славинович (FARBER, Boris Slavinovich) [RU/RU]; проспект Кутузовский , 24-130А, Москва , 121 15 1, Moscow (RU). ФАРБЕР , Софья Борисовна (FARBER, Sof'ya Borisovna) [RU/RU]; проспект Кутузовский , 24-130А, Москва , 121 15 1, Moscow (RU).

(72) Изобретатель : МАРТЫНОВ , Артур Виктрович (MARTYNOV, Artur Viktrovich); ул. Корчагинцев , 1-18, Харьков , 6 1171, Har'kov (UA).

(74) Агент : ВАСИЛЬЕВА , Галина Семеновна (VASYL'IEVA, Galina Semenovna); а/я 121, Санкт-Петербург , 193 168, St.Petersburg (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны) : АЕ, АГ, АЛ, АМ, АО, АТ, АУ, АЗ, ВА, ВВ, ВГ, ВН, ВП, ВР, ВУ, ВХ, ВЦ, СА, СН, СЛ, СМ, СО, СР, СУ, СВ, СД, СЕ, СЖ, СЗ, СЛ, СМ, СТ, СВ, СХ, СЦ, ДА, ДВ, ДС, ДЖ, ДК, ДМ, ДО, ДЗ, ЕС, ЕЕ, ЕГ, ЕС, ЕИ, ЕК, ЕЛ, ЕМ, ЕН, ЕО, ЕП, ЕР, ЕС, ЕТ, ЕУ, ЕХ, ЕЦ, ГА, ГВ, ГС, ГД, ГЕ, ГЖ, ГЗ, ГМ, ГН, ГО, ГП, ГР, ГС, ГТ, ГУ, ГХ, ГЦ, ДА, ДВ, ДС, ДЖ, ДК, ДМ, ДО, ДЗ, ЕС, ЕЕ, ЕГ, ЕС, ЕИ, ЕК, ЕЛ, ЕМ, ЕН, ЕО, ЕП, ЕР, ЕС, ЕТ, ЕУ, ЕХ, ЕЦ, ИА, ИВ, ИС, ИД, ИЕ, ИЖ, ИЗ, ИЛ, ИМ, ИН, ИО, ИП, ИР, ИС, ИТ, ИУ, ИХ, ИЦ, КА, КВ, КС, КД, КЕ, КЖ, КЗ, КМ, КН, КО, КП, КР, КС, КТ, КУ, КХ, КЦ, ЛА, ЛВ, ЛС, ЛД, ЛЕ, ЛЖ, ЛЗ, ЛМ, ЛН, ЛО, ЛП, ЛР, ЛС, ЛТ, ЛУ, ЛХ, ЛЦ, МА, МВ, МС, МД, МЖ, МЗ, ММ, МН, МО, МП, МР, МС, МТ, МУ, МХ, МЦ, НА, НВ, НС, НД, НЕ, НЖ, НЗ, НМ, НН, НО, НП, НР, НС, НТ, НУ, НХ, НЦ, ОА, ОБ, ОВ, ОД, ОЕ, ОЖ, ОЗ, ОМ, ОН, ОО, ОП, ОР, ОС, ОТ, ОУ, ОХ, ОЦ, ПА, ПВ, ПС, ПД, ПЕ, ПЖ, ПЗ, ПМ, ПН, ПО, ПП, ПР, ПС, ПТ, ПУ, ПХ, ПЦ, РА, РВ, РС, РД, РЕ, РЖ, РЗ, РМ, РН, РО, РП, РР, РС, РТ, РУ, РХ, РЦ, СА, СВ, СД, СЕ, СЖ, СЗ, СМ, СН, СО, СП, СР, СС, СТ, СУ, СХ, СЦ, ТА, ТВ, ТС, ТД, ТЕ, ТЖ, ТЗ, ТМ, ТН, ТО, ТП, ТР, ТС, ТУ, ТХ, ТЦ, УА, УВ, УС, УД, УЕ, УЖ, УЗ, УМ, УН, УО, УП, УР, УС, УТ, УУ, УХ, УЦ, ФА, ФВ, ФС, ФД, ФЕ, ФЖ, ФЗ, ФМ, ФН, ФО, ФП, ФР, ФС, ФТ, ФУ, ФХ, ФЦ, ХА, ХВ, ХС, ХД, ХЕ, ХЖ, ХЗ, ХМ, ХН, ХО, ХП, ХР, ХС, ХТ, ХУ, ХХ, ХЦ, ЦА, ЦВ, ЦС, ЦД, ЦЕ, ЦЖ, ЦЗ, ЦМ, ЦН, ЦО, ЦП, ЦР, ЦС, ЦТ, ЦУ, ЦХ, ЦЦ, ЧА, ЧВ, ЧС, ЧД, ЧЕ, ЧЖ, ЧЗ, ЧМ, ЧН, ЧО, ЧП, ЧР, ЧС, ЧТ, ЧУ, ЧХ, ЧЦ, ША, ШВ, ШС, ШД, ШЕ, ШЖ, ШЗ, ШМ, ШН, ШО, ШП, ШР, ШС, ШТ, ШУ, ШХ, ШЦ, ЭА, ЭВ, ЭС, ЭД, ЭЕ, ЭЖ, ЭЗ, ЭМ, ЭН, ЭО, ЭП, ЭР, ЭС, ЭТ, ЭУ, ЭХ, ЭЦ, ЮА, ЮВ, ЮС, ЮД, ЮЕ, ЮЖ, ЮЗ, ЮМ, ЮН, ЮО, ЮП, ЮР, ЮС, ЮТ, ЮУ, ЮХ, ЮЦ, ЯА, ЯВ, ЯС, ЯД, ЯЕ, ЯЖ, ЯЗ, ЯМ, ЯН, ЯО, ЯП, ЯР, ЯС, ЯТ, ЯУ, ЯХ, ЯЦ.

HR, HU, ш , IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM , PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована :
— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

(54) Title: VACCINES WITH ENHANCED IMMUNOGENICITY, LOW ALLERGENICITY AND REACTOGENICITY

(54) Название изобретения : ВАКЦИНЫ С ПОВЫШЕННОЙ ИММУНОГЕННОСТЬЮ , НИЗКОЙ АЛЛЕРГЕННОСТЬЮ И РЕАКТОГЕННОСТЬЮ

(57) Abstract: The field of invention: the invention relates to veterinary medicine and medicine, more particularly vaccinology and pharmacy and is intended for prophylaxis and treatment of infectious and other diseases in human and animal subjects, where hypoallergenic and low-reactogenic vaccination is used. The essence of the invention: vaccines with enhanced immunogenicity, low allergenicity and reactogenicity are provided, which comprise an antigen/toxin and an adjuvant, characterized in that said vaccines comprise the vaccine antigen/toxin which has been inactivated by electromagnetic radiation in the ultraviolet and visible spectrum regions in the presence of a solution of a photosensitizer and divalent metal salts, and then covalently modified at the amino-acid residues available for modification and alcohol hydroxy groups of the antigen/toxin by at least two modifying agents simultaneously used in an amount of 0.01-10.0 % by weight based on the mass concentration of the antigen/toxin protein; the vaccines also comprise iron(III) chloride hydroxide in hydrosol form as an adjuvant. The vaccine preparations produced have high immunogenicity and protective activity against corresponding infections in a human or animal but no allergenic and reactogenic properties.

(57) Реферат : Отрасль применения : изобретение относится к ветеринарии и медицине , а именно , к вакцинологии и фармации и предназначено для профилактики и лечения инфекционных и других заболеваний человека и животных , где применяется низкоаллергенная низко реактогенная вакцинация . Суть изобретения : разработаны вакцины с повышенной иммуногенностью , низкой аллергенностью и реактогенностью , содержащей антиген /токсин и адъювант , отличающиеся тем , что содержат вакцинный антиген /токсин , инактивированный электромагнитным излучением в ультрафиолетовой и видимой областях спектра в присутствии раствора фотосенсибилизатора и солей двухвалентных металлов , а затем ковалентно модифицированный по доступным для модификации остаткам аминокислот и спиртовым гидроксилам антигена /токсина одновременно как минимум двумя модифицирующими агентами в пересчете 0,01-10,0% на массовую концентрацию белка антигена /токсина , а в качестве адъюванта содержит гидрозоль гидроксида хлорида трехвалентного железа . Полученные вакцинные препараты обладают высокой иммуногенностью и способностью защищать человека или животных от соответствующих инфекций , но при этом они не проявляют аллергенных и реактогенных свойств .



WO 2019/212378 A1

Вакцины с повышенной иммуногенностью , низкой аллергенностью и реактогенностью

5 Область техники

Изобретение относится к ветеринарии и медицине , а именно , к вакцинологии и фармации и предназначено для профилактики и лечения инфекционных и других заболеваний человека и животных , где применяется низкоаллергенная низко реактогенная вакцинация .

10 Предшествующий уровень техники

В современном мире вакцинация является одним из основных методов предотвращения эпидемий . Существуют две основных группы инфекционных заболеваний : группа инфекций , контролируемых вакцинами (применение которых предотвращает эпидемию) - входящих в схемы обязательной вакцинации и вторая группа инфекции , вакцинопрофилактика которых малоэффективна или неэффективна вовсе [1]. К первой группе инфекций относятся консервативные микроорганизмы и вирусы , антигенный состав которых неизменен и вакцина индуцирует высокие уровни защитных антител в крови . Это такие инфекции , как дифтерия , коклюш , корь , краснуха и др. Ко второй группе инфекционных заболеваний , при которых вакцинация неэффективна , относят грипп , герпесвирусные инфекции , ВИЧ /СПИД и некоторые другие [2-4]. Неэффективность вакцин в профилактике этой группы инфекций обусловлена целым рядом причин . Например , вирус гриппа представляет собой полиморфный (вирусная частица не имеет четкой структуры и формы) вирус с фрагментированным изменчивым геномом .

25 Вирус гриппа очень изменчив и способен к персистенции (пожизненному нахождению в организме человека) [5]. В организме человека и животных (в т.ч. птицы [6]) этот вирус размножается в несколько стадий - в острую продуктивную фазу инфицированная клетка выделяет вирусные частицы , способные заражать соседние клетки [7]. В фазу персистенции (латентную фазу) этот вирус «переживает » внутри клетки , при этом утрачивая часть фрагментированного генома или захватывая куски человеческой РНК в цитоплазме [8]. Согласно статистике , антигенный состав вируса гриппа в месяц меняется на 5% [9]. Соответственно , применение стандартных подходов к разработке антигриппозных вакцин является бесперспективным . Даже применение рекомбинантных белков и новых видов генных вакцин не избавляет такие препараты от быстрого

устаревания . Наличие в одной ампуле нескольких консервативных белков (например , гемагглютининов и нейраминидаз для вируса гриппа) не позволяет защитить организм от вирусной агрессии через индукцию выработки специфических антител . Эти антитела будут иметь совершенно не ту моноклональную специфичность , которая будет необходима при таком уровне мутации вирусов . Изменение подхода к проектированию вакцин должно 5 сопровождаться включением в состав вакцин таких антигенов , которые еще не появились в результате мутации вирусов [10]. Так называемое предиктивное включение антигенов возможно двумя путями : классическим с применением методов эпидемиологического прогнозирования антигенного дрейфа и путем частичной модификации антигенов с 10 получением неограниченного количества комбинаций антигена в одной ампуле антигена [11]. Первое направление себя оправдало лишь частично : ни в одном случае прогноз антигенного дрейфа не совпал с реальными мутационными изменениями нейраминидазы и гемагглютинина гриппа [12,13]. Если использовать технологию частичной модификации 15 белкового компонента вакцинного антигена , например , нейраминидазы 1 типа , в процессе приготовления вакцины , то в одной дозе вакцины вместо одного белка с одним антигенным профилем появится более миллиона белков с одной первичной и вторичной структурой , но разными сайтами замещения и разным антигенным профилем .

Индукцированные этим белком антитела будут перекрывать все возможные комбинации сайтов присоединения . Соответственно , количество индуцированных 20 моноклонов будет на порядок выше , хотя белок останется тот же самый . При этом любой «будущий » эпитоп структуры нейраминидазы будет перекрыт уже синтезированными антителами .

Такой подход позволяет : резко сократить количество антигена для вакцинации , защищать организм от вирусов с фрагментированным геномом и высокоизменчивых 25 микроорганизмов небольшим количеством антител , но со значительно большим спектром моноклональной специфичности . Грубо говоря , вакцина будет содержать набор даже тех антигенов нейраминидазы , которые еще не существуют . При этом в крови вакцинированных ранее животных уже будет находиться необходимый пулл антител к «будущему » штамму вируса . Применение такой вакцины позволит успешно защищать 30 организм от высокоизменчивых персистирующих , а также низкоиммуногенных вирусов и микроорганизмов .

Инактивация вакцинного антигена является одним из основных этапов производства вакцины . За счет обработки формалином или пропиолактоном вакцинного антигена / 30 токсина иммуногенность последнего часто падает на несколько порядков , а ковалентная

модификация протеидов приводит к аномальной аллергенности и реактогенности за счет появления новых иммуногенных эпитопов . Одним из перспективных путей исключить потерю иммуногенности и усиление реактогенности и аллергенности является исключение ковалентной модификации антигена модификатором . К таким средствам можно отнести средства фотодинамической инактивации микроорганизмов . Суть метода заключается в добавлении изначально нетоксичного и абсолютно безвредного рибофлавина к суспензии микроорганизма с последующим облучением смеси светом определенных длин волн . При этом наблюдается активация рибофлавина , который в присутствии двухвалентных металлов проявляет нуклеазную активность - необратимо фрагментирует инфекционную РНК и ДНК . При этом не наблюдается ковалентной модификации белков , присоединения рибофлавина к нему , а только дезаминирование и декарбоксилирование ряда аминокислот в составе белковых антигенов . Такая модификация практически не влияет на иммуногенность исходного белкового антигена , но инактивирует ферментативные рецепторные активности токсинов . Такая технология инактивации токсином широко применяется в стерилизации донорской крови .

Хотя распространение вирусных заболеваний , таких как ВИЧ , ВГВ , ВГС через переливание крови контролируется в значительной степени , но угроза возникновения заболеваний от патогенных микроорганизмов и бактериальное загрязнение концентратов тромбоцитов остается серьезной угрозой с серьезными клиническими последствиями . В отличие от хорошо сформированных стратегий инактивации патогенов для свежзамороженной плазмы с помощью процедуры растворителя -мощного средства или метиленового синего и видимого света , разработки новой технологии инактивации патогенов для клеточных компонентов крови , таких как тромбоциты и красные клетки крови все еще ведутся [14]. Разработанные системы инактивации патогенов (СИП) оказались эффективными против многочисленных бактерий , вирусов и паразитов . Для обеззараживания концентратов тромбоцитов успешно применяются две основные системы : обработка псораленом и ультрафиолетом А (УФА) и обработка рибофлавином (витамин В2) и ультрафиолетом Б (УФБ), оба из которых направлены на нуклеиновые кислоты возбудителей . Ранее была описана способность системы Mirasol PRT обезвреживать как патогены , так и белые кровяные клетки . Технология использует комбинацию рибофлавина и У Ф -света , чтобы вызвать необратимую фрагментацию нуклеиновых кислот возбудителей и белых кровяных клеток (WBCs) для подавления репликации и функции патогенов (вирусов , микроорганизмов и грибов) [15]. Итак , методики СИП могут рассматриваться как "смена парадигмы " для обеспечения безопасного переливания крови , поскольку СИП

использует различные физические, химические или фотохимические способы для удаления или инактивации таких клеточных патогенов, таких как вирусы, бактерии и паразиты в компонентах крови или их продуктах без изменения иммуногенности последних. Эти методы СИП включают, но не ограничивают растворитель / детергент (S / D),

5 нанофильтрацию и фотохимическую инактивацию с применением метиленового синего (МС), псоралена или рибофлавина. В настоящее время исследования по технологии СИП для компонентов крови (плазмы и тромбоцитов) достигли значительного прогресса. Можно выбрать несколько способов инактивации, включая МС, Псорален и рибофлавин. Эти методы направлены на вирусные нуклеиновые кислоты (НК) через фотохимическую

10 инактивацию. Метиленовый синий (МС) - фенотиазинный краситель, имеющий естественное сродство к ЧС. После воздействия видимого света (620-670 нм) МС может выделять реактивные виды кислорода (преимущественно синглетный кислород) с помощью фотодинамической реакции для индукции гуанин-специфического расщепления вирусной РНК, что приводит к необратимой инактивации вируса. МС эффективен для

15 инактивации многих капсульных вирусов. Хотя иногда сообщают о некоторой аллергической побочной реакции, МС применяется в 18 странах для инактивации одиночных контейнеров с плазмой с минимальной токсичностью, что подтверждает длительную безопасность плазмы, обработанной МС [16].

Амотозален (S-59), известный как сильный фотосенсибилизатор, представляет собой синтетическое производное Псоралена, выделенный ранее из многочисленных растений. Через три этапа световой обработки, опосредованный амотозален, ингибирует также репликацию, механизм транскрипции и репарацию нуклеиновых кислот. Технология инактивации плазмы на основе псоралена (Cerus, Concord, CA) внедрена как успешный коммерческий продукт Amotosalen / UVA, он используется почти десять лет в более чем

20 странах. Эта технология была доказана как эффективная для инактивации широкого спектра вирусов, бактерий и паразитов, а также лейкоцитов, содержащихся в продуктах крови, и считаются безопасными без всяких необычных побочных эффектов или событий токсичности [17].

Как инактиватор патогенов соединения на основе рибофлавина (витамин В2)

30 работают после облучения ультрафиолетовым излучением (265-370 нм). Эта фотодинамическая реакция генерирует синглетный кислород, который отвечает за фотоокисление гуаниновых основания нуклеиновых кислот и приводит к разрыву и фрагментации цепи полинуклеотидов, благодаря чему необратимо повреждает нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК) и дезаминирование и декарбоксилирование

поверхностных аминокислоты в составе белков без существенного изменения их структуры и иммуногенности .

Рибофлавин по классу токсичности FDA отнесены к "GRAS" (обычно считается безопасным), из-за широкого распространения в различных природных пищевых продуктах и человеческой крови , ни рибофлавин , ни продукты его метаболизма не нужно удалять после обработки . Многие исследования показали эффективность этой технологии при инактивации широкого спектра патогенных микроорганизмов (бактерий , вирусов и простейших и т.д.). Mirasol (Terumo BCT , США), основанный на технологии Riboflavin / UVB СИП , использовался во многих центрах крови во многих странах мира [18].

10 Преимущества СИП включают : (а) методы СИП особенно эффективны для предотвращения бактериальных инфекций , связанным с трансфузией ; (Б) методы СИП в глобальном масштабе уменьшают риск передачи заболеваний через переливание заменяют γ -излучения для профилактики GvHD. (В) Гемостатическая эффективность СИП , сохраняется в течение длительного периода . В исследовании , проведенном Castrillo и соавт .

15 СИП по методике Mirasol, продемонстрировано минимальную потерю параметров качества тромбоцитов . Минимальное уменьшение закручивания было отмечено на 7-й день хранения , указывает на то, что морфология клеток сохраняется во всех популяциях клеток .

Исследования *in vitro* показали , что препараты крови (ПК), которые обрабатывались СИП , были широко достоверно проверены в большем масштабе в мире и имеют

20 значительную широкую документацию . Экспрессия активированного рецептора фибриногена , как оказалось , увеличивается после СИП , возможно , через прямое влияние СИП на этот интегрин . Эти данные касаются в основном метода амостален / UVA и, в меньшей степени , метода рибофлавина / У Ф . Одним из важнейших критериев выяснения является экономическая стоимость и возможность осуществления более широкого

25 применения , особенно в условиях высоких требований и ограниченных ресурсов , как это наблюдается в развивающихся странах . Однако недавние анализы показали , что продукты , которые лечат ОПТ , могут фактически снизить общие расходы на здравоохранение и продолжительность пребывания в больнице , связанные с пост -трансфузионной помощью некоторым пациентам . Благодаря способности терапии Mirasol PRT смог инактивировать

30 все остаточные лейкоциты в продукте , содержащие множество вирусных антигенов , он может быть использован как альтернатива γ -облучению , что позволяет сэкономить огромные медицинские расходы и обеспечить повышенный комфорт и удовольствие пациента . Кроме того , было установлено , что система Mirasol PRT, которая считается золотым стандартом для инактивации остаточных лейкоцитов в продуктах крови ,

предотвращает накопление и секреции (большинства ассоциированных с WBC- цитокинов) с потенциалом для профилактики лейкоцит - опосредованных иммунологических реакций у пациентов [19]. Система "Мирасол" проста в использовании и не требует специальной подготовки для эксплуатации оборудования. Эта технология позволяет устранить остаточный риск для большинства бактерий, а также уменьшает риск, связанный с большим перечнем трансфузионных патогенов, на которые не проводится контроль при переливании крови. Нужны дополнительные исследования, необходимые для полного понимания различных механизмов, применяемых для ПИ, и, следовательно, ПИ остается вызовом в ближайшее время, что, в свою очередь, требует более согласованных усилий для получения длительных и стабильных клинических преимуществ.

Но указанные выше технологии не применяли для замены формалина и мертиолат в вакцинологии. Фактическое отсутствие аллергических реакций на продукты обработки микроорганизмов делают указанную технологию перспективной для применения в вакцинному производстве. Более длительная обработка ферментов также приводила к потере ими каталитических свойств [20], а обработка крови больных ботулизмом рибофлавином и У Ф -излучением даже приводила к инаktivации токсина в крови [21]. Именно эти предпосылки дали нам идею о экстраполяции опыта трансфузиологов с фотодинамической инаktivацией препаратов крови на вакцинологию с целью замены инаktivаторов / консервантов на нетоксичные метаболитные средства фотоинаktivации, от которых не нужно очищать вакцину и которые не образуют ковалентных связей с антигенами вакцин. Последний факт не приводит к уменьшению на порядки иммуногенности вакцин и увеличению в разы их аллергенности и реактогенности за счёт именно ковалентно измененных фрагментов антигена формалином.

Ансамбль или супрамолекулярный ансамбль — термин из супрамолекулярной химии; Объекты супрамолекулярной химии — супрамолекулярные ансамбли, строящиеся самопроизвольно из комплементарных, т. е. имеющих геометрическое и химическое соответствие фрагментов, подобно самопроизвольной сборке сложнейших пространственных структур в живой клетке (Стид Дж. В., Этвуд Дж. Л. Супрамолекулярная химия, — М.; Академкнига, 2007). В связи с тем, что при синтезе из одной молекулы антигена (или его фрагмента после протеолиза) при наличии двух модификаторов синтезируется множество производных, между их молекулами обязательно образуются межмолекулярные ионные и водородные связи. Таких супрамолекулярные структуры обладают значительно более высокой биологической активностью, чем исходный антиген — образуют множество химерных, похожих на исходный антиген, молекул, но со

способностью индуцировать синтез тысяч разных моноклонов иммуноглобулинов в организме. В эксперименте была подтверждена более высокая иммуногенность такой супрамолекулярной структуры, чем у немодифицированного антигена. Нами использована комбинаторная смесь производных предварительно фото-инактивированного антигена в виде супрамолекулярного ансамбля без разделения на отдельные компоненты.

Одновременная комбинаторная модификация двумя модификаторами – если в реакции комбинаторного синтеза используют полифункциональную молекулу – в нашем случае белок с антигенными свойствами или полисахарид с множеством доступных для одновременной модификации групп (аминогруппами, гидроксильными сахаридными или аминокислотными группами), в реакцию сразу вводят два модифицирующих агента, например, уксусный ангидрид и янтарный ангидрид. В результате реакции образуется смесь ацилированных производных в разных положениях – ацетил-сукцинил производных антигенов. В результате из одной молекулы с пятью эпитопами, индуцирующими в организме синтез пяти моноклонов иммуноглобулинов будут индуцироваться сотни моноклональных иммуноглобулинов к сотням новых эпитопов.

Известны вакцины с повышенной иммуногенности с частично модифицированными антигенами и измененными зарядами основных аминокислот на противоположный заряд [22]. Применение таких вакцин позволяет повысить эффективность вакцинации за счет повышения иммуногенности, расширить количество эпитопов в их структуре. Количество новых эпитопов пропорционально количеству производных в супрамолекулярной комбинаторной смеси. Указанные вакцины имеют ряд недостатков; у них не наблюдается снижения реактогенности и аллергенности против изначального антигена, инактивированного формалином или нагреванием. Кроме того, модификация одним модификатором ограничивает количество производных и эпитопов и ограничивает их иммуногенность. Предлагаемое нами изобретение включает вакцины, содержащие не только нековалентно инактивированный антиген без утраты его иммуногенности, но и благодаря двум модификаторам на два порядка более иммуногенный за счет увеличения количества производных антигенных детерминант.

30 Раскрытие изобретения

Задачей изобретения является разработать вакцины с повышенной иммуногенностью, низкой аллергенностью и реактогенностью.

Поставленная задача решается путем получения вакцин с повышенной иммуногенностью, низкой аллергенностью и реактогенностью, содержащие

антиген /токсин и адъювант отличающийся тем, что вакцины содержат исходный антиген /токсин сперва инактивированный электромагнитным излучением в ультрафиолетовой и видимой области спектра в присутствии раствора фотосенсибилизатора и солей двухвалентных металлов, а затем ковалентно

5 модифицированный по доступным для модификации остаткам аминокислотных групп гидроксильных групп антигена /токсина как минимум двумя модифицирующими агентами в пересчете 0,01-10,0% на массовую концентрацию белка антигена /токсина, а в качестве адъюванта содержит гидрозолю железа гидроксида. В качестве фотосенсибилизатора могут

10 быть использованы включая, но не исключая: рибофлавин, рибофлавин мононуклеотид, рибофлавин динуклеотид, метиленовый синий, толуидиновый синий, диметилметиленовый синий, хлорофиллы, гемпорфирины, коболамины или смесь из них. В качестве антигенов могут быть использованы: корпускулы живого микроорганизма, фаголизат

15 микроорганизма, вирионы, микробный экзотоксин, микробный эндотоксин, смесь ацеллюлярных микробных антигенов, микробный гликопротеид, смесь микробных гликопротеидов, микробный пептид, смесь микробных пептидов, микробный полисахарид, смесь микробных полисахаридов, микробный липополисахарид, смесь микробных

20 липополисахаридов, целый вирион, вирусный белок, смесь вирусных белков. При этом указанные антигены могут быть предварительно нарезаны протеолитическими ферментами включая, но не ограничиваясь: трипсином, пепсином, протеиназой -К, химотрипсином или с помощью синтетических протеаз. В качестве двухвалентных металлов - усилителей фотокатализа /фотонуклеолиза могут быть использованы как отдельно так и в смеси друг с

25 другом водорастворимые соли включительно, но не исключая: магния, кальция, цинка, железа, меди, стронция, кобальта, никеля. Для ковалентной модификации остатков лизинов и гистидинов белкового компонента антигена /токсина используют ацилирование включая, но не ограничиваясь ангидридами карбоновых и поликарбоновых кислот, алкилирование

30 включая, но не ограничиваясь галогенпроизводными карбоновых и поликарбоновых кислот либо одновременно ацилирование и алкилирование включая, но не ограничиваясь ангидридами карбоновых и поликарбоновых кислот и галогенпроизводными карбоновых и поликарбоновых кислот соответственно.

Описанная заявка может быть применена при разработке вакцин для профилактики таких инфекций, как: грипп, гепатиты, вирусы герпеса, кори, краснухи, ВИЧ /СПИД, вирусных инфекций животных: болезни Нью-Касла, инфекционной бурсальной болезни птицы, классической чумы свиней, африканской чумы свиней и любых других заболеваний, терапии рассеянного склероза. В связи с частичной модификацией структуры в процессе

реакции модификации образуется огромное количество разнообразных производных вакцинного антигена с разной иммуногенностью и структурой, и соответственно иммунная система индуцирует синтез большого количества моноклонов в ответ на эти новые антигенные детерминанты. Кроме того, такое разнообразие новых эпитопов (сотни тысяч или даже миллионы) позволяет предиктивно защищать организм от еще несуществующих будущих штаммов гриппа и мутантных вирусов ВИЧ /СПИД.

Вакцины могут быть использованы как для парентерального введения (подкожно, внутрикожно, внутримышечно и внутривенно); перорального введения в виде таблеток, капсул, сублингвальных таблеток, конфет для детей, мороженого, конфет, пастилок, напитков; ректального введения в виде суппозитория; трансдермального введения в виде трансдермальных мазей, гелей, пластырей или устройств; интраназального введения в виде устройств небулайзеров через аэрозольное распыление или в виде интраназальных капель или мазей.

Иммуногенность фрагментированных протеазами вакцин обеспечивается образованием химерных супрамолекулярных структур, подобным исходным белкам, но в большем разнообразии форм.

Лучший вариант осуществления изобретения

Пример 1 - Получение корпускулярной вакцины
Инактивация бактерий на примере синегнойной палочки с применением метода фотодинамической инактивации

Синегнойную палочку культивировали на твердой питательной среде (МПБ с добавлением 1% глюкозы). Через трое суток поверхность питательной среды всплошную была покрыта *P.aeruginosa 6616* (Ukraine, Kharkov, IMI). Для получения вакцины планируется разработка вакцины. Из поверхности среды в чашке Петри делали смыв 0,9 % раствором натрия хлорида, а полученную суспензию трехкратно отмывали и центрифугировали. После повторного суспендирования добавляли рибофлавин (либо рибофлавина мононуклеотид, рибофлавина динуклеотид, метиленовый синий, толуидиновый синий, диметилметиленовый синий) до конечной концентрации 5-640 нМ, оставляли на 2-40 мин, добавляют 1-1000 мМ/л раствора соли двухвалентного металла (в качестве солей двухвалентных металлов могут быть использованы как отдельно так и в смеси друг с другом водорастворимые соли включительно, но не исключая: магния, кальция, цинка, железа, меди, стронция, кобальта, никеля) как активатора нуклеолиза,

обработывали электромагнитным излучением в ультрафиолетовой или видимой области оптического спектра в течение 2-50 минут при мощности 10-900 мкВ /мл, а затем опять засеивали на ПМА с целью контроля инактивации . В таблице 1 представлены результаты зависимости эффективности инактивации от инактиватора и его дозы при облучении в 5 течение 5 минут светом с длиной волны 320 нм и мощностью 500 мкВ /мл для флавинов и при 560 нм для фенотиозинов и порфиринов . В таблице 2 приведены результаты зависимости эффективности инактивации в зависимости от длины волны электромагнитного излучения при мощности излучателя 500 мкВ /мл, времени обработки 5 минут и концентрации каждого фотоинактиватора 40 мкМ /л с применением белой 10 светодиодной лампы и призмы для выделения нужных длин волн .

Таблица 1. Зависимость эффективности инактивации *P. aeruginosa* от инактиватора и его дозы при начальной дозе 10 lg КУО /мл

№ п/п	Фотосенсибилизатор	Концентрация нМ/л	Ig КУО/мл после обработки
1.	Рибофлавин	1	6
2.		5	2
3.		10	1
4.		20	0
5.		40	0
6.		80	0
7.		160	0
8.		320	0
9.		640	0
10.		1280	-*
11.	Рибофлавин мононуклеотид	1	4
12.		5	1
13.		10	0
14.		20	0
15.		40	0
16.		80	0
17.		160	0
18.		320	0
19.		640	0

20.		1280	-*
21.	Рибофлавин	1	3
22.	динуклеотид	5	0
23.		10	0
24.		20	0
25.		40	0
26.		80	0
27.		160	0
28.		320	0
29.		640	0
30.		1280	-*
31.	Метиленовый синий	1	6
32.		5	2
33.		10	1
34.		20	1
35.		40	0
36.		80	0
37.		160	0
38.		320	0
39.		640	0
40.		1280	2
41.	Толуидиновый синий	1	6
42.		5	2
43.		10	1
44.		20	1
45.		40	0
46.		80	0
47.		160	0
48.		320	0
49.		640	0
50.		1280	2
51.	Диметиленовый синий	1	2
52.		5	1

53.		10	1
54.		20	1
55.		40	0
56.		80	0
57.		160	0
58.		320	0
59.		640	0
60.		1280	1
61.	Хлорофилл альфа (на ТВИН-80)	1	2
62.		5	2
63.		10	1
64.		20	1
65.		40	0
66.		80	0
67.		160	0
68.		320	0
69.		640	0
70.		1280	-*
71.	Гем	1	3
72.		5	2
73.		10	2
74.		20	1
75.		40	0
76.		80	0
77.		160	0
78.		320	0
79.		640	0
80.		1280	-*
81.	Цианокобаламин	1	6
82.		5	5
83.		10	4
84.		20	4
85.		40	4

86.	80	2
87.	160	3
88.	320	2
89.	640	0
90.	1280	-*

*- не проверялись в связи с невозможностью достичь целевой концентрации

Как видно из таблицы 1, в области концентраций от 5 до 640 нМ/л большинство фотоинактиваторов проявили достаточную эффективность для инактивации синегнойной палочки.

В качестве исходных микробных вакцинных антигенов также могут быть использованы: фаголизаты микроорганизма, микробный экзотоксин, микробный эндотоксин, ацеллюлярные микробные антигены, микробный гликопротеид, смесь микробных гликопротеидов, микробный пептид, смесь микробных пептидов, микробный полисахарид, смесь микробных полисахаридов, микробный липополисахарид, смесь микробных липополисахаридов. Перед или после фотоинактивации такой антиген /токсин может быть нарезан на фрагменты с помощью протеаз, включая, но не ограничиваясь трипсином, пепсином, протеиназой -К, химотрипсином, с помощью синтетических протеаз. В качестве солей двухвалентных металлов могут быть использованы как отдельно так и в смеси друг с другом водорастворимые соли включительно, но не исключая: магния, кальция, цинка, железа, меди, стронция, кобальта, никеля. Вместо бактериального антигена /токсина из описанных выше вариаций могут быть использованы цельный вирион, вирусный белок, смесь вирусных белков или предварительно нарезанные протеазами вирусные антигены. В качестве исходных антигенов могут быть использованы вирусы: гриппа, гепатиты, вирусы герпеса, кори, краснухи, ВИЧ /СПИД, вирусных инфекций животных; болезни Нью-Касла, инфекционной бурсальной болезни птицы, классической чумы свиней, африканской чумы свиней (и любых других заболеваний), терапии рассеянного склероза. В связи с частичной модификацией структуры в процессе реакции модификации образуется огромное количество разнообразных производных вакцинного антигена с разной иммуногенностью и структурой и соответственно иммунная система индуцирует синтез большего количества моноклонов, в ответ на эти новые антигенные детерминанты. Кроме того, такое разнообразие новых эпитопов (сотни тысяч или даже миллионы) позволяет предиктивно защищать организм от еще несуществующих будущих штаммов гриппа и мутантных вирусов, ВИЧ /СПИД.

Таблица 2. Зависимость эффективности инактивации *P. aeruginosa* в зависимости от длины волны электромагнитного излучения при начальной дозе 10^8 КУО /мл

№ п/п	Фотосенсибилизатор	Длина волны, нм	lg КУО/мл после обработки
1.	рибофлавин	180	0
2.		220	2
3.		260	1
4.		320	0
5.		360	0
6.		400	0
7.		440	0
8.		480	0
9.		520	9
10.		560	8
11.		600	9
12.		640	9
13.		680	7
14.		720	6
15.	Метиленовый синий	180	10
16.		220	9
17.		260	8
18.		320	9
19.		360	9
20.		400	9
21.		440	9
22.		480	7
23.		520	4
24.		560	3
25.		600	3
26.		640	0
27.		680	0

28.		720	0
29.	Хлорофилл альфа (на ТВИН-80)	180	9
30.		220	9
31.		260	10
32.		320	10
33.		360	10
34.		400	9
35.		440	9
36.		480	6
37.		520	7
38.		560	0
39.		600	0
40.		640	4
41.		680	6
42.		720	9

Двойная ковалентная модификация корпускулярного антигена для увеличения иммуногенности вакцины

По количеству микробных тел, полученная суспензия отвечала 10 млрд. клеток /мл или 10 Ig КУО /мл; затем 0,1 мл суспензии разводили в 100 раз 0,9% раствором натрия хлорида и устанавливали концентрацию поверхностных белков с помощью Биуретового метода или в реакции комплексообразования с бромфеноловым синим методом Флореса или спектрофотометрически с применением формулы Калькара .

В пересчете на белок проводили реакцию двойной ковалентной модификации путем добавления к суспензии инактивированных бактерий (измельченных до порошка янтарного и малеинового ангидридов ; в количестве : от 0,01 до 10% от установленного количества белка . Вместо янтарного и малеинового ангидридов ; могут быть использованы другие комбинации модификаторов ; включая , но не исключая : ангидриды карбоновых и поликарбоновых кислот ; галогенангидриды карбоновых и поликарбоновых кислот . При использовании менее 0,01% , степени ацилирования иммуногенность вакцины не отличается от иммуногенности не модифицированного антигена . При использовании степеней

модификации более 10% иммуногенность вакцины падает до значений меньше, чем у исходного не модифицированного антигена.

В результате реакции модификации получили 8 образцов с разными степенями ацилирования : 1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13 %, 15%. Превышение 15% полностью лишает иммуногенности модифицированные антигены, потому производные со степенями модификации, большими за 15% не считали целесообразным получать и использовать в дальнейшем. Корпускулярный антиген с разной степенью модификации далее использовали для установления его иммуногенности. Другую часть антигена центрифугировали 40 минут при 3 тыс. об/мин. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость пропускали через колонку из сефадексом G-75. Первую, самую тяжелую фракцию собирали и использовали дальше для установления концентрации белка и степени химической модификации. Полученный антиген представлял собой однородную фракцию (одно полимерное вещество) и имел молекулярную массу 1,5 мДа и заряд -186000. Получали растворимый гликопротеидный антиген с такими степенями модификации : 1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13 %, 15%.

Также из инактивированных корпускул бактерий получали полисахаридный антиген. Суспензию инактивированных бактерий кипятили 40 минут, центрифугировали 30 минут при 10g, надосадочную жидкость с полисахаридами отделяли. Из надосадочной жидкости осаждали полисахариды путем добавления двукратного объема этанола. Осадок полисахаридов отделяли центрифугированием, затем высушивали. Модификацию проводили после растворения полисахаридов в дистиллированной воде в пересчете на полисахариды (количество полисахаридов устанавливали гравиметрически) с такими степенями модификации : 1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13 %, 15%. Количество каждого модификатора добавляли в $\frac{1}{2}$ дозы от рассчитанной в одинаковой пропорции.

Антигены могут быть модифицированы, но не ограничиваясь алкилированием, ацилированием такими модификаторами, как ангидриды карбоновых и поликарбоновых кислот, галогенпроизводные карбоновых и поликарбоновых кислот как отдельно, так и в разной комбинации или смеси.

В качестве адьюванта использовали 0,02-15% гидрозоля гидроксида железа от объема вакцины.

Общеизвестно, что при использовании фильтрации геля распределение белков проходит по размерам белковой глобулы. Гель-фильтрацию проводили на колонках, заполненных гелем сефадекса G-75. Общий объем столбика геля определяли в течение

элюирования крупные молекулы, которые не проникают в гранулы геля, двигаются с большой скоростью совместно с межгранульным растворителем и появляются в виде узкой полосы. Объем элюента, который соответствует появлению этой зоны, определяли как V_0 (свободный объем). Менее крупные молекулы проходили колонку медленно, проникали в гранулы геля, а выход их из колонки был весьма долговременным. В связи с тем, что степень диффузии в гранулы геля зависит от размера молекул, вещества выделяются из колонки в порядке уменьшения их молекулярной массы. Молекулярная масса M опытного протеида устанавливалась путем сравнения объема элюирования V_e с аналогичным параметром белков-маркеров.

10 Для выделения антигена использовали колонку диаметром 25 мм и длиной 1000 мм. Гель сефадекс G-75 и G-25 предварительно готовили таким образом: к буферному раствору (0,1 М ТРИС -НС1 и 0,1 М NaCl, pH=8,0) медленно добавляли гранулы геля, удерживали в термостате 72 часа при $t = 37^\circ\text{C}$. Потом гель деаэрировали (постепенно и осторожно перемешивали в избыточном количестве буферного раствора для удаления газовых
15 пузырей) на шейкере на протяжении часа. На дно колонки клали фильтровальную бумагу. К колонке медленно добавляли немного буферного раствора, потом по стенке переносили небольшое количество (5 г) суспензии набухнувших гранул геля сефадекс G-25. После формирования столбика геля, через колонку пропускали не менее двух объемов рабочего буферного раствора. Затем наносили микропипеткой 100 мкл раствора образца.
20 Постоянную скорость элюирования задавали благодаря установлению над колонкой капельницы с буферным раствором и роликом регулировали скорости элюирования. Элюат собирали в пробирки по 0,5 мл и анализировали на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 280 нм.

25 Антисинежнойная сыворотка для диагностических целей с титром специфических антисинежных антител (1:1000) была получена по стандартной схеме иммунизации кролей путем введения корпускулярного инактивированного антигена в адьюванте Фрейнда, по стандартной схеме на 3; 5 и 7 сутки в дозе 0,2 мл внутримышечно.

Для иммунизации животных в опыт взяты модифицированные образцы как корпускулярного антигена (КА) так и модифицированного растворимого гликопротеидного
30 антигена (ГА), полисахаридного антигена (ПА). Также аналогично корпускулярному антигену готовили антиген-фаголизат: на 3 часа в суспензию $10 \text{ Ig KYO} / \text{мл}$ добавляли 0,1 мл пиобактериофага (Россия, Уфа). Далее инактивацию проводили рибофлавином в стандартных условиях, указанных в п.п. в присутствии катионов двухвалентных металлов. Инактивация антигена. Инактивированный корпускулярно-фаголизатный антиген (КФ)

также модифицировали двумя модификаторами с образованием ковалентно-модифицированного корпускулярно фаголизатного антигена.

Уровень антител устанавливали двумя методами: реакцией гемагглютинации и методом флуоресцирующих антител. По 3 животных из каждой группы оставляли живыми до 15 суток, декапитировали хлороформом и получали сыворотку, где также устанавливали уровень специфических антител вышеприведенными методами. Для реализации указанного готовили тест-систему для реакции прямой гемагглютинации, которую проводили в 96-луночных круглодонных иммунологических планшетах, куда добавляли по 0,02 мл 0,1% суспензии термостатированных эритроцитов барана и по 0,02 мл суспензий термоинактивированных клеток синегнойной палочки в концентрации 10 млрд. клеток /мл. Уровень антител устанавливали последовательными десятикратными (но двукратными) разведениями сывороток крови мышей, которые добавляли в количестве 0,02 мл к лункам планшетов. Наличие агглютинатов свидетельствовало об образовании иммунных комплексов. Как контрольные использовали нормальный человеческий иммуноглобулин (титр антисинегнойных антител составлял от 0 к (1:10) согласно АНД) и сыворотку крови невакцинированных мышей (титр от 0 до 1:10).

Полученный модифицированный антиген может быть сорбирован стандартными методами, известными ординарному специалисту в данной области, на гидрозоль гидроксида железа для дополнительного пролонгирования эффектов вакцины. Гидрозоль получают кипячением 0,1-20% раствора трехвалентного железа хлорида в воде с последующим быстрым охлаждением раствора. Быстрое охлаждение раствора позволяет получать наноразмерные ядра гидрозоля железа гидроксида гидрохлорида в качестве коллоидных частиц. Такие частицы обладают способностью значительно стимулировать клеточный иммунитет через рецепторы -сидерофоры, а также пролонгировать контакт вакцинных антигенов с плазматическими клетками и другими лимфоцитами. В отличие от классического адьюванта гидроксида алюминия, гидрозоль железа гидроксида полностью метаболизируется и безвреден для человеческого организма.

Результаты исследований иммуногенности образцов вакцинных антигенов на примере синегнойной палочки, сорбированной на наночастицах гидрозоля гидроксида железа гидрохлорида приведены в таблице 3.

Таблица 3. Зависимость иммуногенности бинарно ковалентно модифицированных антигенов от степени модификации на примере разных антигенов синегнойной палочки

№ п/п	Антиген	Степень модификации, %	Индукцированный титр нейтрализующих антител (1:X), X*
43.	КА	1	520
44.		3	7000
45.		5	14000
46.		7	7000
47.		9	150
48.		11	75
49.		13	75
50.		15	25
51.	ГА	1	520
52.		3	14000
53.		5	14000
54.		7	14000
55.		9	150
56.		11	75
57.		13	75
58.		15	25
59.	ПА	1	20
60.		3	150
61.		5	150
62.		7	150
63.		9	150
64.		11	75
65.		13	75
66.		15	25
67.	КФ	1	520
68.		3	28000
69.		5	28000
70.		7	14000

71.		9	5000
72.		11	2500
73.		13	1250
74.		15	520

$P < 0.05$; *- отличия от контроля статистически достоверны

Как видно из таблицы 3, наибольшие титры антител индуцированы фаголизатно - корпускулярным ковалентно модифицированным антигеном. При степенях модификации от 3 до 7 титр превышал исходный нативный (1:20 для немодифицированных антигенов кроме полисахаридного, для которого титр составил 1:10). Таким образом, преимуществом нашего изобретения является то, что бивалентная модификация после инактивации фотодинамическим методом позволяет на несколько порядков увеличить иммуногенность антигенов по признаку нейтрализации немодифицированных корпускул.

10 В прототипе удалось повысить иммуногенность антигена только до титра 1:5000.

Определение реактогенности и аллергенности вакцин

Исследования реактогенности и аллергенности раствора каждого из вакцинных антигенов проводили на здоровых морских свинках массой 300-400 г по 3 животных в контрольных и опытных группах. В опытных животных депилировали на боках мех. Для определения реактогенности вводили внутрикожно с одной стороны тела раствор соответствующего антигена в объеме 0,2 мл. Для определения аллергенности опытным животным вводили внутрикожно трехкратно вакцинный антиген в объеме 0,2 мл с интервалом в 14 дней, а через 14 дней после последней инъекции морским свинкам вводили внутрикожно вакцинный антиген в объеме 0,2 мл. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Проводили наблюдение за местом введения вакцинного антигена на наличие возникновения местных реакций в первые 5 мин и через каждые 2 ч в течение 24 часов. Допускается покраснение кожи в месте инъекции на участке не более 5 мм. В результате проведенных исследований установлено, что ни один из модифицированных антигенов со степенями модификации от 3 до 15% не проявлял реактогенности и алергенности. Среди немодифицированных антигенов гликопротеидный растворимый антиген проявил реактогенность, а фаголизатный немодифицированный антиген проявил алергенность после повторных введений.

30 Пример 2 - Получение вакцины на основе вириона вируса Нью -Кастла

Инактивация вируса болезни Нью -Кастла

Берут культуральную жидкость , содержащую 10 Ig ТЦД 50 /мл вируса болезни Нью - Кастла (штамм ИВМ 2С - Киев), полученный известным специалистам в данной области стандартным методом культивации вируса на куриных эмбрионах , добавляют рибофлавин (либо рибофлавина мононуклеотид , рибофлавина динуклеотид , метиленовый синий , толуидиновый синий , диметилметиленовый синий) до конечной концентрации 5-640 нМ , оставляли на 2-40 мин , добавляли 1-1000 мМ/л раствора соли двухвалентного металла (в качестве солей двухвалентных металлов могут быть использованы как отдельно так и в смеси друг с другом водорастворимые соли включительно , но не исключая : магния , кальция , цинка , железа , меди , стронция , кобальта , никеля) как активатора нуклеолиза , обрабатывали электромагнитным излучением в оптической области спектра 180-700 нм в течение 2-50 минут при мощности 10-900 мкВ /мл , а затем вносили в культуру куриных фибробластов для контроля инактивации по степени деградации культуры - цитопатическому действию . В таблице 4 представлены результаты зависимости эффективности инактивации от инактиватора и его дозы при облучении в течение 5 минут светом с длиной волны 320 нм и мощностью 500 мкВ /мл для флавинов и при 560 нм для фенотиозинов и порфиринов . В таблице 4 приведены результаты зависимости эффективности инактивации в зависимости от длины волны электромагнитного излучения при мощности излучателя 500 мкВ /мл, времени обработки 5 минут и концентрации каждого фотоинактиватора 40 мкМ /л с применением белой светодиодной лампы и призмы для выделения нужных длин волн .

Таблица 4. Зависимость эффективности инактивации вируса болезни Нью -Кастла при начальной дозе 10 Ig ТЦД 50/мл

№ п/п	Фотосенсибилизатор	Концентрация нМ/л	Ig ТЦД ₅₀ /мл после обработки
91.	Рибофлавин	1	7
92.		5	1
93.		10	0
94.		20	0
95.		40	0
96.		80	0
97.		160	0
98.		320	0

99.		640	0
100		1280	-*
101	Рибофлавин	1	3
102	мононуклеотид	5	0
103		10	0
104		20	0
105		40	0
106		80	0
107		160	0
108		320	0
109		640	0
110		1280	-*
111	Рибофлавин	1	4
112	динуклеотид	5	1
113		10	0
114		20	0
115		40	0
116		80	0
117		160	0
118		320	0
119		640	0
120		1280	-*
121	Метиленовый синий	1	7
122		5	3
123		10	1
124		20	0
125		40	0
126		80	0
127		160	0
128		320	0
129		640	0
130		1280	2
131	Толуидиновый синий	1	8

132		5	3
133		10	1
134		20	0
135		40	0
136		80	0
137		160	0
138		320	0
139		640	0
140		1280	0
141	Диметиленовый синий	1	3
142		5	1
143		10	0
144		20	0
145		40	0
146		80	0
147		160	0
148		320	0
149		640	0
150		1280	0
151	Хлорофилл альфа	1	5
152	(на ТВИН-80)	5	3
153		10	1
154		20	0
155		40	0
156		80	0
157		160	0
158		320	0
159		640	0
160		1280	-*
161	Гем	1	4
162		5	1
163		10	1
164		20	0

165		40	0
166		80	0
167		160	0
168		320	0
169		640	0
170		1280	-*
171	Цианокобаламин	1	7
172		5	6
173		10	5
174		20	4
175		40	4
176		80	2
177		160	1
178		320	1
179		640	0
180		1280	-*

*- не проверялись в связи с невозможностью достичь целевой концентрации

Как видно из таблицы 4, в области концентраций от 5 до 640 нМ/л большинство фотоинактиваторов проявили достаточную эффективность для инактивации вируса
5 болезни Нью-Кастла.

Далее проводили ковалентную модификацию вирусного антигена двумя-пятью модификаторами в пересчете на белок, как показано в примере 1. Подробное описание модификации приведено далее.

В качестве исходных вирусных вакцинных антигенов также могут быть
10 использованы: вирусные капсидные белки, аглутинины. Перед или после фотоинактивации такой вирусный антиген может быть нарезан на фрагменты с помощью протеаз, включая, но не ограничиваясь трипсином, пепсином, протеиназой -К, химотрипсином, с помощью синтетических протеаз. В качестве солей двухвалентных металлов могут быть использованы как отдельно так и в смеси друг с другом
15 водорастворимые соли включительно, но не исключая: магния, кальция, цинка, железа, меди, стронция, кобальта, никеля. Вместо цельного вириона могут быть использованы: вирусный белок, смесь вирусных белков или предварительно нарезанные протеазами

5 вирусные антигены . В качестве исходных антигенов могут быть использованы вирусы : гриппа , гепатиты , вирусы герпеса , кори , краснухи , ВИЧ /СПИД , вирусных инфекций животных : болезни Нью -Касла , инфекционной бурсальной болезни птицы , классической чумы свиней , африканской чумы свиней и любых других заболеваний , терапии рассеянного склероза (Табл . 5).

Таблица 5. Перспективные продукты и болезни , от которых они способны защищать :

№ п/п	Область применения	Патология, при которой вакцинация будет значительно более эффективна	Новые потребительские качества
1.	Ветеринария	Африканская чума свиней	Увеличение до 99% степени защищенности поголовья от одного- двух вакцинаций, уменьшение падежа животных в процессе вакцинации (живые аттенуированные штаммы вирусов из вакцин все-же убивают до 10% поголовья). Уменьшение эффекта падения планового привеса животных при вакцинации (при размножении вакцинных штаммов животное болеет и отказывается от пищи. Это весьма актуально при выращивании бройлеров). Реальная защита от особо опасных инфекций (Африканки, Ауески, птичьего гриппа, чумки
2.		Болезнь Ауэски	
3.		Болезнь Нью-Касла	
4.		Геммораргическая лихорадка кролей	
5.		Чумка собак/кошек	
6.		Энцефалит лошадей	
7.		Инфекционный ларинготрахеит птицы	
8.		Бешенство	
9.		Пастереллез	
10.		РС - вирус	
11.		Парагрипп 3 типа	
12.		Инфекционная бурсальная болезнь	
13.		Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота	
14.		Ящур	
15.		Аденовирусы	
16.		Вирус энтерита собак	
17.		Коронавирус	
18.		Болезнь Ауески	

19.		Орнитоз	собак и кошек), где
20.		Сальмонеллез	эффективность вакцинации
21.		Узелковый дерматит крупного рогатого скота	близка к 40%, а у остальных животных болезнь протекает слабее и малая часть из них выживает, тогда как невакцинированные животные погибают почти все).
22.		Оспа овец и коз	
23.		Птичий грипп	
24.		Сибирская язва	
25.	Медицина	Вирусы герпеса 1-2 типов	Увеличение эффективности как лечения так и профилактики герпеса
26.		Герпес Зостер	Предотвращение тяжелых осложнений, связанных с применением живой вакцины.
27.		Вирус Эпштейна-Барр	Нет вакцин, может оказаться эффективной как в профилактике мононуклеозов, так и в лечении осложнений этой вирусной инфекции (атеросклероз и рак)
28.		Цитомегаловирус	Нет вакцин, может оказаться эффективной как в профилактике так и в осложнениях этой вирусной инфекции (атеросклероз и рак)
29.		Вирус герпеса 6 типа	Нет вакцин, предлагается впервые
30.		Корь	

31.		Краснуха	Предлагается безопасная и эффективная замена живой высокоректогенной вакцине
32.		Полиомиелит	

В связи с частичной модификацией структуры антигена в процессе реакции модификации образуется огромное количество разнообразных производных вакцинного антигена с разной иммуногенностью и структурой, и соответственно иммунная система индуцирует синтез большего количества моноклонов в ответ на эти новые антигенные детерминанты. Кроме того, такое разнообразие новых эпитопов (сотни тысяч или даже миллионы) позволяет предиктивно защищать организм от еще несуществующих будущих штаммов гриппа и мутантных вирусов ВИЧ /СПИД.

10 Таблица 6. Зависимость эффективности инактивации вируса болезни Нью -Кастла в зависимости от длины волны электромагнитного излучения при начальной дозе $10 \text{ Ig KUO} / \text{мл}$

№ п/п	Фотосенсибилизатор	Длина волны, нм	Ig ТЦД ₅₀ /мл после обработки
75.	рибофлавин	180	0
76.		220	1
77.		260	1
78.		320	0
79.		360	0
80.		400	0
81.		440	0
82.		480	0
83.		520	9
84.		560	9
85.		600	9
86.		640	9
87.		680	7
88.		720	6
89.	Метиленовый синий	180	10

90.		220	10
91.		260	9
92.		320	9
93.		360	9
94.		400	9
95.		440	8
96.		480	7
97.		520	4
98.		560	3
99.		600	2
100		640	0
101		680	0
102		720	0
103	Хлорофилл альфа	180	8
104	(на ТВИН-80)	220	9
105		260	10
106		320	10
107		360	10
108		400	9
109		440	9
110		480	6
111		520	7
112		560	0
113		600	0
114		640	4
115		680	5
116		720	9

Как видно из таблицы 6, наибольшая эффективность инактивации для производных флавинов (рибофлавин) наблюдается в ультрафиолетовой области спектра (180-390 нм), для фенотиозинов и порфиринов - в красной области видимого спектра (500-700 нм)

Двойная ковалентная модификация вирусного антигена для увеличения иммуногенности вакцины

По количеству вирионов вирусная суспензия отвечала $10 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{мл}$; затем 0,1 мл суспензии разводили в 100 раз 0,9% раствором натрия хлорида и устанавливали концентрацию поверхностных белков с помощью Биуретового метода и в реакции комплексообразования с бромфеноловым синим методом Флореса .

В пересчете на белок проводили реакцию двойной ковалентной модификации путем добавления к суспензии инактивированных вирионов измельченных до порошка янтарного и малеинового ангидридов в количестве от 0,1 до 10 % от установленного количества белка .
10 Вместо янтарного и малеинового ангидридов могут быть использованы другие комбинации модификаторов включая , но не исключая : ангидриды карбоновых и поликарбоновых кислот , галогенангидриды карбоновых и поликарбоновых кислот .

В результате реакции модификации получили 8 образцов с разными степенями ацилирования : 1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13 %, 15%. Превышение 15% полностью лишает иммуногенности модифицированные антигены , потому производные со степенями модификации , большими за 15% не считали целесообразным получать и использовать в дальнейшем . Вирусный антиген (вирион) с разной степенью модификации дальше использовали для установления его иммуногенности . Также получали растворимый пептидный вирусный антиген путем трипсинизации вириона и выделения белковой фракции с молекулярной массой около 18кДа (поверхностные рецепторные белки вириона Нью -Касла) с помощью гель -фильтрации и далее получали производные с такими степенями модификации : 1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13 %, 15%.

Антигены вирусов могут быть модифицированы , но не ограничиваясь алкилированием , ацилированием такими модификаторами , как ангидриды карбоновых и поликарбоновых кислот , галогенпроизводные карбоновых и поликарбоновых кислот как отдельно , так и в разной комбинации или смеси .

Для иммунизации животных в опыт взяты инактивированные и модифицированные образцы : вирионного антигена (ВА) и поверхностного вирионного антигена (ПА) .

Уровень антител устанавливали двумя методами : реакцией гемагглютинации и методом флуоресцирующих антител . По 3 животных из каждой группы оставляли живыми до 15 суток , декапитировали хлороформом и получали сыворотку , где также устанавливали уровень специфических антител вышеприведенными методами . Для реализации указанного готовили тест -систему для реакции прямой гемагглютинации , которую проводили в 96-луночных круглодонных иммунологических планшетах , куда добавляли по

0,02 мл 0,1% суспензии термостатированных эритроцитов барана и по 0,02 мл суспензии термоинактивированных вирионов болезни Нью-касла в концентрации $10 \lg \text{ТЦД}_{50} / \text{мл}$. Уровень антител устанавливали последовательными десятикратными (но двукратными) разведениями сывороток крови мышей, которые добавляли в количестве 0,02 мл к лункам планшето5. Наличие агглютинатов свидетельствовало об образовании иммунных комплексов. Как контрольные использовали нормальный человеческий иммуноглобулин (титр антивирусных антител составлял от 0 к (1:10) согласно АНД) и сыворотку крови невакцинированных мышей (титр от 0 до 1:10).

Результаты исследований образцов вакцинных антигенов на примере вирионов вируса болезни Нью-Касла приведены в таблице 7.10

Таблица 7. Зависимость иммуногенности бинарно ковалентно модифицированных антигенов вируса болезни Нью-Касла от степени модификации на примере цельных вирионов и отдельного поверхностного белка

№ п/п	Антиген	Степень модификации, %	Индукцированный титр нейтрализующих антител (1:X), X*
1.	ВА	0	10
2.		1	100
3.		3	5000
4.		5	10000
5.		7	5000
6.		9	2500
7.		11	75
8.		13	75
9.		15	25
10.	ПА	0	10
11.		1	50
12.		3	100
13.		5	10000
14.		7	100
15.		9	50
16.		11	25
17.		13	25

18.		15	-
-----	--	----	---

$P < 0,05$; *- отличия от контроля статистически достоверны

Как видно из таблицы 7, наибольшие титры антител индуцированы вирионным ковалентно модифицированным антигеном. При степенях модификации от 3 до 7 титр превышал исходный нативный (1:10) для немодифицированных антигенов. Степень защиты отдельным поверхностным антигеном вириона был ниже, чем для цельного вириона, но на 2 порядка превышал защитный уровень (1:10 для немодифицированных вирусных антигенов). Таким образом, бивалентная модификация после инактивации фотодинамическим методом позволяет на несколько порядков увеличить иммуногенность антигенов по признаку нейтрализации немодифицированных корпускул. В прототипе удалось повысить иммуногенность антигена только до титра 1:5000. Полученный модифицированный антиген может быть сорбирован стандартными методами, известными ординарному специалисту в данной области, на гидрозоле гидроксида железа для дополнительного пролонгирования эффектов вакцины.

15

Определение реактогенности и аллергенности вакцин на основе антигенов вируса болезни Нью-касла

Исследования по реактогенности и аллергенности раствора каждого из вакцинных антигенов проводили на здоровых морских свинках массой 300-400 г по 3 животных в контрольных и опытных группах. В опытных животных депилировали на боках мех. Для определения реактогенности вводили внутрикожно с одной стороны тела раствор соответствующего антигена в объеме 0,2 мл. Для определения аллергенности опытным животным вводили внутрикожно трехкратно вакцинный антиген в объеме 0,2 мл с интервалом в 14 дней, а через 14 дней после последней инъекции морским свинкам вводили внутрикожно вакцинный антиген в объеме 0,2 мл. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Проводили наблюдение за местом введения вакцинного антигена на наличие возникновения местных реакций в первые 5 мин и через каждые 2 ч в течение 24 часов. Допускается покраснение кожи в месте инъекции на участке не более 5 мм. В результате проведенных исследований установлено, что ни один из фотоинактивированных бивалентно модифицированных вирусных антигенов со степенями модификации от 3 до 15% не проявлял реактогенности и алергенности. Среди немодифицированных антигенов вируса аналогичные антигены также не проявили аллергенности после повторных введений.

Основные преимущества предлагаемых нами вакцин :

1. Увеличение иммуногенности на 3 порядка в сравнении с существующими вакцинами
2. Расширение спектра действия на низкоиммуногенные или не иммуногенные антигены
5 (герпесвирусы , вирусы человеческого энцефалита , РС - вирус , ротавирусы , коронавирусы , парамиксовирусы , микобактерии туберкулеза , вирус Африканской чумы свиней , болезни Ауэски , классической чумы свиней)
3. Уменьшение на 2-3 порядка алергенности и реактогенности вакцин за счет уменьшения эффективной вакцинирующей дозы антигена в вакцине при той же эффективности и
10 иммуногенности .
4. Удешевление технологии производства вакцин за счет сокращения ряда стадий производства , связанного с необходимостью очистки вакцины от остатков формалина и от необходимости добавления специальных адъювантов (веществ , повышающих общую иммуногенность вакцин типа алюминия гидроксида).
- 15 5. Расширение эффективности вакцинации на проспективные (еще не существующие) антигены гриппа и других вирусных инфекций с высоко изменчивым геномом и антигенностью за счет увеличения количества доступных эпитопов антигенов . Это позволит защищать не только от одного штамма гриппа , но и от еще не существующих вариантов вируса .
- 20 6. Возможность получения ультраполивалентных вакцин , содержащих 20 и более разных антигенов в смеси при той же эффективности , что и отдельная вакцина
7. Возможность замены ВСЕХ вакцин на основе живых аттенуированных микроорганизмов и вирусов на инактивированные и низкоректогенные при той же эффективности и
25 иммуногенности

Список литературы

1. Robbins, J. B., R. Schneerson, and S. C. Szu. 1995. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious disease by inactivating the inoculum. *J. Infect. Dis.* 171:1378-1398.
- 30 2. Del Val, M., H. J. Schlicht, H. Volkmer, M. Messerle, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski. 1991. Protection against lethal cytomegalovirus infection by a recombinant vaccine containing a single nonameric T-cell epitope. *J. Virol.* 65:3641-3646

3. Larsen, D. L., A. Karasin, and C. W. Olsen. 2001. Immunization of pigs against influenza virus infection by DNA vaccine priming followed by killed-virus vaccine boosting. *Vaccine* 19:2842-2853
4. Cicin-Sain, L., Brune, W., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U. H. (2003). Vaccination of
5 Mice with Bacteria Carrying a Cloned Herpesvirus Genome Reconstituted In Vivo. *J. Virol.* 77: 8249-8255
5. Levin SA, Dushoff J, Plotkin JB. Evolution and persistence of influenza A and other diseases. *Math Biosci.* 2004 Mar-Apr; 188: 17-28.
6. Terregino C, Toffan A, Beato MS, De Nardi R, Drago A, Capua I. Conventional H5N9
10 vaccine suppresses shedding in specific-pathogen-free birds challenged with HPAI H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004. *Avian Dis.* 2007 Mar; 51(1 Suppl):495-7.
7. Medvedeva MN, Petrov NA, Vasilenko SK, Simanovskaia VK, Golubev DB. The characteristics of the hemagglutinin from persistent variants of the influenza virus A/Victoria/35/72 (H3N2). *Vopr Virusol.* 1990 Sep-Oct; 35(5):374-6.
- 15 8. Aronsson F, Robertson B, Ljunggren HG, Kristensson K. Invasion and persistence of the neuroadapted influenza virus A/WSN/33 in the mouse olfactory system. *Viral Immunol.* 2003; 16(3):415-23.
9. Cox MM. Vaccines in development against avian influenza. *Minerva Med.* 2007 Apr; 98(2): 145-53.
- 20 10. Gronvall GK, Borio LL. Removing barriers to global pandemic influenza vaccination. *Biosecur Bioterror.* 2006; 4(2):168-75.
11. Martynov A.V., Babych E.M., Smelyanskaya M.V. Increase of vaccines adjuvanticity by succinylation of vaccine antigen// *Rejuvenation Research.*- Aug 2005, Vol. 8, No. 1: P.14-17 (Poster of Confremce)
- 25 12. Taubenberger JK, Morens DM, Fauci AS. The next influenza pandemic: can it be predicted? *JAMA.* 2007 May 9; 297(18):2025-7.
13. Vardavas R, Breban R, Blower S. Can influenza epidemics be prevented by voluntary vaccination? *PLoS Comput Biol.* 2007 May 4; 3(5):e85.
14. Mintz PD (2011) Cesium cessation? An advantage of pathogen reduction treatments.
30 *Transfusion* 51(7): 1369-1376.
15. Castrillo SM, Schneider V, Gathof BS (2009) Functional characteristics of apheresis-derived platelets treated with ultraviolet light combined with either amotosalen-HCl (S-59) or riboflavin (vitamin B2) for pathogen-reduction. *Vox Sang* 97(1): 26-33.

16. Reikvam H, Marschner S, Apelseh TO, Goodrich R, Hervig T (2010) The Mirasol Pathogen Reduction Technology system and quality of platelets stored in platelet additive solution. *Blood Transfus* 8(3): 186-192.
17. Webert KE, Cserti CM, Hannom J, Lin Y, Pavenski K, et al. (2008) Proceedings of a consensus conference: pathogen inactivation making decision about new technologies. *Transfus Med Rev* 22(1): 1-34.
18. Marschner S, Fast LD, Baldwin WM, Slichter SJ, Goodrich RP (2010) White blood cell inactivation after treatment with riboflavin and ultraviolet light. *Transfusion* 50(1 1): 2489-2498.
19. Solheim BG (2008) Pathogen reduction of blood components. *Transfus Apher Sci* 39(1): 75-82.
20. Mandels, G. (1950). The photoinactivation of enzymes by riboflavin. *Plant Physiology*, 25(4), 763-766.
21. Eubanks, L. M., Dickerson, T. J., & Janda, K. D. (2005). Vitamin B2-mediated cellular photoinhibition of botulinum neurotoxin A. *FEBS Letters*, 579(24), 5361-5364.
- 15 **<http://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.072>**
22. US Application US20120195925A1

Формула изобретения

1. Вакцины с повышенной иммуногенностью, низкой аллергенностью и реактогенностью, содержащие антиген /токсин и адъювант, отличающиеся тем, что содержат вакцинный антиген /токсин, инактивированный электромагнитным излучением в ультрафиолетовой и видимой областях спектра в присутствии раствора фотосенсибилизатора и солей двухвалентных металлов, а затем ковалентно модифицированный по доступным для модификации остаткам аминокислотных групп и спиртовым гидроксилам антигена /токсина одновременно как минимум двумя модифицирующими агентами в пересчете 0,01-10,0% на массовую концентрацию белка антигена /токсина, а в качестве адъюванта содержит гидрозоль железа гидроксида.
2. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что фотосенсибилизатор — это производные флавинов включая, но не исключая: рибофлавин, рибофлавин мононуклеотид, рибофлавин динуклеотид.
3. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что в фотосенсибилизатор это производные фенотиазинов включая, но не исключая: метиленовый синий, толуидиновый синий, диметилметиленовый синий.
4. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что фотосенсибилизатор это производные порфиринов включая, но не исключая: хлорофиллы, гемпорфирины, коболамины.
5. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что фотосенсибилизатор это смесь производных по п.2-4
6. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин это корпускулы живого микроорганизма.
7. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин это фаголизат микроорганизма.
8. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это вирионы.
9. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это микробный экзотоксин.
10. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это микробный эндотоксин.
11. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это смесь ацеллюлярных микробных антигенов.

12. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это микробный гликопротеид .
13. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это смесь микробных гликопротеидов .
- 5 14. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это микробный пептид .
15. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это смесь микробных пептидов .
16. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это микробный полисахарид .
- 10 17. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это смесь микробных полисахаридов .
18. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин это микробный липополисахарид .
- 15 19. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это смесь микробных липополисахаридов .
20. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это целый вирион .
21. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это вирусный белок .
- 20 22. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это смесь вирусных белков .
23. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это смесь антигена /токсина , предварительно нарезанного на фрагменты с помощью протеаз , включая , но не ограничиваясь , трипсином , пепсином , протеиназой -К , химотрипсином .
- 25 24. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что вакцинный антиген /токсин — это смесь антигена /токсина , предварительно нарезанного на фрагменты с помощью синтетических протеаз .
- 30 25. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что соли двухвалентных металлов — это отдельно , так и в смеси друг с другом водорастворимые соли включительно , но не исключая , магния , кальция , цинка , железа , меди , стронция , кобальта , никеля .

26. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что ковалентная модификация остатков лизинов и гистидинов белкового компонента антигена /токсина это ацилирование включая , но не ограничиваясь ангидридами карбоновых и поликарбоновых кислот .
- 5 27. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что ковалентная модификация остатков лизинов и гистидинов белкового компонента антигена /токсина это алкилирование включая , но не ограничиваясь галогенпроизводными карбоновых и поликарбоновых кислот .
- 10 28. Вакцины по п.1 отличающиеся тем, что ковалентная модификация остатков лизинов и гистидинов белкового компонента антигена /токсина это одновременно ацилирование и алкилирование включая , но не ограничиваясь ангидридами карбоновых и поликарбоновых кислот и галогенпроизводными карбоновых и поликарбоновых кислот соответственно .

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2018/000291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 39/00 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K39/00, C07K14/005		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CIPO, DWPI, EAPATIS, ESPACENET, Google, KIPRIS, PabMED, RUPTO, SCIENCEDIRECT, SIPO,USPTO,WIPO, VINITI (VINITI)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EA 025417 B1 (FARBER B.S. et al.) 30.12.2016, formula1-18, 31-34, abstract	1-28
Y	US 8759092 B2 (TERUMO VST BIOTECHNOLOGIES, LLC.) 24.06.2014, p.1-5, 15.	1-28
Y	RU 2557968 C2 (SOSETE DEKSPLUTASON DE PRODIUI PUR LE ENDIUSTRI SHIMIK SEPPIK) 27.07.2015, p.3.	1-28
Y	US 3128229 A (BAYLOR MEDICAL FOUNDATION) 07.04.1964, column 2	1-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 December 2018 (05.12.2018)		Date of mailing of the international search report 13 December 2018 (13.12.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2018/000291

<p>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ <i>A61K 39/00 (2006.01)</i> <i>C07K 14/005 (2006.01)</i></p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>																	
<p>В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">A61K39/00, C07K14/005</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p style="text-align: center;">CIPO, DWPI, EAPATIS, ESPACENET, Google, KIPRIS, PubMED, RUPTO, SCIENCEDIRECT, SIPO, USPTO, WIPO, ВИНТИ (VINITI)</p>																	
<p>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>EA 025417 B1 (ФАРБЕР Б.С. и др.) 30.12.2016, формула 1-18, 31-34, реферат</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 8759092 B2 (TERUMO VST BIOTECHNOLOGIES, LLC.) 24.06.2014, с.1-5, 15.</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>RU 2557968 C2 (СОСЬЕТЕ ДЭКСПЛУТАСЬОН ДЕ ПРОДЮИ ПУР ЛЕ ЭНДЮСТРИ ШИМИК СЕППИК) 27.07.2015, с.3.</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 3128229 A (BAYLOR MEDICAL FOUNDATION) 07.04.1964, колонка 2</td> <td>1-28</td> </tr> </tbody> </table>			Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	Y	EA 025417 B1 (ФАРБЕР Б.С. и др.) 30.12.2016, формула 1-18, 31-34, реферат	1-28	Y	US 8759092 B2 (TERUMO VST BIOTECHNOLOGIES, LLC.) 24.06.2014, с.1-5, 15.	1-28	Y	RU 2557968 C2 (СОСЬЕТЕ ДЭКСПЛУТАСЬОН ДЕ ПРОДЮИ ПУР ЛЕ ЭНДЮСТРИ ШИМИК СЕППИК) 27.07.2015, с.3.	1-28	Y	US 3128229 A (BAYLOR MEDICAL FOUNDATION) 07.04.1964, колонка 2	1-28
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №															
Y	EA 025417 B1 (ФАРБЕР Б.С. и др.) 30.12.2016, формула 1-18, 31-34, реферат	1-28															
Y	US 8759092 B2 (TERUMO VST BIOTECHNOLOGIES, LLC.) 24.06.2014, с.1-5, 15.	1-28															
Y	RU 2557968 C2 (СОСЬЕТЕ ДЭКСПЛУТАСЬОН ДЕ ПРОДЮИ ПУР ЛЕ ЭНДЮСТРИ ШИМИК СЕППИК) 27.07.2015, с.3.	1-28															
Y	US 3128229 A (BAYLOR MEDICAL FOUNDATION) 07.04.1964, колонка 2	1-28															
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>																	
<table border="0"> <tr> <td>* Особые категории ссылочных документов:</td> <td>“Г” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</td> </tr> <tr> <td>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</td> <td>“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</td> </tr> <tr> <td>“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</td> <td>“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</td> </tr> <tr> <td>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</td> <td>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</td> </tr> <tr> <td>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</td> <td></td> </tr> </table>			* Особые категории ссылочных документов:	“Г” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение	“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности	“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста	“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“&” документ, являющийся патентом-аналогом	“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.		“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета				
* Особые категории ссылочных документов:	“Г” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение																
“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности																
“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста																
“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“&” документ, являющийся патентом-аналогом																
“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.																	
“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета																	
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: center;">05 декабря 2018 (05.12.2018)</p>		<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: center;">13 декабря 2018 (13.12.2018)</p>															
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>		<p>Уполномоченное лицо: <p style="text-align: center;">Колонтаевская О.Л.</p> Телефон № 8-499-240-25-91</p>															