

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ



ӨНЕРТАБЫСҚА  
ПАТЕНТ

АСТАНА



(19) **ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ**

## **ӨНЕРТАБЫСҚА**

(11) **№ 23741**

(12) **ПАТЕНТ**

(54) **АТАУЫ:** А/Н1N1 тұмауына қарсы инактивтендірілген тұтасвирионды алюминийгидроқышқылдық вакцинасын алу тәсілі

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

(72) **АВТОР (АВТОРЛАР):** Мамадалиев Сейдигапбар Мамадалиевич; Кыдырбаев Жайлаубай Кыдырбаевич; Хайруллин Берик Мухитович; Сандыбаев Нурлан Тимамбаевич; Табынов Кайсар Казыбаевич; Червякова Ольга Викторовна; Рыскельдинова Шолпан Жанбырбаевна; Асанжанова Нурика Нарынбековна; Кожамкулов Еркен Муратханович; Инкарбеков Дулат Амангелдиевич; Мамбеталиев Муратбай; Табынов Кайрат Казыбаевич

(21) **№ Өтінім** 2010/0349.1

(22) **Өтінім берілген күн** 27.03.2010

Патенттің күші Қазақстан Республикасының бүкіл аумағында, оны күшінде ұстау үшін ақы уақтылы төленген жағдайда сақталады.

Қазақстан Республикасы  
Әділет министрінің орынбасары

Э. Әзімова

Өзгерістер енгізу туралы мәліметтер осы патентке қосымша түрінде жеке паракта келтіріледі

001453



(19) **МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

(12) **ПАТЕНТ**

(11) **№ 23741**

**НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(54) **НАЗВАНИЕ:** Способ получения инактивированной цельновиральной гидроокисьалюминиевой вакцины против гриппа А/Н1N1

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

(72) **АВТОР (АВТОРЫ):** Мамадалиев Сейдигалбар Мамадалиевич; Кыдырбаев Жайлаубай Кыдырбаевич; Хайруллин Берик Мухитович; Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич; Табынов Кайсар Казыбаевич; Червякова Ольга Викторовна; Рыскельдинова Шолпан Жанбырбаевна; Асанжанова Нурика Нарынбековна; Кожамкулов Еркен Муратханович; Инкарбеков Дулат Амангелдиевич; Мамбеталиев Муратбай; Табынов Кайрат Казыбаевич

(21) Заявка № 2010/0349.1

(22) Дата подачи заявки 27.03.2010

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) 23741  
(51) A61K 39/145 (2006.01)  
C12N 7/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2010/0349.1

(22) 27.03.2010

(45) 15.10.2015, бюл. №10

(64) A4 (KZ) №23741, бюл. №3, 15.03.2011

(72) Мамадалиев Сейдигапбар Мамадалиевич;  
Кыдырбаев Жайлаубай Кыдырбаевич; Хайруллин  
Берик Мухитович; Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич;  
Тыбынов Кайсар Кызыбаевич; Червякова Ольга  
Викторовна; Рыскельдинова Шолпан  
Жанбырбаевна; Асанжанова Нурика Нарынбековна;  
Колжамкулов Еркен Муратханович; Инкарбеков  
Дулат Амангелдиевич; Мамбеталиев Муратбай;  
Тыбынов Кайрат Кызыбаевич

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

(56) Johansen K., Nicoll A., Ciancio B.C., Kramarz P.  
Pandemic influenza A(H1N1) 2009 vaccines in the  
European Union // Euro Surveill, 2009. Vol.14(41).  
Pp.19361-68

US 4338296 A, 06.07.1982

SU 1822791 A1, 23.06.1993

RU 2099086 C1, 20.12.1997

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ  
ИНАКТИВИРОВАННОЙ  
ЦЕЛЬНОВИРИОННОЙ  
ГИДРООКИСЬАЛЮМИНИЕВОЙ ВАКЦИНЫ  
ПРОТИВ ГРИППА А/Н1Н1

(57) Способ получения инаktivированной  
цельновирioнной гидроокисьюалюминиевой вакцины  
против гриппа А/Н1Н1.

Изобретение относится к медицинской  
биотехнологии и представляет собой способ  
получения инаktivированной цельновирioнной  
гидроокисьюалюминиевой вакцины против гриппа  
А/Н1Н1 из рекомбинантного штамма NIBRG-121xp,  
полученного методом обратной генетики в  
Национальном институте биологических стандартов  
и контроля (NIBSC, Великобритания) и  
представленного по линии Всемирной организации  
здравоохранения НИИПББ НЦБ КН МОН РК для  
разработки пандемической вакцины.

Предлагается способ получения  
инаktivированной цельновирioнной  
гидроокисьюалюминиевой вакцины против гриппа  
А/Н1Н1 на основе рекомбинантного штамма  
NIBRG-121xp, где вирус культивируется в 10-11-  
суточных куриных эмбрионах, инаktivируется  
формалином по оптимальному режиму, очищается и  
концентрируется при помощи хроматографических  
и фильтрационных методов и добавляется  
адьювант- гидроокись алюминия. Полученная  
вакцина представляет собой прозрачную жидкость с  
рыхлым осадком, легко разбивающимся при  
встряхивании.

Вакцина инаktivированная цельновирioнная  
гидроокисьюалюминиевая против гриппа А/Н1Н1,  
изготовленная по предложенному способу, не  
обладает токсичностью для лабораторных  
животных, высокоиммуногенна и протективна при  
двукратном применении.

иятие на  
М  
и науки

рбаев  
н

а;  
беталиев

и 27.03.2010

азахстан при

Э. Азимова

ящему патенту

Изобретение относится к медицинской биотехнологии и представляет собой способ получения инактивированной цельновирионной гидроокисьалюминиевой вакцины против гриппа A/H1N1 из рекомбинантного штамма NIBRG-121xp, полученного методом обратной генетики в Национальном институте биологических стандартов и контроля (NIBSC, Великобритания) и представленного по линии Всемирной организации здравоохранения НИИПББ НЦБ КН МОН РК для разработки пандемической вакцины.

Известен способ получения пандемической вакцины «Celvapan» (Baxter, Чешская Республика/Австрия) инактивированной цельновирионной против гриппа A/H1N1 из вируса дикого типа A/California/7/2009 (H1N1)v, где вирусная биомасса нарабатывается в перевиваемой линии клеток Vero (клетки почки зеленой мартышки), далее инактивируется формалином в конечной концентрации 0,05%, температуре и pH реакционной среды 37°C и 7,0-7,6, соответственно, в течение 3 суток, с последующим ультрафиолетовым облучением. После чего инактивированная вирусная суспензия подвергается очистке и концентрированию посредством ультрацентрифугирования на линейном градиенте сахарозы 10-50%, ультра/дифiltrации и стерилизации через фильтры диаметром пор 0,22 мкм. Полученный очищенный концентрат в зависимости от весового содержания гемагглютинина (реакция одиночной радиальной иммунодиффузии) разводится буферным солевым раствором (БСР, pH-7,2) со стабилизатором до вакцинных параметров. Адьювант и консервирующее вещество в вакцину не добавляют.

Приготовленная вышеизложенным способом вакцина с содержанием гемагглютинина 2 мкг/0,2 мл у двукратно подкожно привитых мышей, интервалом в 21 день, формирует иммунитет напряженностью титров антител в РТГА с гомологичным антигеном 1:145. [Kistner O., Howard K., Spruth M. et al. Cell culture (Vero) derived whole virus (H5N1) vaccine based on wild-type virus strain induces cross-protective immune responses // Vaccine. - 2007. - Vol. 25(32). - P. 6028-6036].

Наиболее значимый недостаток представленного способа заключается в использовании патогенного для людей производственного вируса, требующего соблюдения максимального уровня биологической безопасности на производстве, сложного процесса инактивации вируса и отсутствия в препарате адьюванта, необходимого для формирования быстрого и продолжительного иммунитета у привитых людей в период пандемии.

Существуют также способ получения пандемической вакцины «Fluval P» (Omninvest, Венгрия), инактивированной цельновирионной сорбированной против гриппа A/H1N1 из рекомбинантного штамма NIBRG-121xp, полученного в Национальном институте биологических стандартов и контроля (NIBSC, Великобритания) методом обратной генетики из эпидемического вируса A/California/7/2009 (H1N1) и

высокорепродуктивного штамма A/PR/8/34 (H1N1). Согласно указанному способу вирусная суспензия нарабатывается в 10-11-суточных куриных эмбрионах, очищается и концентрируется посредством осветления через картонные фильтры, ультрацентрифугирования на линейном градиенте сахарозы и стерилизующей фильтрации на мембранных фильтрах диаметром пор 0,22 мкм. Полученный очищенный концентрат инактивируется формалином в конечной концентрации 0,025%, при температуре и pH реакционной среды 4°C и 7,0-7,6, соответственно, в течение 7 суток. Далее инактивированный вирусный концентрат разводится в зависимости от весового содержания гемагглютинина (SDS-PAGE) буферным солевым раствором (БСР, pH-7,2) до вакцинных параметров, объединяется с раствором фосфата алюминия, таким образом, чтобы концентрация ионов алюминия ( $Al^{+3}$ ) в препарате составляла 0,33 мг/0,5 мл и перемешивается для сорбции при 4-6°C в течение часа. В качестве консервирующего вещества в вакцину вносится тиомерсал (мертиолят) из расчета 0,1 мг/мл.

Приготовленная по вышеизложенному способу вакцина с содержанием гемагглютинина 2,5 мкг/0,2 мл у двукратно подкожно привитых мышей, с интервалом в 21 день, формирует иммунитет напряженностью титров антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с гомологичным антигеном 1:460 [Johansen K., Nicoll A., Ciancio B.C., Kramarz P. Pandemic influenza A(H1N1) 2009 vaccines in the European Union // Eur. Surveill. - 2009. - Vol. 14 (41). - P. 19361-68].

Существенным недостатком способа является низкая производительность использованного метода очистки и концентрирования вируса и не совершенность метода сорбции.

Предлагаемый способ получения инактивированной цельновирионной гидроокисьалюминиевой вакцины против гриппа A/H1N1 основан на использовании рекомбинантного штамма NIBRG-121xp, полученного методом обратной генетики в NIBSC (Великобритания) и эпидемического штамма A/California/07/2009 (H1N1) и высокопродуктивного штамма донора A/PR/8/34 (H1N1) и представленного по линии ВОЗ НИИПББ НЦБ КН МОН РК для разработки пандемической вакцины.

Сущность способа заключается в том, что рекомбинантный штамм NIBRG-121xp культивируется в 10-11-суточных куриных эмбрионах при 34°C в течение 72 часов, нарабатанная вирусная суспензия осветляется через 8-слойные марлевые фильтры, инактивируется формалином в конечной концентрации 0,05% вначале при 4±2°C в течение 60 часов, далее при 37±1°C в течение 12 часов, соблюдая режим постоянного перемешивания. Очистка концентрирование инактивированной вирусной суспензии проводится поэтапно, вначале осветляется через мембранные фильтры диаметром пор 0,45 мкм, далее концентрируется ультрафильтрационной установкой Milli-po

PR/8/34 (H1N1) суспензия куриных эритроцитов концентрируется на ультрафильтры с пором 0,22 мкм. Концентрат в конечной температуре и pH соответственно, в вирусный раствор (GE) буферным раствором фосфата концентрация составляет сорбции при 4-сервирование (мертиолят) кному способу гемагглютинина можно привить, формирует в антител в (РТГА) с [Johansen K. epidemic influenza Union // Euro 1-68].

способ является анного метода вируса и не

получения ультровирионной против гриппа рекомбинантного го методом (Британия) из 7/2009 (H1N1) ра A/PR/8/34 ВОЗ НИИПББ пандемической

в том, что NIBRG-121хр их куриных 72 часов, етляется через нативируется рации 0,05%, ов, далее при людая режим Очистка и ой вирусной о, вначале фильтры с нтрируется на Milli-pore

Millipore cassette system (Франция) и диализе против ультрафильтрации буфера [1,0 М натрий хлористый; 0,01 М ФБР pH 7,4; 0,001 М ЭДТА] и 6 объемов буфера [0,5 М натрий хлористый; 0,01 М ФБР pH 7,4; 0,001 М ЭДТА]. Полученный вирусный концентрат дополнительно очищается с помощью ультрафильтрации на колонках с сефарозой CL-6B, после чего стерилизуется через каскад мембранных фильтров с диаметром пор AP 20 - 0,45 мкм - 0,22 мкм. Далее очищенный вирусный концентрат в исходном или разведенном до вакцинных параметров виде, объединяют в асептических условиях с раствором гидроокиси алюминия (содержание ионов  $Al^{+3}$  2 мг/мл) в соотношении 1:1, перемешивают лабораторным гомогенизатором T25 Basic ULTRA-TURRAX, IKA (Германия) в течение 3 мин при 3000 об/мин. Полученную смесь, после гомогенизации переливают в специальные стаканы и инкубируют при температуре  $6 \pm 2^\circ C$  в течение 24 ч при постоянном перемешивании (60-80 об/мин) с помощью спиннера «Techné» (Франция). После окончания срока инкубации смесь фасуют во флаконы нужного объема и контролируют качество по соответствию нормативному документу. Полнота сорбции антигена на гидроокиси алюминия при соблюдении указанного режима составления превышает 99%.

Приготовленная по предлагаемому способу вакцина с содержанием гемагглютинина 15 мг/0,2 мл при двукратной внутрибрюшинной вакцинации мышей с интервалом 7 суток, формирует у них иммунитет напряженностью 1:425 в РТГА. При контрольном заражении (интраназально под легким эфирным наркозом) вакцинированных мышей эпидемическим вирусом A/California/07/2009 (H1N1), адаптированного мышам, в дозе 15  $LD_{50}/0,03$  все животные оставались живыми и не проявляли признаков какой-либо болезни в течение 14-дневного срока наблюдения.

Предлагаемый способ отличается от аналогов, в том числе прототипа тем, что в технологии

изготовления вакцины применяются оптимальные режимы формалиновой инактивации вируса, составления вакцины, комбинированная схема очистки и концентрирования вируса посредством хроматографических и фильтрационных методов.

Изобретение выполнимо в условиях научно-производственных объединений при наличии рекомбинантного штамма NIBRG-121хр вируса гриппа, соответствующего технологического оборудования и соблюдения предлагаемого режима приготовления вакцины.

Эффективность и воспроизводимость предлагаемого способа получения инактивированной цельновирионной гидроокисьюалюминиевой вакцины против гриппа A/H1N1 из рекомбинантного штамма NIBRG-121хр вируса гриппа подтверждена при приготовлении трех производственно-экспериментальных серий этого препарата в НИИПББ НЦБ КН МОН РК, в последующем прошедших с положительными результатами доклинические испытания специфической активности и безопасности в РГП «Национальный центр экспертизы лекарственных средств», г. Алматы, Республика Казахстан и Научно-исследовательском институте гриппа СЗО РАМН РФ, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения инактивированной цельновирионной гидроокисьюалюминиевой вакцины против гриппа A/H1N1, включающий культивирование вируса в куриных эмбрионах, химическую инактивацию, комбинированную схему очистки и концентрирования вируса и добавление адъюванта-гидроокиси алюминия, отличающийся тем, что используют рекомбинантный штамм NIBRG-121хр вируса гриппа, инактивируемый формалином по оптимальному режиму в нативном виде, очищают и концентрируют в соответствии со схемой: осветление, ультра/диафильтрация, гельфильтрация и стерилизующая фильтрация.