ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ

ӨНЕРТАБЫСҚА ПАТЕНТ

АСТАНА

(19) **ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ**

ӨНЕРТАБЫСҚА

(11) **№ 33095**

(12) # ПАТЕНТ

(54) **АТАУЫ:** Шошқалардың репродуктивті-респираторлы синдромы вирусының еуропалық және солтүстік американдық генотиптеріне қарсы бивалентті инактивтелген вакцина дайындау тәсілі

(73) **ПАТЕНТ ИЕЛЕНУШІСІ:** Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің "Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты" шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорыны (KZ)

(72) **АВТОР (АВТОРЛАР):** Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ); Мамбеталиев Муратбай (KZ); Абдураимов Ергали Орынбасарович (KZ); Абсатова Жаркинай Серикбаевна (KZ); Табынов Кайрат Казыбаевич (KZ); Есимбекова Назым Бейсехановна (KZ); Килибаев Санат Серикович (KZ)

(21) **Өтінім №** 2017/0128.1 (22) **Өтінім берілген күн:** 16.02.2017

25.08.2018 Қазақстан Республикасы Өнертабыстардың мемлекеттік тізілімінде тіркелді.

Патентті күшінде ұстау ақысы уақытылы төленген жағдайда, патенттің күші Қазақстан Республикасының бүкіл аумағында қолданылады.

Қазақстан Республикасының
Әділет вице-министрі **Н. Пан**

Өзгерістер енгізу туралы мәліметтер осы патентке қосымша түрінде жеке парақта келтіріледі

004025

KAZAKHSTAN PATENT

(19) **МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

(12) # ПАТЕНТ

(11) **№ 33095**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(54) **НАЗВАНИЕ:** Способ приготовления бивалентной инактивированной вакцины против репродуктивно-респираторного синдрома свиней европейского и североамериканского генотипов

(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):** Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ); Мамбеталиев Муратбай (KZ); Абдураимов Ергали Орынбасарович (KZ); Абсатова Жаркинай Серикбаевна (KZ); Табынов Кайрат Казыбаевич (KZ); Есимбекова Назым Бейсехановна (KZ); Килибаев Санат Серикович (KZ)

(21) **Заявка №** 2017/0128.1 (22) **Дата подачи заявки:** 16.02.2017

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан 25.08.2018.

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

Вице-министр юстиции Республики Казахстан **Н. Пан**

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

KAZAKPATENT

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) **KZ** (13) **B** (11) **33095**
(51) ***A61K 39/12*** (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ

(21) 2017/0128.1
(22) 16.02.2017
(45) 17.09.2018, бюл. №35
(72) Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Мамбеталиев Муратбай; Абдураимов Ергали Орынбасарович; Абсатова Жаркинай Серикбаевна; Табынов Кайрат Казыбаевич; Есимбекова Назым Бейсехановна; Килибаев Санат Серикович
(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан
(56) KZ 30640 A4, 15.12.2015
Нургазиев Р.З. и др. Подбор адъюванта бивалентной инактивированной вакцины против РРСС // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. 2016. №1 (37). с.118, 121, 123, 124
Комиссаров А.В. и др. Применение ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов // Проблемы особо опасных инфекций. 2015. №1. с.79-84
EA 013071 B1, 26.02.2010

(54) **СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ БИВАЛЕНТНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ ЕВРОПЕЙСКОГО И СЕВЕРОАМЕРИКАНСКОГО ГЕНОТИПОВ**

(57) Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии и биотехнологии и может быть использовано при разработке и изготовлении средств специфической профилактики репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) европейского и североамериканского генотипов.

В задачу создания настоящего изобретения входило: разработать высокоиммуногенную и безвредную бивалентную инактивированную вакцину против РРСС европейского и североамериканского генотипов на основе новых эпизоотически актуальных штаммов вируса, выделенного на территории Республики Казахстан, обладающих высокой биологической, антигенной активностью в нативном виде и иммуногенной - после инактивации и пригодного для изготовления инактивированного вакцинного препарата, создающего напряженный и длительный иммунитет у привитых животных против циркулирующих на территории республики эпизоотических изолятов вируса РРСС.

Сущность изобретения: способ приготовления включает культивирование штаммов вируса РРСС в перевиваемой культуре клеток MARC-145 2-х суточного возраста, выращенных в сосудах (1,5 дм^3) в стационарных условиях при температуре (37±0,5)°С в течение 72-96 час и сбор вирусной биомассы после 2-кратного замораживания (при минус 40°С) и оттаивания (при комнатной температуре) инфицированных клеток с соблюдением стерильных условий, очищение от балластных примесей (клеточного детрита) низкоскоростным центрифугированием, инактивацию вируссодержащей культуральной жидкости димерэтиленимином, 20-кратное концентрирование инактивированного вируса и добавление адъюванта - полиакрилового полимера Montanide Gel 01 ST. Технический результат от использования предлагаемого изобретения заключается в расширении арсенала бивалентных инактивированных вакцин против РРСС европейского и североамериканского генотипов, обладающих высокой иммуногенной активностью и безвредностью и создающих напряженный и длительный иммунитет у привитых животных против циркулирующих на территории Республики Казахстан эпизоотических изолятов вируса РРСС.

Приготовленный данным способом препарат сохраняет свои иммунобиологические свойства при температуре хранения (4±2)°С в течение 12 мес.

(19) KZ (13) B (11) 33095

Область техники

Предлагаемое изобретение относится к ветеринарной вирусологии и биотехнологии, в частности - к способу получения бивалентной инактивированной вакцины против репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) европейского и североамериканского генотипов.

Уровень техники

1. Известен способ изготовления эмульсионной инактивированной вакцины против РРСС, включающий получение антигенного материала из штамма CNCM №1-1102 гомологичного вируса, репродуцированного в чувствительной биологической системе, очистку антигенного материала от балластных примесей, инактивацию вируса, соединение антигенного материала с масляным адъювантом и последующий контроль целевого продукта (3). PCT №92/21375, A61K 39/12, G01N 33/569, C12N 7/00, 10.12.92 г.

2. Известен способ изготовления эмульсионной инактивированной вакцины против РРСС, включающий получение антигенного материала из штамма CNCM №1-1140 гомологичного вируса, репродуцированного в чувствительной биологической системе, очистку антигенного материала от балластных примесей, инактивацию вируса, соединение антигенного материала с масляным адъювантом и последующий контроль целевого продукта [PCT №93/07898, A61K 39/12, G01N 33/569, C12N 7/00, 29.04.93 г.].

3. Известен способ изготовления эмульсионной инактивированной вакцины против РРСС, включающий получение антигенного материала из штамма CNCM №1-1153 гомологичного вируса, репродуцированного в чувствительной биологической системе, очистку антигенного материала от балластных примесей, инактивацию вируса, соединение антигенного материала с масляным адъювантом и последующий контроль целевого продукта [Патент Франции №2682966, C12N 7/02, 04, 30.04.93 г.].

4. Известен способ изготовления эмульсионной инактивированной вакцины против РРСС, включающий получение антигенного материала из штамма CNCM №1-1387 или CNCM №1-1388 гомологичного вируса, репродуцированного в чувствительной биологической системе, очистку антигенного материала от балластных примесей, инактивацию вируса, соединение антигенного материала с масляным адъювантом и последующий контроль целевого продукта [EP 0676467, C12N 7/00, A61K 39/12, C12P 21/08, C07K 16/10, 11.10.95 г.].

5. Известен способ изготовления эмульсионной инактивированной вакцины против РРСС, включающий получение антигенного материала из штамма ATCC VR-2402 гомологичного вируса, репродуцированного в чувствительной биологической системе, очистку антигенного материала от балластных примесей, инактивацию вируса, соединение антигенного материала с масляным адъювантом и последующий контроль целевого продукта [Патент США №5587164, A61K 39/00, 39/12, 39/38, 39/193, 24.12.96 г.].

6. Известен способ изготовления эмульсионной инактивированной вакцины против РРСС, включающий получение антигенного материала из штамма ATCC VR-2509 гомологичного вируса, репродуцированного в чувствительной биологической системе, очистку антигенного материала от балластных примесей, инактивацию вируса, соединение антигенного материала с масляным адъювантом и последующий контроль целевого продукта [Патент США №5690940, C12N 15/38, 7/01, 25.11.97 г.].

7. Известен способ изготовления эмульсионной инактивированной вакцины против РРСС, включающий получение антигенного материала из штамма ATCC VR-2525 гомологичного вируса, репродуцированного в чувствительной биологической системе, очистку антигенного материала от балластных примесей, инактивацию вируса, соединение антигенного материала с масляным адъювантом и последующий контроль целевого продукта [Патент США №5866401, C12N 7/08, 7/01, 7/00, 7/02, 02.02.99 г.].

8. Известен способ изготовления эмульсионной инактивированной вакцины против РРСС, включающий получение антигенного материала из штамма ECACC V-93070108 гомологичного вируса, репродуцированного в чувствительной биологической системе, очистку антигенного материала от балластных примесей, инактивацию вируса, соединение антигенного материала с масляным адъювантом и последующий контроль целевого продукта [Патент Великобритании №2282811, C12N 15/40, A61K 39/12, C07K 14/18, C12N 7/02, 7/04, 19.04.95 г.].

9. Известен способ изготовления эмульсионной инактивированной вакцины против РРСС, включающий получение антигенного материала из штамма "БД" гомологичного вируса, репродуцированного в чувствительной биологической системе, очистку антигенного материала от балластных примесей, инактивацию вируса, соединение антигенного материала с масляным адъювантом и последующий контроль целевого продукта [МПК A61K 39/12, C12N 7/00 C12N 7/00, C12R 1:92].

10. Известен способ изготовления, ассоциированный эмульсионный инактивированной вакцины против РРСС и парвовирусной инфекции свиней (ПВИС). Вакцина содержит антигенный материал из штамма "БД-ДЕП" вируса РРСС, репродуцированного в перевиваемой культуре клеток Магс-145 и инактивированного аминоэтилэтиленимином (АЭЭИ), антигенный материал из штамма "Вл-94-ДЕП" возбудителя ПВИС, репродуцированного в перевиваемой культуре клеток ППК и инактивированного АЭЭИ, и масляный адъювант в эффективном соотношении. [МПК: A61K 39/295 A61K 39/23 A61K 39/12 C12N 7/00].

10. Известна статья Нургазиева Р.З., Абсатовой Ж.С., Табынова К.К. и др. Подбор адъюванта бивалентной инактивированной вакцины против РРСС. // Вестник Кыргызского-

национального аграрного университета им.К.И. Скрябина 2016.№1 (37). с.118-126. В указанной статье показаны предварительные результаты исследования, заявителей данного изобретения, о возможности применения адъюванта Montanide GEL 01ST в составе инактивированной бивалентной вакцины против РРСС. Согласно результатам исследования показано, что вакцина, содержащая в своем составе 20% адъюванта, вызывает детектируемый иммунологический ответ на 21 сут.

11. Известен способ изготовления инактивированной вакцины против РРСС, включающий получение антигенного материала из штамма «Artenvirus/LKZ/2010» гомологичного вируса с биологической активностью 4,50 lg ТЦД$_{50}$/см^3, выращенного в перевиваемой культуре клеток MARC-145 2-сут возраста с концентрацией клеток более 100 тыс. кл./мл, инактивацию вируса, соединение антигенного материала с адъювантом Montanide GEL и последующий контроль целевого продукта [МПК: C12N 7/00, C12N 7/04, A61K 39/12.] (прототип).

Наиболее близким предлагаемому изобретению по совокупности существенных признаков является способ изготовления инактивированной вакцины против РРСС, включающий получение антигенного материала из штамма «Arterivirus/LKZ/2010» гомологичного вируса РРСС, принадлежащего американскому генотипу, репродуцированного в перевиваемой культуре клеток MARC-145 2-сут возраста с концентрацией клеток более 100 тыс. кл./мл, инактивацию вируса, соединение антигенного материала с адъювантом Montanide GEL и последующий контроль целевого продукта.

Существенные недостатки известных способов, как и способа - прототипа, состоят в том, что при их осуществлении используют штаммы только одного генотипа вируса, который не защищает от заражения другим генотипом вируса РРСС. Наиболее значимый недостаток представленного метода прототипа заключается в длительности срока инактивации (30 час), тем самым разрушает целостность вириона, которая существенно влияет на полноценное формирование иммунитета у привитых животных, а также продлевает технологический цикл производства вакцины на 18 час.

Кроме того, эмульсионные инактивированные вакцины, полученные известными способами, за исключением прототипа, никогда не применялись на территории Республики Казахстан, поэтому их эффективность в отношении казахстанских изолятов вируса РРСС не изучалась.

Сущность изобретения

Задача: разработать способ приготовления иммуногенной и безвредной бивалентной инактивированной вакцины против РРСС европейского и североамериканского генотипов на основе эпизоотических актуальных штаммов вируса, выделенного на территории Республики Казахстан, обладающего высокой биологической, антигенной и иммуногенной активностью в нативном виде и после инактивации пригодного для изготовления инактивированного вакцинного препарата, создающего напряженный иммунитет у привитых животных против циркулирующих на территории республики изолятов вируса РРСС европейского и североамериканского генотипов.

Решение поставленной задачи достигается следующим образом: бивалентную инактивированную вакцину против РРСС европейского и североамериканского генотипов готовят из вирулентных штаммов «Arterivirus/LKZ/2010» североамериканского генотипа и «Kostanay-CM/08» европейского генотипа вируса РРСС, выращенного в перевиваемой культуре клеток MARC-145 2-сут возраста с концентрацией клеток более 100 тыс. кл./см^3. Вирулентные штаммы вируса считается пригодным для наработки вирусного сырья, если он соответствует следующим требованиям: титр инфекционности после репродукции в монослое клеток MARC-145 более 5,00 lg ТЦД$_{50}$/см^3 и при отсутствии контаминации. Для изготовления вакцины берут матрасы с культурой клеток емкостью 1,5 дм^3. После слива ростовой среды и однократного отмывания раствором Хенкса или питательной средой Игла в матрасы вносят вируссодержащие материалы матриксных серий. Адсорбцию вируса проводят при 37°С в течение часа. После этого в матрасы вносят среду Игла в объеме 150-200 см^3 с добавлением 5% фетальной сыворотки КРС с антибиотиками (гентамицин в концентрации 50 мкг/см^3 или его аналоги).

Культивирование ведут при 37°С в течение 72-96 час. Для контроля незаряженными оставляют 2 матраса, в которых заменяют среду и 2 матраса без замены среды. Размножение вируса в культуре клеток MARC-145 определяют по характеру ЦПД с образованием скопления шарообразных клеток, поднимающихся над монослоем. В контрольных матрасах не должно быть каких-либо деструктивных изменений клеток. Матрасы, в которых наблюдаются цитопатические изменения с поражением до 70% клеточного монослоя (обычно через 72-96 часов), отбирают и замораживают при минус 40°С. Вирус для изготовления вакцины получают 3-кратным замораживанием и оттаиванием инфицированных клеток с последующим сливом содержимого матрасов в одну емкость, соблюдая стерильные условия. Полученный вирус очищают от балластных примесей (клеточного детрита) центрифугированием при 1000 об/мин. в течение 20 мин.

Затем из емкости отбирают пробу для определения биологической активности. Производственная серия вируса РРСС считается пригодной, если она соответствует следующим требованиям: титр инфекционности после репродукции в монослое клеток MARC-145, по меньшей мере, 5,00 lg ТЦД$_{50}$/см^3 и при отсутствии контаминации.

Очищенную вируссодержащую суспензию обоих штаммов подвергают инактивации. Инактивацию наработанного вирусного сырья ведут с помощью 8% водного раствора (pH 7,6-7,8) димерэтиленимина (ДЭИ), вносимого в конечной концентрации 0,15 %. Инактивацию проводят при комнатной температуре

(22±2)°С в течение 12 час с периодическим перемешиванием. По окончании инактивации остаточное действие ДЭИ в суспензии нейтрализуют путем добавления 25% раствора тиосульфата натрия в конечной концентрации 0,25 %, затем суспензию охлаждают до 4-6°С и отбирают пробы антигена для проверки авирулентности. После проверки авирулентности полученной инактивированной суспензии проводят концентрацию антигенов штаммов методом фильтрации в тангенциальном потоке в ультрафильтрационной системе Pellicon производства компании «Millipore». Система состоит из камеры, содержащей фильтр, и перистальтического насоса. Камера включает пластины с рамками, которые собирают входящие жидкости и распределяют их в тангенциально-поточные трубки через параллельные слои мембран. Диаметр мембраны позволяют фильтровать белки молекулярной массой 200 кД. Этим методом достигается двадцатикратная концентрация антигена.

Вакцину готовят путем диспергирования смеси концентрированного антигенсодержащего материала и адъюванта, содержащего полиакриловый полимер. Из адъювантов используют препарат Montanide GEL 01 ST фирмы «Seppic» (Франция). Тип получаемой рецептуры «вода-полимер». Инактивированные антигены обеих генотипов объединяют в соотношении 1:1, затем добавляют адъювант в весовом соотношении 1:4 (на 25 г адъюванта 75 г антигена). Для получения стабильной рецептуры тщательно перемешивают вручную в сосуде путем взбалтывания в течение 5 мин. Готовую вакцину фасуют при помощи дозирующего устройства в стерильные стеклянные флаконы и контролируют в соответствии с техническими условиями.

Вакцину считают иммуногенной, если у трех подсвинков, привитых однократно в дозе 4 см^3, на 12 сут после первой вакцинации в сыворотке крови выявляют специфические антитела к вирусу РРСС у 90% иммунизированных животных в тестируемых значениях в ИФА (тест- системами BioNote, Корея или «ООО-ВЕТБИОХИМ», г, Москва, Россия), что позволяет быстрому созданию стадо животных с высоким иммунным статусом, а также купированию инфекции в очаге эпизоотии. Вакцину считают безвредной, если при подкожном введении цельной вакцины пяти белым мышам массой 18-21 г в объеме 0,5 см^3, она не вызывает заболевания или гибели лабораторных животных в течение 10 сут. На месте введения не должно быть никаких изменений подкожной клетчатки.

Вакцина представляет собой рецептуру от соломенного до светло- коричневого цвета жидкость с низкой вязкостью. При хранении допускается незначительное осаждение геля на дне сосуда. При встряхивании вакцина приобретает однородную гомогенную структуру.

Приготовленный данным способом препарат сохраняет свои иммунобиологические свойства при температуре хранения (4±2)°С в течение 12 мес (срок наблюдения).

Технический результат от использования предлагаемого изобретения заключается в расширении арсенала инактивированных вакцин против РРСС, обладающих высокой иммуногенной активностью и безвредностью и создающих напряженный иммунитет у привитых животных против циркулирующих на территории республики эпизоотических изолятов вируса РРСС европейского и североамериканского генотипов.

Достижение технического результата от использования предлагаемого способа объясняется тем, что при изготовлении бивалентной инактивированной вакцины против РРСС европейского и североамериканского генотипов используют антигенные материалы штамма европейского генотипа «Kostanay-CM/08» и штамма североамериканского генотипа «Arterivirus/LKZ/2010» вируса РРСС, обладающие с высокой биологической ((6,33±0,08) lg ТЦД$_{50}$/см^3 и (5,25±0,14) lg ТЦД$_{50}$/см^3), антигенной активностью в нативном виде и иммуногенной - после инактивации, обеспечивающие получению высокоиммуногенной и безвредной вакцины, создающей напряженный иммунитет у привитых свиней.

Дополнительный технический результат от использования предлагаемого способа достигается за счет сокращения срока инактивации путем повышения концентрации инактиванта, что значительно влияет на иммуногенность вакцины и производительность труда.

Дополнительный технический результат от использования предлагаемого способа достигается за счет того, что антигенные материалы концентрируют с помощью ультрафильтрации в тангенциальном потоке, что позволяет значительно повысить иммуногенность вакцины.

Дополнительный технический результат от использования предлагаемого изобретения в части повышения иммуногенной активности целевого продукта достигается за счет повышения соотношения адъюванта Montanide Gel 01 ST(Seppic, Франция) (до 25%) в составе вакцины.

Штаммы «Kostanay-CM/08» европейского генотипа и «Arterivirus/LKZ/2010» североамериканского генотипа депонированы в Коллекции микроорганизмов РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК под регистрационным номером М-2-12/Д и М-2-11/Д соответственно и запатентованы в НИИС МЮ РК.

Штаммы «Kostanay-CM/08» европейского генотипа и «Arterivirus/LKZ/2010» североамериканского генотипа являются безвредными и обладают высокой биологической и антигенной активностью в нативном виде и иммуногенной - после инактивации. Экспериментально подтверждена возможность их использования для изготовления вакцинных препаратов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ приготовления бивалентной инактивированной вакцины против репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) европейского и североамериканского генотипов, включающий культивирования штаммов вируса обеих генотипов в культуре клеток, получение вируссодержащей суспензии, очищенной от балластных примесей (клеточного детрита) низкоскоростным центрифугированием, инактивацию вируссодержащей культуральной жидкости димерэтиленимином, концентрирование инактивированного вируса и добавление адъюванта - полиакрилового полимера Montanide Gel 01 ST, ***отличающийся*** тем, что используют 2 эпизоотически актуальных штамма «Kostanay-CM/08» (европейского генотипа) и «Arterivirus/LKZ/2010» (североамериканского генотипа) вируса РРСС, антигены которых 20-кратно концентрированы с помощью ультрафильтрации в тангенциальном потоке, коротким периодом инактивации (12 час) штаммов вируса

Верстка А. Сарсекеева
Корректор Б. Омарова