

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ



ӨНЕРТАБЫСҚА
ПАТЕНТ

АСТАНА



(19) **ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ**

ӨНЕРТАБЫСҚА

(11) **№ 32717**

(12) **ПАТЕНТ**

(54) **АТАУЫ:** Тұмау вирусы векторлары негізінде дайындалған ауылшаруашылық малдарға арналған бруцеллезге қарсы вакцинаны 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):** Табынов Кайсар Казыбаевич (KZ); Рыскельдинова Шолпан Жанбырбаевна (KZ); Еспембетов Болат Аманбаевич (KZ); Зинина Надежда Николаевна (KZ); Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ)

(21) **Өтінім №** 2016/0879.1

(22) **Өтінім берілген күн:** 06.10.2016

26.02.2018 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

003951



(19)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

(12)

ПАТЕНТ

(11)

№ 32717

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(54) **НАЗВАНИЕ:** Способ получения противобруцеллезной вакцины для сельскохозяйственных животных на основе гриппозных вирусных векторов

(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):** Табынов Кайсар Казыбаевич (KZ); Рыскельдинова Шолпан Жанбырбаевна (KZ); Еспембетов Болат Аманбаевич (KZ); Зинина Надежда Николаевна (KZ); Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ)

(21) Заявка № 2016/0879.1

(22) Дата подачи заявки: 06.10.2016

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан 26.02.2018.

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



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 32717

(51) C12N 7/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2016/0879.1

(22) 06.10.2016

(45) 26.03.2018, бюл. №12

(72) Табынов Кайсар Казыбаевич; Рыскельдинова Шолпан Жанбырбаевна; Еспембетов Болат Аманбаевич; Зинина Надежда Николаевна; Сансызбай Абылай Рысбайұлы

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

(56) Рыскельдинова Ш.Ж. и др. Условия культивирования гриппозных векторов, экспрессирующих бруцеллезные иммунодоминантные белки omp16 или 17/112, в куриных эмбрионах // Изденістер, нәтижелер. Исследования, результаты. 2014.

URL: <https://articlekz.com/article/12631>

Спиридонов А.Н. и др. Оценка эффективности адъювантов фирмы «SEPPIC» в составе инактивированной вакцины против Ньюкаслской болезни для голубей // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. 2012. Т.10. №1. с.78-86

KZ 28457 A4, 15.05.2014

KZ 25306 A4, 20.12.2011

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВОБРУЦЕЛЛЕЗНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ ГРИППОЗНЫХ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

(57) Изобретение относится к области биотехнологии, ветеринарии и медицины, и представляет собой способ получения новой

противобруцеллезной вакцины для сельскохозяйственных животных на основе гриппозных вирусных векторов. Сущность изобретения состоит в том, что для получения противобруцеллезной вакцины используются гриппозные вирусные векторы типа А субтипов H5N1 или H1N1, экспрессирующие бруцеллезные иммунодоминантные белки L7/L12 или Omp16, которые согласно оптимальным условиям культивирования нарабатываются в системе куриных эмбрионов, стабилизируются определенным комплексом защитных сред и подвергаются сублимационной сушке. В качестве растворителя вакцины используется 10-20%-раствор коммерческого адъюванта Montanide Gel01 (Seppic, Франция). Полученная таким образом вакцина полностью безопасна для КРС, в том числе беременных; формирует у них гуморальный и Т-клеточный иммунные ответы; обеспечивает полную защиту 70-80% КРС от В. abortus 544 инфекции, а также защиту 80-90% стельных первотелок или коров от абортос; обеспечивает продолжительную защиту КРС от В. abortus инфекции на протяжении не менее 12 месяцев после бустерной вакцинации; обеспечивает хорошую перекрестную защиту от В. melitensis инфекции у вакцинированных стельных телок. У овец и коз вакцина формирует выраженный антиген - специфичный Т-клеточный иммунный ответ; у 57,1% овец и 42,9% коз обеспечивает полную защиту от В. melitensis 16М инфекции. Использование вакцины как на КРС, так и на МРС позволяет эффективно дифференцировать вакцинированных животных от инфицированных бруцеллезом животных.

(19) KZ (13) B (11) 32717

Изобретение относится к области биотехнологии, ветеринарии и медицины, и представляет собой способ получения новой противобруцеллезной вакцины для сельскохозяйственных животных на основе гриппозных вирусных векторов.

Известен способ получения векторной противобруцеллезной вакцины на основе аттенуированного штамма X4072 *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium*, способного экспрессировать бруцеллезные рибосомальные белки L7/L12 и BLS (люмазин фермент синтазы) *in vivo* у мышей при пероральном способе иммунизации. Иммунизация этой вакциной способствовало формированию у мышей специфичного к бруцеллезу мукозального и Th1 клеточного иммунного ответов. По показателю степени защиты (протективность) от вирулентного штамма *B. abortus* 544 векторная вакцина, основанная на штамме X4072 *Salmonella enterica*, была сопоставима с субъединичной (рекомбинантные белки BLS-L7/L12) и ДНК-вакциной (pVAX1-BLS-L7/L12), однако значительно уступала живой аттенуированной противобруцеллезной вакцине из штамма *B. abortus* 104M, что и является ее основным недостатком [Vaccine. 2009, 27:5214-5219].

Наиболее близким к заявляемому изобретению по совокупности существенных признаков (прототипом) является способ получения векторной противобруцеллезной вакцины на основе рекомбинантного вируса Semliki

Forest (название национального парка в Уганде), экспрессирующего белки *B. abortus* Cu-Zn супероксиддисутазу (Cu-Zn SOD) или фактора инициации трансляции 3 (TIF3) *in vivo* у мышей при внутривентральном способе введения. Указанная вакцина несмотря на дефектность репликационного механизма вектора обладает инфекционностью для широкого спектра хозяев; у иммунизированных мышей формирует ярко выраженный Th1 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточный противобруцеллезные иммунные ответы. Использование этой векторной вакцины с указанными бруцеллезными вставками обеспечивает защиту мышей при их контрольном заражении *B. abortus* S2308, которая была сопоставима с таковой живой вакциной из штамма RB51 [Infection and Immunity. 2005, 73(6):3294–3300; Immunobiology. 2009, 214(6): 467-474]. Недостатком данного вектора является то, что сведения о безопасности этого вируса для сельскохозяйственных животных недостаточны, и данное обстоятельство может послужить основанием для ограничения вакцинации против бруцеллеза с использованием этого вектора.

Сущность изобретения состоит в том, что для получения противобруцеллезной вакцины используются гриппозные вирусные векторы типа А субтипов H5N1 или H1N1, экспрессирующие бруцеллезные иммунодоминантные белки L7/L12 или Omp16, которые согласно оптимальным условиям культивирования нарабатываются в системе куриных эмбрионов, стабилизируются определенным комплексом защитных сред и подвергаются сублимационной сушке. В качестве растворителя вакцины используется 10-20%-раствор коммерческого адьюванта Montanide Gel01 (Seppic, Франция).

Бруцеллез - зоонозное заболевание, вызываемое бактериями из рода *Brucella* [Vet Q. 2000, 22(3):123–130]. Бруцеллез редко приводит к смерти человека, но он может представлять значительный экономический ущерб для владельцев домашних животных из-за потери приплода, снижению надоев и бесплодия [J Comp Pathol. 2009, 140(2–3):149–157].

Род *Brucella* включает в себя, по меньшей мере, десять видов (spp.): *B.*

melitensis, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. cetacea*, *B. pinnipedia*, *B. microti*, *B. inopinata* [Int J Microbiol. 2010, 2010:1–12]. Классификация видов *Brucella* в основном базируется на предпочитаемых хозяевах (вид животного), хотя в генетическом отношении все они более чем на 94% идентичны между собой [Infect Immun. 2005, 73(12):8353–8361]. Среди всех видов *Brucella* наибольшей патогенностью для человека обладает *B. melitensis* [Emerg Infect Dis. 1997, 3(2):213–221], хотя наиболее распространенным видом *Brucella*, инфицирующим человека является *B. abortus* [Vet Res. 2004, 35(1):1–38.].

Вакцинация животных против бруцеллеза является одной из наиболее экономически эффективных мер по защите здоровья людей в эндемичных районах [Emerg Infect Dis. 2007, 13: 527–531], а также важнейшим инструментом в искоренении заболевания среди сельскохозяйственных животных [Vet Res. 1998, 29: 255–274]. В настоящее время специфическую профилактику бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных проводят с использованием живых аттенуированных бактериальных вакцин из штаммов *B. abortus* S19, RB 51 (для крупного рогатого скота, КРС), *B. melitensis* Rev. 1 (для мелкого рогатого скота, МРС), *B. suis* S2 (для свиней). Известно, что данные вакцины имеют высокую эффективность (защита от абортосов >70%, защита от инфекции >65%) [Vet Microbiol. 1985, 10(6):561–575; Am J Vet Res. 1996, 57(8):1153–1156; J Comp Pathol. 1966, 76(3):241–253; Vaccine. 1986, 4(4):212–216], что дало возможность для их широкомасштабного практического применения во многих регионах мира. Но вместе с тем эти вакцины также обладают и рядом серьезных недостатков, связанных с их абортосогенностью, вирулентностью для людей, а также выраженным агглютиногенным свойством (не касается штамма RB 51), что препятствует последующей дифференциальной диагностике [Crit Rev Microbiol. 1990, 17(3):209–230]. Кроме того, штаммы Rev. 1 и RB 51 устойчивы к таким антибиотикам как стрептомицин и рифампицин, соответственно, которые используются для лечения этой болезни [Infect Immun. 2005, 73(7):4198–

4204].

Таким образом, вследствие наличия серьезных недостатков существующих коммерческих противобруцеллезных вакцин для сельскохозяйственных животных, вопросы разработки безопасной и эффективной противобруцеллезной вакцины на сегодня являются актуальной проблемой.

На основании вышеизложенного, в основу настоящего изобретения положена задача получения новой векторной вакцины против бруцеллеза сельскохозяйственных животных, которая должна обладать следующими свойствами:

- не вызывать аборт у беременных животных;
- не повышать температуру тела у привитых животных;
- не секретировать через молоко вакцинированных животных;
- не представлять угрозы для здоровья людей;
- позволять дифференцировать вакцинированных животных от инфицированных бруцеллезом животных;
- обладать эффективностью сопоставимой с коммерческими противобруцеллезными вакцинами (*B. abortus* S19, RB 51, Rev.1 и др.), или более.

Данная задача была решена с помощью новой стратегии в разработке безопасных и эффективных вакцин - использования живых генетически модифицированных векторов (непатогенные микроорганизмы), продуцирующих бруцеллезные антигены. Для этого методом обратной генетики сконструированы новые рекомбинантные вирусы гриппа А (гриппозные векторы) субтипов H5N1 и H1N1, содержащие генетические последовательности вставок бруцеллезных белков L7/L12 (рибосомальный) или Omp16 (поверхностный мембранный) в *NSI* гене, экспрессия которых происходит *in vivo*.

Вирус гриппа А содержит сегментированный геном, состоящий из восьми отрицательных одноцепочных фрагментов РНК. Среди них самый

маленький фрагмент (NS), кодирующий два белка (NS1 и Np), является наиболее перспективным для генетических манипуляций мишенью при конструировании гриппозных векторов. Кроме того, NS1 является единственным неструктурным белком вируса гриппа, способным нести чужеродные последовательности, превышающие его собственную длину [Virology 2004, 324:67–73]. Поэтому в качестве мишени для вставки бруцеллезных конструкций использовался ген NS1 вируса гриппа А.

Для получения рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные иммунодоминантные белки с открытой рамки считывания NS1 белка, в качестве исходного штамма был выбран A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) с модифицированным по длине геном NS1 (NS1-124), кодирующим 124 аминокислот N-терминальной области белка. Предыдущими исследованиями [J Virol. 2001, 75: 8899–8908] было показано, что наибольшую стимуляцию CD8⁺T - клеточного иммунного ответа у животных можно достичь при двукратном режиме иммунизации с двумя разными субтипами вируса гриппа. Поэтому при конструировании рекомбинантных штаммов вируса гриппа А поверхностные гены гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) были получены от штамма A/chicken/Astana/6/05 (H5N1) и сезонного штамма A/New Caledonia/20/99 (H1N1).

Основанием для выбора вирусов гриппа А в качестве вектора вакцины послужили многочисленные данные [J Infect Dis. 1977, 135: 678–680; Vet Rec. 1998, 143: 637–638; Vet Rec. 1999, 145: 556–557; Vet Rec. 2002, 150: 201–204; Vet J. 2008, 178(1): 98–102; Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1984, 45:445–62; Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 2009, 28:137–159; Vaccine. 2007, 25(47):7999–8009], подтверждающие способность вирусов гриппа инфицировать КРС, МРС и свиней, вызывать у них серологическую реакцию и в некоторых случаях клиническое проявление болезни. Следовательно, выбранные в качестве вектора аттенуированные вирусы гриппа А предположительно должны инфицировать этих животных и экспрессировать

необходимые бруцеллезные вставки. Тем более, что поверхностные белки НА (модифицированный по сайту расщепления) и NA у двух вирусных конструкций заимствованы от высокопатогенного вируса гриппа птиц субтипа H5N1, который по многочисленным литературным данным обладает широким видовым спектром хозяев [Virol J. 2009, 6: 39; J Virol. 2006, 80(15): 7469–7480; J Virol. 2011, 85(19): 10117–10125]. Возможность использования вируса гриппа А в качестве эффективного вектора с открытой рамкой считывания в гене NS1 было показано в предыдущих исследованиях [Clin Vaccine Immunol. 2006, 13(8): 898-904] при разработке противотуберкулезной вакцины. Для того чтобы добиться максимальной экспрессии бруцеллезных белков *in vivo* и вместе с тем повышенного Т-клеточного иммунного ответа, согласно предыдущим исследованиям [J Virol. 2001, 75: 8899–8908], иммунизацию животных проводили в режиме двукратной вакцинации с использованием вирусных конструкций с субтипами H5N1 (прайм вакцинация) и H1N1 (бустерная вакцинация). Данная схема иммунизации позволяет эффективно преодолевать иммунный фон, сформированный к вирусному вектору при прайм вакцинации, и тем самым способствует хорошей репродукции вирусных конструкций после бустерной вакцинации с экспрессией бруцеллезных вставок.

Техническим результатом является то, что противобруцеллезная вакцина на основе гриппозных вирусных векторов в комплексе с 10-20% адъювантом Montanide Gel01 при двукратном (прайм и бустерная вакцинация) подкожном или конъюнктивальном введении с интервалом 21-28 суток полностью безопасна для КРС [Journal of Vaccines and Immunology. 2014. 1:101], в том числе беременных [Ciência Rural. 2016. 46(1):114-118]; формирует у них гуморальный и Т клеточный иммунные ответы [Vaccine. 2014. 32(18): 2034-41]; полную защиту 70-80% КРС от *B. abortus* 544 инфекции, а также защиту 80-90% стельных первотелок или коров от абортов [Vaccine. 2014. 32(45):5889-92]. При использовании конкурентного (одновременно) конъюнктивального и подкожного способов иммунизации

уровень защиты от *B. abortus* 544 инфекции у стельных КРС достигает 88,8%, а у их плодов 100%, при этом уровень защиты от абортос составляет 100%, тем самым эффективность разработанной вакцины несколько превышает таковые коммерческой вакцины *B. abortus* S19 [Vaccine. 2016. 34:5049-5052]. Впечатляющим является то, что векторная противобруцеллезная вакцина на основе гриппозных вирусных векторов обеспечивает продолжительную защиту КРС от *B. abortus* инфекции на протяжении не менее 12 месяцев после бустерной вакцинации [Vaccine. 2016. 34:438-444]. Кроме того, разработанная вакцина обеспечивает хорошую перекрестную защиту от *B. melitensis* инфекции у вакцинированных стельных телок [Vaccine. 2015. 33(31):3619-23]. Это свойство вакцины важно тем, что *B. melitensis* может распространяться и вызвать заболевание в стадах КРС при неправильном совместном содержании с другими видами животных, в частности с овцами и козами. Обнадёживающие результаты получены при испытании разработанной вакцины на овцах и козах. Результаты клинического наблюдения и термометрии показали, что вакцина безопасна для овец и коз. У обоих видов животных был сформирован выраженный антиген - специфичный Т-клеточный иммунный ответ; у 57,1 % овец и 42,9 % коз отмечена полная защита от *B. melitensis* 16М инфекции. Использование вакцины как на КРС, так и на МРС во всех случаях позволяло с помощью рекомендуемых МЭБ серологических тестов (РА, РБП, РСК, ИФА) эффективно дифференцировать вакцинированных животных от инфицированных.

Признаками, характеризующими изобретение, совокупность которых обеспечивает получение технического результата, являются:

1) вакцина готовится на основе рекомбинантных штаммов (гриппозные вирусные векторы) вируса гриппа А субтипов H5N1 (Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1 и Flu-NS1-124-Omp16-H5N1, депонированы в Коллекции микроорганизмов НИИПББ КН МОН РК под номерами М-4-13/D и М-5-

13/D, соответственно) или H1N1 (Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1 и Flu-NS1-124-Omp16-H1N1, депонированы в Коллекции микроорганизмов НИИПББ КН МОН РК под номерами М-6-13/D и М-7-13/D, соответственно), экспрессирующих бруцеллезные иммунодоминантные белки L7/L12 или Omp16;

2) маточные и рабочие расплодки, а также производственные серии гриппозных вирусных векторов получают методом предельных разведений на куриных эмбрионах;

3) гриппозные вирусные векторы культивируются по отдельности в 9-11 суточных куриных эмбрионах при температуре 34 ± 0.5 °C в течение 48 часов;

4) суспензии гриппозных вирусных векторов с одинаковыми субтипами (H5N1 или H1N1) в равных объемах или в зависимости от титра инфекционной активности объединяются в один пул (смесь);

5) к смеси гриппозных вирусных векторов в соотношении 1:1 добавляется комплексная стабилизирующая среда для получения вакцинной жидкости («Вакцина 1» - субтип H5N1; «Вакцина 2» - субтип H1N1);

6) в качестве комплексной стабилизирующей среды используется смесь 6%-ного пептона и 3%-ной сахарозы в конечной концентрации;

7) вакцинные жидкости расфасовывают по 1-10 мл в ампулы или флаконы для последующей сублимационной сушки;

8) сублимационная сушка вакцинной жидкости проводится в следующих условиях: предварительное замораживание при температуре не выше минус 45 °C; значение вакуума в период сублимации и досушивания в пределах 4-7 Па (40-100 мкм рт. ст.); сушка при температуре конденсатора не выше минус 52 °C; температура обогрева полок не выше плюс 40 °C; поддержка конечной температуры материала при 20-22 °C в течение 10-12 часов. Ампулы с высушенной вакцинной жидкостью запаиваются на карусельно-коллекторном аппарате при остаточном давлении 25-30 Па, а флаконы герметично укупоривают резиновыми пробками и закатывают алюминиевыми колпачками;

9) перед применением сухую вакцину разводят растворителем, содержащим 10-20%-ный адъювант Montanide Gel 01;

10) вакцину применяют двукратно сначала «Вакциной 1» (прайм вакцинация), а затем через 21-28 суток «Вакциной 2» (бустерная вакцинация);

11) способ и доза введения вакцины для животных в благополучных по бруцеллезу хозяйствах: подкожно в область задней трети шеи в объеме 1,0-2,0 мл;

12) способ и доза введения вакцины для животных в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах: подкожно в область задней трети шеи в объеме 1,0-2,0 мл с одновременным конъюнктивальным введением вакцины в объеме 0,5 мл (по 0,25 мл на каждый глаз).

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Далее описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения. Представленные ниже варианты осуществления описаны в интересах лучшего понимания изобретения, и понятно, что объем настоящего изобретения не ограничивается следующим описанием. Поэтому очевидно, что специалисты в данной области могут модифицировать любой способ осуществления, который целесообразен в пределах объема настоящего изобретения, при рассмотрении представленного здесь описания.

Для лучшего понимания сущности изобретения ниже приводятся примеры его конкретного выполнения.

Пример 1

Наработка и контроль качества суспензий гриппозных вирусных векторов

Для приготовления готового препарата вакцины были наработаны вирусодержащие суспензии гриппозных вирусных векторов Flu- NS1-124-L7/L12 - H5N1, Flu- NS1-124-Omp16 - H5N1, Flu- NS1-124-L7/L12 - H1N1 и Flu- NS1-124-Omp16 - H1N1 в 10-суточных куриных эмбрионах. Всего было наработано по 5-6 л каждого гриппозного вирусного вектора. Результаты контроля качества наработанных вирусных материалов приведены в таблице 1. Из данных таблицы 1 видно, что наработанные суспензии гриппозных вирусных векторов субтипов H5N1 и H1N1 стерильны, и имеют инфекционную активность (не менее $6,5 \log_{10}$ ЭИД₅₀/см³), достаточную для приготовления готового препарата вакцины.

Пример 2

Приготовление стабилизирующей среды вакцины

В качестве стабилизирующей среды использовали смесь пептона и сахарозы в конечных концентрациях 6% и 3%, соответственно. Для приготовления вакцины всего было подготовлено 14000 мл стабилизирующей среды, которая до составления вакцины хранилась в условиях бытового холодильника ($4 \pm 2^\circ\text{C}$). Результаты контроля качества подготовленной защитной среды показали, что она стерильна и имеет pH 7,35.

Пример 3

Приготовление растворителя вакцины

В качестве растворителя и одновременно иммуностимулятора вакцины было приготовлено 28 л 10%-ной суспензии адьюванта Montanide Gel-01 на физиологическом растворе. Указанный объем растворителя рассчитан на 28

тыс. доз готовой вакцины. Розлив растворителя осуществлялся в 100 мл стеклянные флаконы (280 флаконов), которые в последующем укупоривались резиновыми пробками, закатывались алюминиевыми колпачками и маркировались.

Пример 4

Контроль качества растворителя вакцины

Контроль качества растворителя осуществляли по таким техническим и биологическим параметрам как внешний вид, pH и стерильность. Всего для контроля качества было выборочно отобрано 7 флаконов растворителя. Результаты контроля качества растворителя вакцины показаны в таблице 2. Из данных таблицы 2 видно, что приготовленная партия растворителя отвечает требованиям контроля качества и может быть использована для растворения готового препарата вакцины.

Пример 5

Приготовление готового препарата вакцины

Вакцину готовили из вирусосодержащих аллантоисных суспензий гриппозных вирусных векторов Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, Flu-NS1-124-Omp16-H5N1, Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1 и Flu-NS1-124-Omp16-H1N1. Для этого суспензий гриппозных вирусных векторов с одинаковой антигенной структурой (H5N1 или H1N1) объединяли в один пул в соотношении 1:1 для получения бивалентной вакцинной формуляции. Далее полученные смеси вирусных конструкций (L7/L12+Omp16) объединяли в соотношении 1:1 со стабилизирующей средой, содержащей 6 %-ный раствор пептона и 3 %-ный раствор сахарозы, затем проводили смешивание при комнатной температуре

при 300 обор/мин в течение 30 мин, полученную смесь расфасовывали по 1 мл и лиофилизировали на сублимационной установке «Usifrua».

В цехе сушки кассеты с ампулами содержащими вакцинную жидкость предварительно охлаждали до температуры не выше минус 45 °С и помещали в камеру сублимационной установки с охлажденным до минус 55-60 °С конденсатором. Перед загрузкой сублимационную камеру стерилизовали включением на 30 мин ртутно-кварцевых ламп.

Значение вакуума в период сублимации и досушивания колебалась в пределах от 4 до 7 Па (40÷100 мкм рт. ст.). Процесс сушки проходил при температуре конденсатора не выше минус 52 °С, температура обогрева полок не превышала 40 °С. Конечная температура материала 20-22 °С поддерживалась в течение 10-12 ч. Ампулы с высушенным вирусом запаивались на карусельно-коллекторном аппарате при остаточном давлении от 25 до 30 Па.

Всего на данном этапе было приготовлено 13750 ампул лиофилизированной ВАКЦИНЫ 1 (по 1 мл) из гриппозных вирусных векторов субтипа H5N1 (для прайм вакцинации) и 13690 ампул лиофилизированной ВАКЦИНЫ 2 (по 1 мл) из гриппозных вирусных векторов субтипа H1N1 (для бустерной вакцинации). Полученные ампулы с готовыми вакцинами маркировали и заложили на режимное хранение при 2-8 °С.

Пример 6

Контроль качества вакцины по техническим показателям

Контроль качества вакцины по техническим показателям включал определение внешнего вида, наличия посторонней примеси, плесени и трещин в ампулах, наличия вакуума в ампулах, растворимости и массовой доли влаги в ампулах. Всего для контроля качества было выборочно

отобрано по 47 ампул каждой вакцины. Результаты контроля качества вакцины 1 и 2 показаны в таблице 3. Из данных таблицы 3 видно, что приготовленные производственные серии вакцины 1 и 2 отвечают требованиям контроля качества и могут быть переданы для дальнейшего биологического контроля качества.

Пример 7

Контроль качества вакцины по биологическим показателям

Контроль качества вакцины по биологическим показателям включал определение стерильности, инфекционной активности, безвредности и иммуногенности на лабораторных животных (мыши или морские свинки) и КРС. Результаты определения стерильности и инфекционной активности вакцин 1 и 2 показаны в таблице 4. Из данных таблицы 4 видно, что приготовленные производственные серии вакцин 1 и 2 стерильны и имеют высокую инфекционную активность (по 89-190 доз/ампула).

Пример 8

Безвредность вакцины на мышах

Проверку вакцины на безвредность проводили на 20 клинически здоровых мышах. Для этого им подкожно в область спины вводили 0,5 мл смеси вакцины 1 и 2 (в равных объемах; $n=10$) в цельном виде или просто растворитель, содержащий адъювант ($n=10$). Результаты 10-дневного клинического наблюдения показали, что мыши в опытной и контрольной группах оставались живыми, не теряли в весе (таблица 5) и не проявляли признаков интоксикации. Исходя из этого, было сделано заключение о безвредности вакцины.

Пример 9

Безвредность вакцины на КРС

Проверку вакцины на безвредность проводили на клинически здоровом крупном рогатом скоте (серонегативного к бруцеллезу) обоего пола в возрасте 18-24 месяцев. Для этого 3 головам КРС сначала подкожно ввели цельные препараты вакцины 1 (прайм вакцинация с гриппозными вирусными векторами субтипа H5N1), а затем через 21 суток вакцины 2 (бустерной вакцинация с гриппозными вирусными векторами субтипа H1N1) по 1,0 мл в область шеи. Контрольной группе КРС (n=2) вместо вакцины аналогичным образом вводили растворитель, содержащий адъювант. Результаты 42-дневного клинического наблюдения с ежедневной термометрией показали, что испытываемая вакцина у КРС не вызывала гибели, повышение температуры тела (не более 39,5°C) и признаков какого-либо заболевания. У 90-100% КРС на месте подкожного введения вакцин 1 и 2 было выявлено образование безопасных инфильтратов диаметром до 6 см, которые полностью рассосались через 30-40 суток после каждой вакцинации. Указанное местное реактогенное действие вакцины является допустимым, поскольку оно полностью безопасно для здоровья КРС и не оказывает негативного воздействия на продуктивность вакцинированных животных. Исходя из этого, испытываемая вакцина была признана безопасной для КРС с незначительным местным реактогенным действием.

Пример 10

Иммуногенность вакцины на мышах

Иммуногенность вакцины на мышах оценивали на модели контрольного заражения. Для этого двукратно вакцинированным мышам ($n=10$) внутрибрюшинным способом вводили по 10 м.к./0.5 мл вирулентного штамма *B. abortus* 544. Аналогичным образом заражали и мышей контрольной группы ($n=10$), которым вместо вакцины вводили физиологический раствор. Через 28 суток после контрольного заражения мышей умерщвляли и отбирали селезенку для титрования в среде Brucella Agar Base. Результаты исследований (рисунок 1) показали, что количество выделенных бруцелл из селезенки вакцинированных мышей (16512 ± 8530) было статистически достоверно ниже ($p < 0,01$) по сравнению с мышами контрольной группы (167770 ± 51974), следовательно, вакцина признана иммуногенной.

Пример 11

Иммуногенность вакцины на КРС

Иммуногенность вакцины на КРС оценивали на модели контрольного заражения. Для этого двукратно вакцинированному КРС ($n=3$) подкожным способом вводили по 500 млн. м.к./мл вирулентного штамма *B. abortus* 544. Аналогичным образом заражали и КРС контрольной группы ($n=2$), которым вместо вакцины вводили физиологический раствор. Через 28 суток после контрольного заражения КРС умерщвляли гуманным способом и отбирали пробы из органов (печени, почки, селезенки), лимфоузлов (подчелюстные, заглоточные, средостенные, бронхиальные, портальные, брыжеечные надвыменные, предлопаточные правый и левый, паховые правый и левый, тазовые, параортальные) и костного мозга для высева на среду Brucella Agar Base. По результатам этих исследований высчитывали индекс инфицированности опытной и контрольной групп животных.

Проведенные исследования (рисунок 2) показали, что показатель индекс инфицированности в опытной группе ($1,0 \pm 0,5$) был статистически достоверно ниже ($p < 0,03$) по сравнению с контрольной группой ($5,0 \pm 1,0$), из чего следует, что испытываемая вакцина иммуногенна для КРС.

Таблица 2. Результаты экспериментальных исследований в КРС

Наименование вакцины	Показатель инфицированности	Показатель смертности
Вакцина-1	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-2	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-3	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-4	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-5	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-6	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-7	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-8	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-9	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-10	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-11	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-12	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-13	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-14	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-15	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-16	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-17	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-18	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-19	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-20	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-21	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-22	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-23	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-24	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-25	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-26	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-27	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-28	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-29	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-30	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-31	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-32	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-33	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-34	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-35	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-36	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-37	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-38	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-39	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-40	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-41	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-42	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-43	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-44	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-45	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-46	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-47	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-48	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-49	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-50	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-51	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-52	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-53	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-54	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-55	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-56	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-57	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-58	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-59	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-60	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-61	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-62	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-63	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-64	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-65	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-66	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-67	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-68	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-69	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-70	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-71	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-72	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-73	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-74	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-75	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-76	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-77	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-78	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-79	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-80	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-81	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-82	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-83	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-84	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-85	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-86	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-87	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-88	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-89	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-90	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-91	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-92	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-93	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-94	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-95	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-96	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-97	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-98	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-99	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Вакцина-100	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0

Чертежи, схемы и рисунки

Способ получения
противобруцеллезной вакцины для
сельскохозяйственных животных
на основе гриппозных вирусных
векторов

Таблица 1 – Результаты технологического контроля качества наработанных суспензий гриппозных вирусных векторов, экспрессирующих бруцеллезные антигены

Наименование гриппозного вектора	Показатель качества	Результат
Flu-NS1-124-Omp16- H5N1	Гемагглютинирующая активность	1:128
	Инфекционная активность	$8,20 \pm 0,14 \log_{10} \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$
	Стерильность	Стерильна
Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1	Гемагглютинирующая активность	1:256
	Инфекционная активность	$8,95 \pm 0,22 \log_{10} \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$
	Стерильность	Стерильна
Flu-NS1-124-Omp16- H1N1	Гемагглютинирующая активность	1:64
	Инфекционная активность	$7,87 \pm 0,08 \log_{10} \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$
	Стерильность	Стерильна
Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1	Гемагглютинирующая активность	1:128
	Инфекционная активность	$8,45 \pm 0,14 \log_{10} \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$
	Стерильность	Стерильна

Способ получения
противобруцеллезной вакцины для
сельскохозяйственных животных
на основе гриппозных вирусных
векторов

Таблица 2 - Результаты контроля качества растворителя вакцины в 100 мл флаконах

Показатели	Характеристика и нормы	Результаты контроля
Внешний вид	Прозрачная жидкость с рыхлым осадком содержащая 10-20 % Montanide Gel-01. После встряхивания в течение 1-2 минут должна образовываться гомогенная суспензия беловато-серого цвета	соответствует
Концентрация водородных ионов, рН	6,8-7,6	7,2
Контаминация бактериальной и грибковой микрофлорой (стерильность)	Высевы растворителя на питательные среды МПА, МПБ, МППБ, Сабуро должны быть без роста аэробной, анаэробной и грибковой микрофлоры	стерильна

Способ получения
противобруцеллезной вакцины для
сельскохозяйственных животных
на основе гриппозных вирусных
векторов

Таблица 3 - Результаты контроля качества готовой вакцины по техническим параметрам

Показатели	Характеристика и нормы	Результаты контроля
Внешний вид	Однородная мелкопористая масса серовато-белого или серовато-желтого цвета.	Вакцина 1/Вакцина 2 - соответствуют
Наличие посторонней примеси, плесени и трещин в ампулах (флаконах)	После растворения вакцины – не допускается	Вакцина 1/Вакцина 2 - соответствуют
Наличие вакуума в ампулах (флаконах)	При проверке аппаратом типа Д ¹ Арсонваля должно быть фиолетово-синее свечение, сопровождающееся характерным потрескиванием	Вакцина 1 - 36 ампул не имеют вакуума Вакцина 1 - 41 ампула не имеют вакуума
Время ресуспендирования (растворимость)	Содержимое ампул должно растворяться в 0,9 % растворе хлорида натрия в течение 1,0-1,5 мин и представлять гомогенную взвесь	Вакцина 1/Вакцина 2 – в течение 1 минуты
Концентрация водородных ионов, рН	6,8-7,6	Вакцина 1 - 7,25 Вакцина 2 - 7,38
Массовая доля влаги, %	не более 3,0	Вакцина 1 - 2,89 Вакцина 2 - 2,96

Способ получения
противобруцеллезной вакцины для
сельскохозяйственных животных
на основе гриппозных вирусных
векторов

Таблица 4 - Результаты определения стерильности и инфекционной активности готовой вакцины

Показатели	Характеристика и нормы	Результаты контроля
Контаминация бактериальной и грибковой микрофлорой (стерильность)	Высевы вакцины/растворителя на питательные среды МПА, МПБ, МППБ, Сабуро должны быть без роста аэробной, анаэробной и грибковой микрофлоры	Вакцина 1/Вакцина 2 – стерильна
Биологическая активность	Биологическая активность вакцины при титровании на 10-11-сут куриных эмбрионах должна быть не ниже $10^{6,0}$ ЭИД ₅₀ /см ³	Вакцина 1 - $8,28 \pm 0,22$ $\log_{10}$ ЭИД ₅₀ /см ³ Вакцина 2 - $7,95 \pm 0,14$ $\log_{10}$ ЭИД ₅₀ /см ³

Способ получения
противобруцеллезной вакцины для
сельскохозяйственных животных
на основе гриппозных вирусных
векторов

Таблица 5 – Динамика массы тела мышей опытной и контрольной групп после вакцинации

Группы животных	Масса тела испытуемых животных, г			
	Дни наблюдения			Прирост массы тела, г
Опытная (вакцинированная)	0	1	10	
	19,2	ж	ж	+2,0
	18,4	ж	ж	+1,0
	19,3	ж	ж	+2,3
	18,1	ж	ж	+0,2
	18,3	ж	ж	+1,4
	18,7	ж	ж	+0,3
	19,1	ж	ж	+2,0
	19,0	ж	ж	+2,0
	18,6	ж	ж	+1,0
	19,3	ж	ж	+2,3
	Контрольная (растворитель с адьювантом)	19,8	ж	ж
19,3		ж	ж	+1,7
19,4		ж	ж	+1,9
18,5		ж	ж	+0,3
19,0		ж	ж	+2,0
19,0		ж	ж	+2,0
18,2		ж	ж	+1,0
19,3		ж	ж	+2,3
18,5		ж	ж	+0,2
19,3		ж	ж	+1,4
Примечание - «ж» - живые				

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения противобруцеллезной вакцины для сельскохозяйственных животных на основе гриппозных вирусных векторов, включающий накопление вирусных векторов в куриных эмбрионах, стабилизацию вирусных суспензий комплексом защитных сред (6% лептон и 3% сахара в конечной концентрации), фасовку в ампулы или флаконы с последующей сублимационной сушкой, отличающийся тем, что используют рекомбинантные штаммы вируса

гриппа А субтипов H5 N1 (Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1 и Flu-NS1-124- Omp16-H5N1) или H1N1 (Flu-NS1-124-L7/L12-H1N1 и Flu-NS1-124-Omp16-H1N1), экспрессирующие бруцеллезные белки L7/L12 или Omp16, которые накапливаются в куриных эмбрионах методом предельных разведений, объединяются в равных объемах или по титру инфекционной активности в пулы (смеси) в зависимости от субтипа вирусов («Вакцина 1» - субтип H5 N1; «Вакцина 2» - субтип H1N1), при этом перед применением вакцину разводят 10-20%-ным раствором адьюванта Montanide Gel 01.

