

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042200**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.01.24**

(21) Номер заявки  
**202090042**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.07.05**

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

---

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАБОЧЕГО ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА ВИРУСА ГРИППА, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ ОТ ГРИППА С ПРИМЕНЕНИЕМ УКАЗАННОГО ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА И СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОСТИ РАБОЧЕГО ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА ВИРУСА ГРИППА**

---

(31) **10-2017-0085472**

(32) **2017.07.05**

(33) **KR**

(43) **2020.04.22**

(86) **PCT/KR2018/007630**

(87) **WO 2019/009640 2019.01.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**СК БИОСАЙЕНС КО., ЛТД. (KR)**

(56) **KR-A-1020090057015**

**US-A1-20120088228**

**KR-A-1020150056519**

**MILIAN, Ernest et al.: "Accelerated Mass Production of Influenza Virus Seed Stocks in HEK-293 Suspension Cell Cultures by Reverse Genetics", Vaccine, 08 Maye, 2017, vol. 35, no. 26, pages 3423-3430, See the entire document.**

**KR-A-1020100045436**

(72) Изобретатель:  
**Ким Юн Хе, Парк Йон Вук, Хам Дун  
Су, Чжун Хван Юй, Ким Хун (KR)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к способу получения рабочего посевного материала вируса гриппа, к способу повышения инфекционности рабочего посевного материала вируса гриппа и к способу получения вакцины от гриппа с применением указанного посевного материала. Предложенный способ получения рабочего посевного материала вируса гриппа включает инфицирование клеточной линии, адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, вакцинным вирусом гриппа, культивирование инфицированной клеточной линии и далее пассирование вирусной культуры в той же клеточной линии, причем из культур с различными коэффициентами разбавления, использованных для инфицирования вирусом, отбирают и используют для следующего пассажа культуру с коэффициентом разбавления, при котором достигается самая высокая жизнеспособность клеток, при этом в случае, если титры в анализе гемагглютинации (ГА) (за исключением 0) культуры с более низкой жизнеспособностью клеток выше в 4 раза или более, чем титр ГА культуры с коэффициентом разбавления, при котором достигается самая высокая жизнеспособность клеток, то отбирают культуру, имеющую коэффициент разбавления, для которого получают самый высокий титр ГА, и используют для следующего пассажа. Способ согласно изобретению позволяет получить рабочий посевной материал вируса гриппа, имеющий повышенную инфекционность.

---

**B1**

**042200**

**042200**

**B1**

### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к способу получения рабочего посевного материала вируса гриппа, к способу повышения инфекционности рабочего посевного материала вируса гриппа, к способу получения вакцины от гриппа с применением посевного материала, полученного указанным способом получения, к вакцине от гриппа, полученной указанным способом получения, и к рабочему посевному материалу вируса гриппа с повышенной инфекционностью, полученному указанным способом получения.

### **Уровень техники**

Вирусы гриппа представляют собой РНК-вирусы, которые принадлежат к семейству Orthomyxoviridae и имеют заключенные в оболочку вирионы диаметром от 80 до 120 нм. Существует три типа вирусов гриппа, которые обозначают А, В и С. Вирусы гриппа А способны инфицировать свиней, лошадей, человека, птиц и других животных, а вирусы гриппа В и С способны инфицировать только человека. Вирусы гриппа А подразделяются на комбинации из 18 различных подтипов гемагглютинина (НА) и 11 различных подтипов нейраминидазы (НА). Подтипы вирусов гриппа В и С на данный момент не известны.

Вирусы гриппа, как и остальные РНК-вирусы, мутируют быстрее и чаще, чем ДНК-вирусы. Соответственно, вакцины от гриппа для инокуляции, в отличие от других вакцин, разрабатывают заново каждый год с использованием вакцинных штаммов, рекомендованных ВОЗ. Такие сезонные вирусы гриппа обычно разделяют на А/Н1N1, А/Н3N2, В/Ямагата и В/Виктория в зависимости от типа сыворотки. Помимо этого, если в результате мутации изменяются антигенные свойства, то возникает новый вирус гриппа, который заражает людей без иммунитета, в результате чего возникает глобальная пандемия. Этот инфекционный вирус гриппа называют пандемическим вирусом гриппа. ВОЗ рассматривает подтипы Н5 и Н7 в качестве потенциальных пандемических вирусов.

ВОЗ информирует и распределяет вакцинные штаммы сезонных и потенциально пандемических вирусов гриппа, благодаря чему производители вакцин могут получать вакцины от гриппа с применением вакцинных штаммов. Существует ряд методик получения таких вакцинных штаммов, такие как использование штаммов дикого типа, рекомбинация и обратная генетика. Используя полученные вакцинные штаммы, производители вакцин получают рабочие посевные материалы вируса гриппа. Таким образом, существует необходимость в разработке способа получения рабочего посевного материала вируса гриппа с высокой инфекционностью в количестве, достаточном для применения в нескольких различных партиях.

Если необходимо получить рабочий посевной материал вируса гриппа с применением клеточной культуры, то клетки, как правило, инфицируют вирусом в определенном диапазоне кратности инфицирования (МОІ). МОІ представляет собой отношение патогенного вируса к инфицированным клеткам и определяется в анализе бляшкообразования для измерения инфекционности вируса гриппа. Проведение анализа бляшкообразования обычно занимает от 3 до 7 дней. В анализе гемагглютинации (далее называемом просто "анализом ГА") отбирают вирус, имеющий высокий титр ГА. В анализе бляшкообразования после сравнения титров бляшкообразующих единиц (БОЕ) отбирают вирус, имеющий максимальный показатель БОЕ.

### **Описание**

#### **Техническая задача**

Одной из задач настоящего изобретения является обеспечение способа получения рабочего посевного материала вируса гриппа, который имеет повышенную инфекционность по сравнению с исходным вирусом, и способа эффективного получения вакцины от гриппа с применением посевного материала, полученного указанным способом получения, за короткий период времени.

Другой задачей настоящего изобретения является снижение продолжительности и стоимости получения вакцины от гриппа и обеспечение при этом повышенной эффективности получения.

#### **Техническое решение**

Один из аспектов настоящего изобретения относится к способу получения рабочего посевного материала вируса гриппа, включающему инфицирование клеточной линии, адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, вакцинным вирусом гриппа, культивирование инфицированной клеточной линии и дальнейшее пассирование вирусной культуры в той же клеточной линии, причем из культур с различными коэффициентами разбавления, используемых для инфицирования вирусом в пассаже, отбирают культуру с коэффициентом разбавления, при котором достигается самая высокая жизнеспособность клеток, при условии, что если титры в анализе гемагглютинации (ГА) (за исключением 0) двух или более культур различаются в 4 раза или более, то отбирают культуру, имеющую коэффициент разбавления, для которого получают самый высокий титр ГА, и используют для следующего пассажа.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу повышения инфекционности рабочего посевного материала вируса гриппа, включающему инфицирование клеточной линии, адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, вакцинным вирусом гриппа, культивирование инфицированной клеточной линии и дальнейшее пассирование вирусной культуры в той же клеточной линии с получением рабочего посевного материала вируса гриппа, причем из культур с различными ко-

эффицентами разбавления, используемых для инфицирования вирусом в пассаже, отбирают культуру с коэффициентом разбавления, при котором достигается самая высокая жизнеспособность клеток, при условии, что если титры в анализе гемагглютинации (ГА) (за исключением 0) двух или более культур различаются в 4 раза или более, то отбирают культуру, имеющую коэффициент разбавления, для которого получают самый высокий титр ГА, и используют для следующего пассажа.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способу получения вакцины от гриппа, включающему получение рабочего посевного материала вируса гриппа, полученного согласно соответствующему аспекту, или рабочего посевного материала вируса гриппа с повышенной инфекционностью согласно соответствующему аспекту и ослабление (аттенюацию) или инактивацию вирусного посевного материала.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к рабочему посевному материалу вируса гриппа с повышенной инфекционностью, полученному соответствующим способом, или к вакцине от гриппа, полученной соответствующим способом.

#### **Полезные эффекты**

Способ согласно одному из аспектов настоящего изобретения может эффективно обеспечивать рабочий посевной материал вируса гриппа за короткое время и при этом не требует проведения анализа бляшкообразования для измерения инфекционности вируса гриппа.

Способ согласно одному из аспектов настоящего изобретения может обеспечивать рабочий посевной материал вируса гриппа с повышенной по сравнению с исходным вирусом гриппа инфекционностью, это позволяет получать большие количества вакцины от гриппа с низкими затратами за короткий период времени, что является предпочтительным с экономической точки зрения.

#### **Реализация изобретения**

Один из аспектов настоящего изобретения относится к способу получения рабочего посевного материала вируса гриппа, включающему инфицирование клеточной линии, адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, вакцинным вирусом гриппа, культивирование инфицированной клеточной линии и дальнейшее пассирование вирусной культуры в той же клеточной линии, причем из культур с различными коэффициентами разбавления, используемых для инфицирования вирусом, отбирают культуру с коэффициентом разбавления, при котором достигается самая высокая жизнеспособность клеток, при условии, что если титры в анализе гемагглютинации (ГА) (за исключением 0) для двух или более культур различаются в 4 раза или более, то отбирают культуру, имеющую коэффициент разбавления, для которого получают самый высокий титр ГА, и используют для следующего пассажа.

В настоящем документе выражение "клеточная линия, адаптированная к бессывороточной культуре и суспензионной культуре" относится к клеточной линии, адаптированной к среде, по существу не содержащей сыворотку, и суспензионной культуре, в условиях, в которых носитель по существу отсутствует. "По существу не содержащий сыворотку" означает, что содержание сыворотки составляет 0,5% (об./об.) или менее, в частности, 0,2% (об./об.) или менее, более конкретно 0,01% (об./об.) или менее, или что сыворотка отсутствует. "Отсутствие по существу носителя" означает, что содержание носителя составляет 0,5% (об./об.) или менее, в частности 0,2% (об./об.) или менее, более конкретно 0,01% (об./об.) или менее, или что носитель отсутствует. "Адаптированная" клеточная линия относится к клеточной линии, способной к пролиферации в бессывороточной культуре и суспензионной культуре.

Клеточная линия, адаптированная к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, может представлять собой, например, клеточную линию MDCK, в частности, MDCK B-702, MDCK KCLRF-BP-00297, MDCK Sky1023 (DSM ACC3112), MDCK Sky10234 (DSM ACC3114) или MDCK Sky3851 (DSM ACC3113), более конкретно MDCK Sky1023 (DSM ACC3112), MDCK Sky10234 (DSM ACC3114) или MDCK Sky3851 (DSM ACC3113). Пассирование вируса в клеточной линии приводит к повышению его инфекционности по сравнению с исходным вирусом.

Вирус гриппа может представлять собой вирус человеческого или птичьего гриппа. Вирус человеческого гриппа может представлять собой вирус А, В или С. На внешней оболочке вирусов гриппа содержатся по меньшей мере два различных поверхностных гликопротеинов-антигенов, тример гемагглютинина (НА), состоящий из трех отдельных мономеров НА, и нейраминидаза (NA), которая существует в виде тетрамера. Как НА, так и NA, вызывают выработку специфических антител вследствие высокой иммуногенности при инфицировании восприимчивых клеток. Существует множество подтипов вируса гриппа А, которые отличаются природой гликопротеинов НА и NA. Идентифицировано 18 НА (от Н1 до Н18) и 11NA (от N1 до N11). Например, подтипы вируса гриппа А могут представлять собой H5N1, H9N1, H7N7, H2N2, H7N1, H1N1, H1N2, H3N2, H3N8, H4N8, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H6N5, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H8N4, H9N2, H10N7, H1 1N7, H1 1N6, H12N5, H13N6 и H14N5.

Вирус гриппа В имеет явные отличия от вируса гриппа А и инфицирует человека, в частности, детей.

В одном из вариантов реализации вирус гриппа может представлять собой вирус, который по данным ВОЗ является сезонным и потенциально пандемическим и который распределяется Всемирной организацией здравоохранения.

Исходно полученный вирус гриппа может быть разбавлен с различными коэффициентами разбавления, и каждый из разбавленных образцов пассируют два или более раз в клеточной линии, адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре. Для первого пассажа вирус гриппа разбавляют с различными коэффициентами разбавления, например от 1/1 до 1/10000 или от 1/1 до 1/1000, в частности 1/10, 1/100 и 1/1000, и инфицируют клеточную линию, адаптированную к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, предварительно определенным количеством разбавленного препарата. Затем культивируют инфицированную клеточную культуру при перемешивании со скоростью от 10 об./мин до 150 об./мин при температуре от 32 до 38°C в течение 4 дней или менее, в частности от 1 дня до 3 дней. Необязательно, в среду можно добавлять трипсин в концентрации от 1 до 10 мкг/мл. Инфицированную клеточную линию необязательно можно выращивать в присутствии от примерно 1 до примерно 10% CO<sub>2</sub>. Инфицированная клеточная линия может присутствовать в концентрации от примерно 1,0×10<sup>4</sup> клеток/мл до примерно 1,0×10<sup>8</sup> клеток/мл, в частности, от примерно 1,0×10<sup>5</sup> клеток/мл до примерно 1,0×10<sup>7</sup> клеток/мл.

Для определения подходящего момента времени для сбора вируса гриппа измеряют жизнеспособность клеток и титры ГА разбавленных препаратов с различными коэффициентами разбавления через 1 день после инфицирования (1DPI) и 2 дня после инфицирования (2DPI). Момент времени для сбора исследуемого вируса гриппа может быть определен с учетом измеренных значений жизнеспособности клеток и титра ГА. В частности, из культур с различными коэффициентами разбавления, использованных для инфицирования вирусом, отбирают культуру с коэффициентом разбавления, при котором достигается самая высокая жизнеспособность клеток, при условии, что если титры в анализе гемагглютинации (ГА) (за исключением 0) для двух или более культур различаются в 4 раза или более, то отбирают культуру, имеющую коэффициент разбавления, для которого получают самый высокий титр ГА, и используют для следующего пассажа. Распространенной практикой является отбор вирусной культуры, имеющей самый высокий титр ГА. Согласно настоящему изобретению было показано, что для получения вируса с высокой инфекционностью предпочтительно учитывать показатель жизнеспособности клеток. В частности, предпочтительно жизнеспособность клеток должна составлять по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, примерно 100% или находиться в любом диапазоне между указанными значениями. Учет жизнеспособности клеток при определении подходящего момента времени для сбора исследуемого вируса гриппа противоречит общим техническим знаниям. Согласно уровню техники учитывается только тот момент времени, когда достигается самый высокий титр ГА, а жизнеспособность клеток при этом не рассматривается. Таким образом, для культур, которые отбирают только на основании значения титра ГА, часто пропускается момент достижения наивысшей жизнеспособности клеток. Согласно настоящему изобретению было показано, что отбор культуры, имеющей самую высокую жизнеспособность клеток, обеспечивает получение вируса с высокой инфекционностью. Титр ГА может составлять 0, по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере примерно 200, по меньшей мере примерно 300, по меньшей мере примерно 400, по меньшей мере примерно 500, по меньшей мере примерно 1000, по меньшей мере примерно 1100, по меньшей мере примерно 1200, по меньшей мере примерно 1300, по меньшей мере примерно 1400, более конкретно, по меньшей мере примерно 1500, или находиться в любом диапазоне между указанными значениями. Тем не менее, если титры в анализе гемагглютинации (ГА) (за исключением 0) двух или более культур различаются в 4 раза или более, то предпочтительно отбирают культуру, имеющую фактор разбавления, при котором достигается самый высокий титр ГА. Рассмотрение в качестве определяющего параметра титра ГА, но не жизнеспособности клеток, позволяет отбирать культуру с наивысшей инфекционностью.

Предпочтительно следует отбирать наиболее оптимальные результаты при сравнении жизнеспособности клеток и значений титра ГА культур с различными коэффициентами разбавления. Например, культура, имеющая самую высокую жизнеспособность клеток, является предпочтительной из культур, имеющих различные коэффициенты разбавления, при условии, что если две культуры или более имеют одинаковую жизнеспособность клеток, то можно отобрать культуру, имеющую самый высокий титр ГА. В качестве другого примера, культура, имеющая самую высокую жизнеспособность клеток, является предпочтительной из культур, имеющих различные коэффициенты разбавления, при условии, что если титр ГА культуры, имеющей более низкую жизнеспособность клеток, по меньшей мере в четыре раза выше титра ГА культуры культуры, имеющей самую высокую жизнеспособность клеток, то можно отобрать культуру, имеющую более низкую жизнеспособность клеток. В качестве еще одного примера, если две или более культур с различными коэффициентами разбавления имеют одинаковую самую высокую жизнеспособность клеток, то можно отобрать культуру, имеющую самый высокий титр ГА.

Отобранную первичную культуру можно использовать непосредственно или в последствии для вторичного или следующего пассажа. В качестве альтернативы, отобранную первичную культуру можно замораживать и хранить при температуре в диапазоне от -50 до -80°C, например от -55 до -70°C, перед последующим использованием, а после этого ее можно пассировать один или более раз.

Для проведения последующего вторичного пассажа культуры первичную культуру можно разбав-

лять до достижения различных коэффициентов разбавления и инфицировать новую клеточную линию, адаптированную к бессывороточной культуре и суспензионной культуре. Вторичный пассаж проводят таким же способом, что описан для первичного пассажа. Коэффициенты разбавления могут составлять, например, от 1/1 до 1/10000, но коэффициент разбавления выбирают таким образом, чтобы значения жизнеспособности и титра ГА в первичной культуре были наивысшими. После этого, культуры, имеющие различные коэффициенты разбавления, культивируют таким же образом, что и первичную культуру, измеряют жизнеспособность клеток и титр ГА тем же способом, что описан для первичной культуры, и отбирают культуру, имеющую самую высокую жизнеспособность клеток, которая равна или превышает значение для первичной культуры. Собирают отобранную культуру. Собранная культура может применяться как рабочий посевной материал вируса гриппа.

Необязательно можно проводить третичный или следующий пассаж отобранной культуры таким же способом, что описан выше. Титр вирусного посевного материала в анализе бляшкообразования после вторичного или следующего пассажа увеличится по меньшей мере примерно в 10 раз, в частности, по меньшей мере примерно в 100 раз, по меньшей мере примерно в 200 раз, по меньшей мере примерно в 300 раз или по меньшей мере примерно в 400 раз по сравнению с вирусом гриппа перед пассированием, например, с исходным вирусом гриппа.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу повышения инфекционности рабочего посевного материала вируса гриппа, включающему инфицирование клеточной линии, адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, вакцинным вирусом гриппа, культивирование инфицированной клеточной линии и дальнейшее пассирование вирусной культуры в той же клеточной линии с получением рабочего посевного материала вируса гриппа, причем из культур с различными коэффициентами разбавления, используемыми для инфицирования вирусом, отбирают культуру с коэффициентом разбавления, при котором достигается самая высокая жизнеспособность клеток, при условии, что если титры в анализе гемагглютинации (ГА) (за исключением 0) для двух или более культур различаются в 4 раза или более, то отбирают культуру, имеющую коэффициент разбавления, для которого получают самый высокий титр ГА, и используют для следующего пассажа. Указанный аспект может быть реализован в соответствии с предшествующим аспектом, и, таким образом, его описание опущено во избежание повторения.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способу получения вакцины от гриппа, включающему получение больших количеств рабочего посевного материала вируса гриппа, полученного согласно соответствующему аспекту, или рабочего посевного материала вируса гриппа с повышенной инфекционностью согласно соответствующему аспекту и ослабление или инактивацию вирусного посевного материала. Этот аспект позволяет в короткие сроки получать большое количество вируса с повышенной инфекционностью по сравнению с исходным вирусом перед пассированием (например, с исходно полученным вирусом), который, таким образом, подходит для крупномасштабного получения вируса с повышенной инфекционностью. Ослабленный или инактивированный вирус может представлять собой ослабленный цельный вирус, субвирион (так называемую сплит-вакцину), в котором очищенные частицы вируса разрушаются детергентом, растворяющим липидную оболочку, или другими реагентами, или очищенные HA или NA (субъединичную вакцину).

Еще один аспект настоящего изобретения относится к рабочему посевному материалу вируса гриппа с повышенной инфекционностью, полученному соответствующим способом, или к вакцине от гриппа, полученной соответствующим способом. Инфекционность рабочего посевного материала вируса гриппа или вакцины от гриппа может быть повышена по меньшей мере примерно в 10 раз, в частности, по меньшей мере примерно в 10 раз, по меньшей мере примерно в 100 раз, по меньшей мере примерно в 200 раз, по меньшей мере примерно в 300 раз или по меньшей мере примерно в 400 раз при определении по титру в анализе бляшкообразования.

Настоящее изобретение будет подробно описано при помощи приведенных ниже представительных вариантов реализации, предназначенных для лучшего понимания настоящего изобретения. В варианты реализации настоящего изобретения, тем не менее, могут быть внесены изменения с образованием некоторых других форм, и объем настоящего изобретения не следует рассматривать как ограниченный приведенными ниже вариантами реализации. Варианты реализации настоящего изобретения предназначены для более исчерпывающего объяснения настоящего изобретения специалистам в данной области техники.

### Примеры

Пример 1. Различия в инфекционности в зависимости от жизнеспособности клеток и титра ГА при выращивании штаммов вакцинных вирусов

Клеточную линию MDCK (MDCK Sky3851), адаптированную к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, выращивали при 34°C и 5% CO<sub>2</sub> при перемешивании со скоростью 80 об./мин. После того, как клетки выросли сверх предварительно определенного уровня в ходе нескольких пассажей, среду заменяли на новую. Затем помещали клетки в четыре 125 мл роллерные колбы в концентрации от 3,0×10<sup>6</sup> клеток/мл до 4,0×10<sup>6</sup> клеток/мл и дополняли среду трипсином для инфицирования. В указанном

эксперименте использовали вакцинные штаммы гриппа 2005-2006, 2009-2010 и 2016-2017 гг. Условия выращивания вирусов показаны в табл. 1.

Таблица 1. Условия выращивания вирусов

Условия выращивания	Заданное значение
Концентрация клеток для инфицирования	$3,0 \times 10^6$ - $4,0 \times 10^6$ клеток/мл
Выращиваемый объем	125 мл роллерные колбы
Период выращивания	2-3 дня
Скорость перемешивания роллерных колб	80 об./мин
Температура	34°C
Концентрация CO <sub>2</sub>	5%
Концентрация трипсина	5 мкг/мл

Вакцинные штаммы вируса гриппа разбавляли в 1-1/1000 раз для выращивания вируса и инфицировали клеточную линию предварительно определенным количеством каждого разбавленного препарата. Для определения соответствующего момента времени для сбора каждого вируса гриппа измеряли жизнеспособность клеток и титр ГА в культурах через 1 день или 2 дня после инфицирования (DPI). Из культур, имеющих различные коэффициенты разбавления, отбирали культуры с различными значениями жизнеспособности клеток, титры ГА в которых отличались в 2 или 4 раза. Результаты показаны в табл. 2.

Таблица 2. Инфекционность вакцинных штаммов гриппа, имеющих различные значения жизнеспособности клеток и титра ГА

Вакцинный штамм гриппа	Коэффициент разбавления для инфицирования/инфицируемая доза	DPI	Жизнесп. клеток (%)	Титр ГА (ГАЕ/50 мкл)	Титр в анализе бляшкообр. (БОЕ/мл)
NYMC X-283A (А/Лиссабон/32/2015)	1/20 мкл	1	80	256	$2,20 \times 10^6$
	10/20 мкл		90	128	$5,40 \times 10^7$
NYMC X-157 (А/Нью-Йорк/55/2004)	100/20 мкл	1	84	512	$3,51 \times 10^7$
	1000/20 мкл		92	256	$1,50 \times 10^8$
В/Малайзия/2506/2004	10/20 мкл	1	91	4096	$6,12 \times 10^8$
	100/20 мкл		98	2048	$4,18 \times 10^9$
NYMC X-275 (А/Мичиган/45/2015)	1000/20 мкл	2	80	512	$4,80 \times 10^7$
	10000/20 мкл		90	128	$2,78 \times 10^7$
	10/20 мкл	2	89	1024	$6,70 \times 10^8$
NYMC X-175C (А/Уругвай/716/2007)	1000/20 мкл		94	256	$1,25 \times 10^8$
NYMC VX-35 (В/Брисбен/60/2008)	1/20 мкл	2	41	1024	$1,40 \times 10^8$
	1000/20 мкл		82	256	$6,80 \times 10^7$

На основании результатов, приведенных в табл. 2, можно увидеть, что жизнеспособность клеток и титр ГА культур вакцинного штамма гриппа NYMC X-283A (А/Лиссабон/32/2015), имеющих коэффициенты разбавления 1/1 и 1/10, были сравнимыми, и, таким образом, жизнеспособность клеток (90%) культуры, имеющей коэффициент разбавления 1/10, была выше жизнеспособности (80%) культуры с коэффициентом разбавления 1/1. Кроме того, титр ГА культуры с коэффициентом разбавления 1/10 был в два раза ниже по сравнению с культурой, имеющей коэффициент разбавления 1/1. В анализе бляшкообразования было показано, что культура, имеющая коэффициент разбавления 1/10, имела в ~24,5 раза более высокий титр в анализе бляшкообразования, несмотря на в два раза более низкий титр ГА.

В случае штаммов NYMC X-157 (А/Нью-Йорк/55/2004) и В/Малайзия/2506/2004 для культур, имевших более высокие значения жизнеспособности клеток, были получены более высокие титры в анализе бляшкообразования, несмотря на то, что они имели в два раза более низкие титры ГА.

При этом значения жизнеспособности клеток и титра ГА в культурах вакцинного штамма гриппа NYMC X-275 (А/Мичиган/45/2015), имеющих коэффициенты разбавления 1/1000 и 1/10000, были сравнимыми, и, таким образом, жизнеспособность клеток (90%) в культуре с коэффициентом разбавления 1/10000 была выше жизнеспособности (80%) культуры с коэффициентом разбавления 1/1000. Кроме того, титр ГА в культуре с коэффициентом разбавления 1/10000 был в четыре раза ниже, чем в культуре, имеющей коэффициент разбавления 1/1000. В анализе бляшкообразования было показано, что культура с коэффициентом разбавления 1/1000, которая имела титр ГА, в четыре раза превышающий титр ГА культуры с коэффициентом разбавления 1/10000, имела в ~1,7 раза более высокий титр в анализе бляшкообразования, несмотря на более низкую жизнеспособность клеток.

В случае вакцинных штаммов гриппа NYMC X-175C (А/Уругвай/716/2007) и NYMC VX-35 (В/Брисбен/60/2008) для культур, имевших в четыре раза более высокие титры ГА, были получены более высокие титры в анализе бляшкообразования, несмотря на пониженную жизнеспособность клеток.

Пример 2. Получение рабочего посевного материала вируса гриппа (в 125 мл роллерных колбах)

Клеточную линию MDCK (MDCK Sky3851), адаптированную к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, выращивали при 34°C и 5% CO<sub>2</sub> при перемешивании со скоростью 80 об./мин. После того, как клетки выросли сверх предварительно определенного уровня в ходе нескольких пассажей, среду заменяли на новую. Затем помещали клетки в четыре 125 мл роллерные колбы в концентрации от 3,0×10<sup>6</sup> клеток/мл до 4,0×10<sup>6</sup> клеток/мл и дополняли среду трипсином для инфицирования. В указанном эксперименте использовали вакцинные штаммы гриппа 2004-2010 гг. Условия выращивания первичных и вторичных культур вирусов показаны в табл. 1.

Вакцинные штаммы вируса гриппа разбавляли в 1-1/1000 раз для выращивания первичной культуры вируса и инфицировали клеточную линию предварительно определенным количеством каждого разбавленного препарата. Для определения соответствующего момента времени для сбора каждого вируса гриппа измеряли жизнеспособность клеток и титр ГА в культурах через 1 день или 2 дня после инфицирования (DPI). Из культур, имеющих различные коэффициенты разбавления, отбирали культуры с самым высоким значением жизнеспособности клеток. Результаты показаны в табл. 3. В указанном эксперименте культуры, титры ГА (за исключением 0) которых отличались в 4 раза, отсутствовали. Собирали отобранные первичные культуры через 2DPI, центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин, разделяли на небольшие порции (по 1 мл) и хранили при ≤-70°C. Размораживали культуру в одной из пробирок и разбавляли в 1-1/10000 раз, инфицировали с получением вторичной пассированной культуры вируса и измеряли жизнеспособность клеток и титр ГА через 1DPI и 2DPI таким же способом, что и в первичной пассированной культуре. Из культур, имеющих различные коэффициенты разбавления, отбирали культуры с самой высокой жизнеспособностью клеток. Результаты показаны в табл. 3. В указанном примере культуры, титры ГА (за исключением 0) которых отличались в 4 раза, отсутствовали.

Финальный отбор вторичных культур проводили через 2DPI, собирали их, центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин, разделяли на небольшие порции (по 1 мл) и хранили при ≤ -70°C, их рассматривали в качестве рабочего посевного материала вируса гриппа.

Таблица 3. Титр ГА и жизнеспособность клеток для вакцинных штаммов гриппа 2004-2010 гг

Вакцинные штаммы гриппа	Число пассажей	Кoeff. разб. для инфиц./ Инфиц. доза	1DPI		2DPI	
			Ж.-сп. клеток (%)	Титр ГА (ГАЕ/50 мкл)	Ж.-сп. клеток (%)	Титр ГА (ГАЕ/50 мкл)
IVR-116 (А/Новая Каледония/20/99)	Перв. культура	1000/20 мкл	100	0	71	1024
	Втор. культура	10000/20 мкл	99	32	80	1024
IVR-145 (А/Соломоновы острова/3/2006)	Перв. культура	10/20 мкл	100	256	73	512
	Втор. культура	10000/20 мкл	96	0	75	512
IVR-148 (А/Брисбен/59/2007)	Перв. культура	1000/20 мкл	100	512	83	2048
	Втор. культура	10000/20 мкл	99	256	84	1024
NYMC X-147 (А/Вайоминг/03/2003)	Перв. культура	1000/20 мкл	100	0	83	256
	Втор. культура	10000/20 мкл	100	0	91	256
NYMC X-161B (А/Висконсин/67/2005)	Перв. культура	1000/20 мкл	100	0	94	2048
	Втор. культура	10000/20 мкл	100	16	85	2048
NYMC X-175C (А/Уругвай/716/2007)	Перв. культура	1000/20 мкл	99	0	93	1024
	Втор. культура	10/20 мкл	99	512	89	1024
В/Флорида/4/2006	Перв. культура	1/20 мкл	98	2048	7	4096
	Втор. культура	1000/20 мкл	95	0	77	1024

Проводили анализ бляшкообразования для определения инфекционности надсадочных жидкостей, собранных через 2DPI в первичной культуре и вторичной культуре. Результаты показаны в табл. 4. Проводили два последовательных пассажа вакцинных штаммов гриппа в клеточной линии MDCK (MDCK Sky3851), адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре. В качестве результата

было показано, что титры в анализе бляшкообразования в надосадочных жидкостях были в 10-1000 раз выше по сравнению с вакцинными штаммами гриппа.

Таблица 4. Титры в анализе бляшкообразования для вакцинных штаммов гриппа, собранных после выращивания

Подтип	Годы	Изучаемый вакцинный вирус гриппа	Титр бляшкообразования (БОЕ/мл)		
			Вакцинный штамм гриппа	Перв. культура	Втор. культура
A/H1N1	2006-2007	IVR-116 (А/Новая Каледония/20/99)	$1,84 \times 10^7$	$1,60 \times 10^9$	$3,04 \times 10^9$
	2007-2008	IVR-145 (А/Соломоновы острова/3/2006)	$1,74 \times 10^7$	$4,64 \times 10^8$	$2,36 \times 10^9$
	2009-2010	IVR-148 (А/Брисбен/59/2007)	$1,38 \times 10^8$	$1,82 \times 10^9$	$1,14 \times 10^9$
A/H3N2	2004-2005	NYMC X-147 (А/Вайоминг/03/2003)	$1,74 \times 10^5$	$3,74 \times 10^8$	$2,44 \times 10^8$
	2007-2008	NYMC X-161B (А/Висконсин/67/2005)	$2,82 \times 10^6$	$2,06 \times 10^9$	$2,08 \times 10^9$
	2009-2010	NYMC X-175C (А/Уругвай/716/2007)	$1,54 \times 10^7$	$5,86 \times 10^8$	$6,70 \times 10^8$
B	2008-2009	В/Флорида/4/2006	$7,40 \times 10^6$	$8,20 \times 10^8$	$3,48 \times 10^9$

Пример 3. Получение рабочего посевного материала вируса гриппа (в 3 л роллерных колбах)

Клеточную линию MDCK (MDCK Sky3851), адаптированную к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, выращивали при 34°C и 5% CO<sub>2</sub> при перемешивании со скоростью 80-100 об./мин. После того, как клетки вырастали сверх предварительно определенного уровня при проведении нескольких пассажей, заменяли среду на новую. Затем помещали клетки в четыре 125 мл роллерные колбы в концентрации от  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл до  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл в случае первичной вирусной культуры и в четыре 3 л роллерные колбы в концентрации от  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл до  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл в случае вторичной вирусной культуры и дополняли среду трипсином для инфицирования. В указанном эксперименте использовали вакцинные штаммы гриппа 2013-2017 гг. Условия выращивания первичных и вторичных культур вирусов показаны в табл. 5.

Таблица 5. Условия выращивания первичных и вторичных вирусных культур

Условия выращивания	Заданные значения для первичной вирусной культуры	Заданные значения для вторичной вирусной культуры
Концентрация инфицируемых клеток	$3,0 \times 10^6$ - $4,0 \times 10^6$ клеток/мл	$3,0 \times 10^6$ - $4,0 \times 10^6$ клеток/мл
Объем выращивания	125 мл роллерные колбы	3 л роллерные колбы
Период выращивания	2-3 дня	2-3 дня
Скорость перемешивания роллерных колб	80 об./мин	100 об./мин
Температура	34°C	34°C
Концентрация CO <sub>2</sub>	5%	5%
Концентрация трипсина	5 мкг/мл	5 мкг/мл

Культуры, отбираемые через 1DPI и 2DPI после выращивания вторичных вирусных культур, получали таким же способом, что и в примере 2. Центрифугировали культуры при 3000 об./мин в течение 10 мин, разделяли на небольшие порции (по 1 мл) и хранили при температуре  $\leq -70^\circ\text{C}$ , полученные культуры определяли как рабочий посевной материал вируса гриппа. Измеряли жизнеспособность клеток и титр ГА для вакцинных штаммов гриппа через 1DPI и 2DPI для первичных и вторичных пассированных культур. Результаты показаны в табл. 6.

Таблица 6. Титр ГА и жизнеспособность клеток для вакцинных штаммов гриппа 2013-2017 гг.

Вакцинные штаммы гриппа	Число пассажей	Коэф. разб. для инфиц./ Инфиц. доза	1DPI		2DPI	
			Ж.-сп. клеток (%)	Титр ГА (ГАЕ/50 мкл)	Ж.-сп. клеток (%)	Титр ГА (ГАЕ/50 мкл)
NIB-74хр (А/Крайстчерч/ 16/2010)	Перв. культура	10/20 мкл	100	1024	-	-
	Втор. культура	100/333 мкл	99	2048	-	-
NYMC X-223A (А/Техас/50/2012)	Перв. культура	1/20 мкл	99	1024	-	-
	Втор. культура	10/333 мкл	99	2048	-	-
NYMC X-247 (А/Швейцария/ 9715293/2013)	Перв. культура	1/20 мкл	94	1024	-	-
	Втор. культура	10/333 мкл	97	1024	-	-
NYMC X-263 (А/Гонконг/4801/2014)	Перв. культура	100/20 мкл	100	0	89	1024
	Втор. культура	100/333 мкл	100	512	95	1024
NIB-93 (А/Гонконг/7127/2014)	Перв. культура	1000/20 мкл	100	0	85	512
	Втор. культура	1000/333 мкл	100	0	89	512
В/Массачусетс/2/2012	Перв. культура	10/20 мкл	99	0	95	2048
	Втор. культура	100/333 мкл	100	0	85	4096
NYMC ВХ-35 (В/Брисбен/60/2008)	Перв. культура	1/20 мкл	99	0	41	1024
	Втор. культура	10/333 мкл	98	0	88	2048
В/Пхукет/3073/2013	Перв. культура	100/20 мкл	100	0	97	2048
	Втор. культура	1000/333 мкл	100	0	75	4096

Проводили анализ бляшкообразования в конечных культурах для подтверждения инфекционности рабочих посевных материалов вируса гриппа, перечисленных в табл. 6. Результаты показаны в табл. 7. По аналогии с результатами, приведенными в табл. 4 (пример 2), большинство титров в анализе бляшкообразования для рабочего посевного материала вируса гриппа после двух последовательных пассажей в клеточной линии MDCK (MDCK Sky3851), адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, составляли  $\geq 1,00 \times 10^8$  БОЕ/мл.

Таблица 7. Титры в анализе бляшкообразования для рабочего посевного материала вируса гриппа 2013-2017 гг.

Подтип	Годы	Исследуемый вакцинный вирус гриппа	Титр бляшкообр. (БОЕ/мл)
А/Н1N1	2013-2017	NIB-74хр (А/Крайстчерч/16/2010)	$1,01 \times 10^9$
А/Н3N2	2013-2015	NYMC X-223A (А/Техас/50/2012)	$3,31 \times 10^8$
	2015-2016	NYMC X-247 (А/Швейцария/9715293/2013)	$1,70 \times 10^7$
	2016-2017	NYMC X-263 (А/Гонконг/4801/2014)	$1,20 \times 10^9$
		NIB-93 (А/Гонконг/7127/2014)	$3,30 \times 10^8$
В	2013-2015	В/Массачусетс/2/2012	$1,37 \times 10^9$
		NYMC ВХ-35 (В/Брисбен/60/2008)	$2,70 \times 10^8$
	2015-2017	В/Пхукет/3073/2013	$2,60 \times 10^9$

Пример 4. Секвенирование рабочего посевного материала вируса гриппа  
Определяли возможные изменения антигенных свойств гемагглютинина (НА) и нейраминидазы

(NA), которые являются основными поверхностными антигенами, после трехкратного пассирования вакцинных штаммов гриппа в клеточной линии MDCK, адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре. Для этого выявляли изменения последовательностей антигенов. Проводили двукратный пассаж вакцинных штаммов таким же образом, что и в примере 2, и проводили еще один пассаж (всего три раза). Затем выделяли РНК из каждого вируса при помощи набора PureLink Viral RNA/DNA (Invitrogen) и проводили селективную амплификацию генов HA и NA путем ПНР в системе SUPERSCRIPTIII ONE-STEP RT-PCR (Invitrogen) с использованием праймеров, обладающих специфичностью в отношении генов HA и NA в штамме вируса. Затем удаляли примеси из продуктов ПНР с использованием набора для очистки QIAquick PCR. Проводили секвенирование ДНК в генетическом анализаторе ABI PRISM 3130xl, массив данных о последовательности получали при помощи инструментов SeqMan Pro и MegAlign в программе DNA STAR, Lasergene версии 8.1.

Таблица 8. Стандартные штаммы вирусов, используемые для секвенирования

Подтип	Штамм вируса для препарата WVSS	Стандартный штамм вируса
А/Н1N1	NYMC X-181A (А/Калифорния/07/2009)	NYMC X-181A (А/Калифорния/07/2009)
А/Н3N2	NYMC X-187 (А/Виктория/210/2009)	NYMC X-187 (А/Виктория/210/2009)
В/Виктория	NYMC BX-35 (В/Брисбен/60/2008)	NYMC BX-35 (В/Брисбен/60/2008)

Результаты, приведенные в табл. 8, демонстрируют, что даже после трехкратного пассирования всех вакцинных штаммов гриппа подтипов А/Н1N1, А/Н3N2 и В в клеточной линии MDCK, адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, изменения последовательностей генов HA и NA, являющихся основными поверхностными антигенами, не происходили. В завершение, антигенные свойства антигенов оставались неизменными.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения рабочего посевного материала вируса гриппа, включающий инфицирование клеточной линии, адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, вакцинным вирусом гриппа, культивирование инфицированной клеточной линии и далее пассирование вирусной культуры в той же клеточной линии, причем из культур с различными коэффициентами разбавления, использованных для инфицирования вирусом, отбирают и используют для следующего пассажа культуру с коэффициентом разбавления, при котором достигается самая высокая жизнеспособность клеток, при этом в случае, если титры в анализе гемагглютинации (ГА) (за исключением 0) культуры с более низкой жизнеспособностью клеток выше в 4 раза или более, чем титр ГА культуры с коэффициентом разбавления, при котором достигается самая высокая жизнеспособность клеток, то отбирают культуру, имеющую коэффициент разбавления, для которого получают самый высокий титр ГА, и используют для следующего пассажа.

2. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанная клеточная линия, адаптированная к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, представляет собой клеточную линию MDCK.

3. Способ по п.2, характеризующийся тем, что указанная клеточная линия MDCK представляет собой MDCK B-702, MDCK KCLRF-BP-00297, MDCK Sky1023 (DSM ACC3112), MDCK Sky10234 (DSM ACC3114) или MDCK Sky3851 (DSM ACC3113).

4. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанную инфицированную клеточную линию культивируют при перемешивании со скоростью от 10 до 150 об./мин при температуре от 32 до 38°C в течение периода от 1 до 3 дней.

5. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанную отобранную первичную культуру последовательно пассируют два или более раз или замораживают и хранят при температуре в диапазоне от -50 до -80°C и пассируют два или более раз.

6. Способ по п.1, характеризующийся тем, что жизнеспособность клеток в указанной отобранной культуре составляет по меньшей мере 50%.

7. Способ по п.6, характеризующийся тем, что титр указанной отобранной культуры в анализе гемагглютинации (ГА) составляет по меньшей мере примерно 100.

8. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанные коэффициенты разбавления составляют от 1/1 до 1/10000.

9. Способ получения вакцины от гриппа, включающий получение рабочего посевного материала вируса гриппа, полученного способом по любому из пп.1-5, и ослабление или инактивацию рабочего посевного материала вируса гриппа.

10. Способ по п.9, характеризующийся тем, что инфекционность указанного рабочего посевного материала вируса гриппа выше инфекционности вакцинного вируса гриппа перед пассированием.

11. Способ повышения инфекционности рабочего посевного материала вируса гриппа, включающий инфицирование клеточной линии, адаптированной к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, вакцинным вирусом гриппа, культивирование инфицированной клеточной линии и далее пассирование вирусной культуры в той же клеточной линии с получением рабочего посевного материала

вируса гриппа, причем из культур с различными коэффициентами разбавления, использованных для инфицирования вирусом, отбирают и используют для следующего пассажа культуру с коэффициентом разбавления, при котором достигается самая высокая жизнеспособность клеток, при условии, что если титры в анализе гемагглютинации (ГА) (за исключением 0) культуры с более низкой жизнеспособностью клеток выше в 4 раза или более, чем титр ГА культуры с коэффициентом разбавления, при котором достигается самая высокая жизнеспособность клеток, то отбирают культуру, имеющую коэффициент разбавления, для которого получают самый высокий титр ГА, и используют для следующего пассажа.

12. Способ по п.11, характеризующийся тем, что указанная клеточная линия, адаптированная к бессывороточной культуре и суспензионной культуре, представляет собой клеточную линию MDCK.

