



(19) **МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

(12) **ПАТЕНТ**

(11) **№ 32411**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(54) **НАЗВАНИЕ:** Способ изготовления вакцины культуральной антирабической инактивированной для профилактики бешенства животных

(73) **ПАТЕНТООБЛАДАТЕЛЬ:** Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (KZ)

(72) **АВТОР (АВТОРЫ):** Жилин Евгений Сергеевич (KZ); Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ); Далбаев Нурлан Тамамбаевич (KZ); Ершебулов Закир Джапарович (KZ)

(21) Заявка № 2015/0941.1

(22) Дата подачи заявки: 12.08.2015

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан 18.09.2017.

Действие патента распространяется на всю территорию Республики Казахстан при условии своевременной оплаты поддержания патента в силе.

Заместитель министра юстиции
Республики Казахстан

Э. Азимова

Сведения о внесении изменений приводятся на отдельном листе в виде приложения к настоящему патенту



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 32411
(51) A61K 39/205 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2015/0941.1

(22) 12.08.2015

(45) 16.10.2017, бюл. №19

(72) Жилин Евгений Сергеевич; Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Далбаев Нурлан Тамамбаевич; Ершебулов Закир Джапарович

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56) RU 2134590 C1, 20.08.1999

UA 9060 U, 15.09.2005

RU 2012154548 A, 20.07.2014

WO 89/05154 A1, 15.06.1989

(54) СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ВАКЦИНЫ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ АНТИРАБИЧЕСКОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ БЕШЕНСТВА ЖИВОТНЫХ

(57) Изобретение относится к области ветеринарной биотехнологии и вирусологии, а именно к вакцине культуральной антирабической инактивированной (НИИПББ) для профилактики бешенства животных и способу её изготовления.

Вакцина представляет собой вирус-фикс бешенства штамм VRC-RZ2 [KZ №17453, C12N 7/00, C12R 1/93, A61K 39/205, 2004], выращенный в перевиваемой культуре клеток ВНК-21 суспензионным методом, инактивированный димером этиленimina (ДЭИ) и сорбированный на геле гидроокиси алюминия (ГОА). Вакцина в своем составе содержит: среду культивирования с инактивированным вирусом VRC-RZ2 (85-90%), 6% гель гидроокиси алюминия (10-20%). Вакцина предназначена для иммунизации собак, кошек, мелкого рогатого скота, крупного рогатого скота,

свиней, лошадей, верблюдов с целью профилактики бешенства.

Способ получения вакцины включает инфицирование вирусом бешенства штамм VRC-RZ2 (0,1-0,01 МЛД₅₀ на клетку) перевиваемой культуры клеток ВНК-21 (0,9-1,0 млн. клеток на см³) в суспензии, инкубировании клеток с вирусом при 37°C, в течение 40-60 мин при постоянном перемешивании 40 об/мин в биологической мешалке Techne, с последующей загрузкой ферментера реакторного типа инфицированными клетками, разбавленными до концентрации (400-500 тыс. клеток на см³) питательная синтетической среды (ПСР) с добавлением 5,0% сыворотки КРС, 1,0% глутамина и 0,5% гидролизата лактоальбумина (ГЛА), культивирование при непрерывном перемешивании 90 об/мин. Сбор вирусной суспензии осуществляется через 72-96 ч. до 7,5-8,5 МЛД₅₀/см³.

В вирусную суспензию при температуре плюс 37°C вносят ДЭИ в конечной концентрации 0,25 % и инкубируют при постоянном перемешивании суспензии в течение 24 ч. Полноту инактивации проверяют в интрацеребральном тесте на мышах.

Сорбцию инактивированного вируса проводят внесением 6% ГОА при конечной концентрации 10-20% в течение 12 ч при температуре плюс 4-8°C. Готовая вакцина фасуется во флаконы в асептических условиях, укупоривается стерильными резиновыми пробками и обкатывается алюминиевыми колпачками. Вакцина сохраняет свои иммуногенные свойства не менее 12 мес при температуре плюс 4°C.

Иммуногенность вакцины определяют в тесте НИН и составляет не менее 2,0 МЕ. Вакцина безвредна и ареактогенна для всех видов сельскохозяйственных животных, а также собак и кошек.

(19) KZ (13) B (11) 32411

Изобретение относится к области ветеринарной биотехнологии и вирусологии, а именно к вакцине культуральной антирабической инактивированной (НИИЭВ) для профилактики бешенства животных и способу её изготовления.

Сущность изобретения:

Вакцина представляет собой вирус-фикс бешенства штамм VRC-RZ2 [KZ №17453, C12N 7/00, C12R 1/93, A61K 39/205, 2004], выращенный в перевиваемой культуре клеток ВНК-21 суспензионным методом, инактивированный димером этиленimina (ДЭИ) и сорбированный на геле гидроокиси алюминия (ГОА). Вакцина в своем составе содержит: среду культивирования с инактивированным вирусом VRC-RZ2 (85-90%), 6% гель гидроокиси алюминия (10-20%). Вакцина безвредна и ареактогенна для всех видов сельскохозяйственных животных, а также собак и кошек. Иммуногенность приготовленной таким образом вакцины в тесте НИН (Национального щотитута здравоохранения США), составляет не менее 2,0 МЕ (Табл. 1). Вакцина предназначена для иммунизации собак, кошек, мелкого рогатого скота, крупного рогатого скота, свиней, лошадей, верблюдов с целью профилактики бешенства.

Известен способ получения вакцины против бешенства животных включающий дезинтеграцию фиксированного вируса бешенства в мозговой суспензии в присутствии сапонина при температуре 27-30°C, стабилизацию фиксированного вируса в присутствии раствора формалина при температуре 27-30°C, смешивание полученной суспензии с адьювантом - стерильным коллоидным раствором гидрата окиси алюминия на цитратно-фосфатном буфере, при этом в качестве фиксированного вируса бешенства используют вирус-фикс бешенства штамм "Овечий" ВГНКИ [Предварительный патент на изобретение РК №13392 от 22.02.2002].

Недостатки данного способа заключаются в низкой иммуногенной активности полученной вакцины, высокой токсичности формалина и потенциальном содержании в препарате остаточного вируса, что способствует проявлению поствакцинальных осложнений у привитых животных, особенно у крупного рогатого скота и декоративных пород собак. Из-за значительной инфицированности овец возбудителем скрепи существует постоянная угроза его попадания с мозговой тканью в состав изготавливаемой вакцины, как следствие этого, распространение прионовой инфекции среди прививаемого поголовья сельскохозяйственных и домашних животных. Поэтому процесс получения мозгового посевного материала является очень ответственной, трудоемкой и дорогостоящей операцией, связанной с тщательным отбором животных и контролем мозговой вакцины на наличие посторонних агентов.

В тоже время в руководстве OIE Terrestrial Manual [2013] Всемирной организации защиты животных, запрещается использование формалина и фенола для инактивации вируса бешенства. Кроме того вакцины, приготовленные на основе вирусов фикс репродуцируемых в мозговой ткани животных, в

настоящее время считаются не безопасными и их применение должно быть прекращено [WORLD HEALTH ORGANIZATION (2005). World Health Organisation Expert Committee on Rabies, Eighth Report; WHO Technical Report Series, 931, WHO, Geneva, Switzerland, 1-87].

Известен способ изготовления инактивированной вакцины против бешенства животных, включающий репродукцию вируса бешенства штамм РБ-71 (БелНИИЭВ-ВГНКИ) в культуре ВНК-21 с концентрацией 0,5-0,6 млн. кл/мл с одновременным внесением вируса в дозе 0,1-0,01 МЛД₅₀/кл в суспензионной среде 0,25% ФГМ в ферментерах реакторного типа при температуре 37°C и постоянном перемешивании содержимого, и автоматическом поддержании рН среды в пределах 7,2-7,6. Время культивирования - 6 суток. Инфекционная активность вируса бешенства штамма РБ-71 к этому времени составляет 6,5-6,8 lg МДЦ₅₀/см³. Антигенная активность вирусного сырья из штамма РБ-71 составляет 1:90-1:270 в реакции ИФА. Полученное вирусное сырье инактивируют А-24 в концентрации 0,01-0,1% в течение 3 суток при 37°C, затем добавляли 6% 10-20% гидроокиси алюминия (ГОА) до конечной концентрации 0,6% [Патент РФ 2244557, А61К 39/205, А61Р 31/12, от 21.01.2003].

Недостатками данного способа являются длительность процессов культивирования вируса до 6 сут, что связано с адаптационными и репродуктивными свойствами используемого штамма РБ-71 (БелНИИЭВ-ВГНКИ), а также продолжительностью процесса инактивации до 3 сут при использовании в качестве инактиванта А-24. Продолжительные сроки производственных процессов увеличивают издержки, связанные с повышенными расходами на электроэнергию и трудозатраты персонала, что в конечном итоге увеличивает себестоимость вакцины.

Наиболее близким аналогом предлагаемому изобретению по совокупности существенных признаков по способу, а также составу препарата является вакцина, приготовленная путем культивирования фиксированного вируса бешенства (ВБ) Щелково-51 в суспензионной культуре клеток ВНК-21 при 35-37°C в течение 96-144 ч, получая вирусную суспензию с титром инфекционности 5,5-6,5 lg ЛД₅₀/МЛ. По окончании репродукции ВБ в вируссодержащую суспензию вносят сначала в качестве стабилизатора полиакриловую кислоту (ПАК) или феракрил (ФА) до концентрации 0,7-1,0%. Затем вносят в качестве инактиванта димер этиленимин (ДЭИ) до концентрации 0,1-0,3%. Смесь инкубируют при 35-37°C в течение 20-24 ч. Полученную вакцину используют как в жидком, так и в сухом виде. Для получения сухого препарата жидкую вакцину высушивают сублимацией. [РФ №2134590 А61К 39/205, C12N 7/04, заявка от 24.11.1997].

Недостатком данного способа является, сравнительная низкая активность вируссодержащей суспензии, являющейся основой препарата, а также введение дополнительных технологических этапов

по внесению в вакцину ПАК и ФА. В жидком виде вакцина имеет следующее соотношение компонентов, об. %: ПАК или ФА - 14-20, ДЭИ - 0,5-1,5, вирусодержащая суспензия - остальное.

Проведенный заявителем анализ уровня техники, включающий поиск по патентным и научно-техническим источникам информации и выявление источников, содержащих сведения об аналогах предлагаемых изобретений, позволил установить, что заявитель не обнаружил источники, характеризующиеся признаками, тождественными (идентичными) всем существенным признакам предлагаемого изобретения.

Задача: Разработка вакцины антирабической культуральной инактивированной для профилактики бешенства собак, кошек и сельскохозяйственных животных и способа её изготовления.

Технический результат заключается в повышении безопасности и иммуногенности жидкой антирабической вакцины за счет введения в ее состав вируса-фикс бешенства штамм VRC-RZ2. Заражение клеток ВНК-21 в концентрации 0,9-1,0 млн. клеток на см^3 позволяет повысить процент зараженных клеток на первоначальном этапе культивирования, что способствует более эффективной репродукции вируса в клетках и в конечном итоге позволяет снизить затраты времени на этап культивирования до 96 часов. Этап инактивации с применением в концентрации 0,25% ДЭИ позволяет полностью инактивировать в течение 24 ч, без снижения антигенной активности.

Изобретение иллюстрируется следующим примером.

Способ получения вакцины включает инфицирование вирусом бешенства штамм VRC-RZ2 (0,1-0,01 МЛД₅₀ на клетку) перевиваемой культуры клеток ВНК-21 (0,9-1,0 млн. клеток на см^3) в суспензии, инкубировании клеток с вирусом при 37°C, в течение 40-60 мин при постоянном перемешивании 40 об/мин в биологической мешалке Techne, с последующей загрузкой ферментера реакторного типа инфицированными клетками, разбавленными до концентрации (400-500 тыс.

клеток на см^3) питательной синтетической среды (ПСР) с добавлением 5,0% сыворотки КРС, 1,0% глутамина и 0,5 % гидролизата лактоальбумина (ГЛА), культивирование при непрерывном перемешивании 90 об/мин. Сбор вирусной суспензии осуществляется через 72-96 ч. Вирусную суспензию подвергают замораживанию при температуре минус 70°C в течение 20-24 ч.

Проба вирусной суспензии тестируется на инфекционную активность в тесте на мышах [Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. Laboratory techniques in rabies, WHO, Geneva, 1996, p.479]. Инфекционная активность вирусодержащей суспензии составляет 7,5-8,5 МЛД₅₀/ см^3 , а антигенный титр при этом не менее 1:2048 в тесте ИФА.

По завершению размораживания при температуре плюс 4°C, вирусную суспензию выдерживают в течение 60 мин при температуре плюс 37°C с последующим внесением ДЭИ в конечной концентрации 0,25% и инкубацией при постоянном перемешивании суспензии в течение 24 ч. Полноту инактивации проверяют в интрацеребральном тесте на мышах [General consideration in testing the safety and potency of rabies vaccines. Laboratory Techniques in Rabies. World Health Organization, Geneva 1996. P.355-358].

Сорбция инактивированного вируса проводится внесением 6 % ГОА при конечной концентрации 10-20% в течение 12 ч при температуре плюс 4-8°C. Готовая вакцина фасуется во флаконы в асептических условиях, укупоривается стерильными резиновыми пробками и обкатывается алюминиевыми колпачками.

Вакцина сохраняет свои иммуногенные свойства не менее 12 мес при температуре плюс 4°C.

Иммуногенность вакцины определяются в тесте НИИ (национальные институты здравоохранения США), рекомендованный ВОЗ с использованием международной референс антирабической вакцины и референс штамма бешенства CVS в дозе 50-150 МЛД₅₀. Результаты испытания различных серий вакцины представлены в таблице 1.

Таблица 1

Номер серии вакцины	Доза вируса бешенства штамм CVS	Иммуногенность вакцины в тесте НИИ
1	125	2,24
2	125	2,40
3	125	2,05
4	125	2,52
5	125	2,14

Введение вакцины сельскохозяйственным животным, а также кошкам и собакам сопровождается наработкой вируснейтрализующих антител в титрах не менее 1:16 по истечению 21 сут после иммунизации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ изготовления вакцины культуральной антирабической инактивированной для

профилактики бешенства животных включающий культивирование вируса культуры клеток, инактивацию и сорбцию, отличающаяся тем, что основой вакцины является штамм вируса бешенства VRC-RZ 2, которым заражают перевиваемую линию почки сирийского хомячка с концентрацией 0,9-1,0 млн. клеток/ см^3 в дозе 0,1-0,01 МЛД₅₀ на клетку, с последующим разбавлением до концентрации 0,4-0,5 млн. клеток/ см^3 питательной синтетической средой и культивированием вируса в

