



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42089 (13) C2

(51) 7 A61K39/145, C12N7/06

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ПРОТИГРИПОЗНА ВАКЦИНА НА ОСНОВІ ПОВЕРХНЕВОГО АНТИГЕНУ, СПОСІБ ЇЇ ВИРОБНИЦТВА

(21) 98041787

(22) 08 04 1998

(24) 15 10 2001

(31) 97201007 8

(32) 09 04 1997

(33) NL

(46) 15 10 2001, Бюл. № 9, 2001 р.

(72) Густааф Ж. М. Ван Шарренбург, NL, Руді Брандс, NL

(73) ДЮФАР ІНТЕРНЕТНЛ РІСЬОЧ Б В, NL

(56) 1 WO-A-96/15231

2 WO-A-97/04803

3 US-A-4317811

4 US-A-4500513

5 "Cell culture as a substrate for the production of Influenza vaccines. Memorandum from a WHO meeting" BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION, vol. 73, No. 4, 1995, pages 431-435, XP002040695

(57) 1 Протигрипозна вакцина на основі поверхневого антигену, що одержана з вірусу грипу, вирощеного на культурі тваринних клітин, яка має вміст ДНК клітин носія, що не перевищує 25 пг на дозу

2 Протигрипозна вакцина на основі поверхневого антигену за п. 1, яка має вміст ДНК клітин носія, що не перевищує 10 пг на дозу

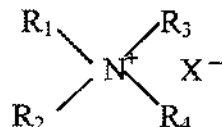
3 Спосіб виробництва протигрипозної вакцини за п. 1 з вірусів грипу, вирощених на культурі тваринних клітин, згідно з яким

а) обробляють одержану з клітинної культури рідину, що містить вірус, ферментом, який перетравлює ДНК,

б) додають катіонний детергент, після чого відокремлюють білки поверхневого антигену

4 Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що обробку ферментом, який перетравлює ДНК, ведуть під час розмноження вірусу грипу у клітинній культурі

5 Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що катіонний детергент переважно містить сполуку загальної формули

де R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> та R<sub>3</sub> - однакові або різні, та кожен є алкіл чи арил, або R<sub>1</sub> та R<sub>2</sub> разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, створюють 5- або 6-членне насичене гетероциклічне кільце,а R<sub>3</sub> - алкіл або арил,або R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> та R<sub>3</sub> разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, створюють 5- або 6-членне гетероциклічне кільце, не насичене біля атома азоту, R<sub>4</sub> - алкіл або арил, а

X - аніон

6 Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що катіонним детергентом переважно є цетилтриметил-амоній бромід

7 Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що катіонний детергент доповнюють неіонним детергентом

8 Спосіб по п. 3, який відрізняється тим, що віруси грипу розмножують на тваринній лінії клітин

9 Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що віруси грипу розмножують на клітинах СНМД (на клітинах собак нирок Мадін Дарбі)

Даний винахід стосується протигрипозних поверхневих антигенних вакцин, які виробляються з вірусу грипу, вирощених на культурі тваринних клітин, та способу одержання поверхневих антигенних білків вірусів грипу, вирощених на культурі тваринних клітин

Типо вірусу грипу має розмір близько 125 нм і складається з внутрішньої рибонуклеїнової кислоти (РНК), що сполучена з нуклеопротеїном, який оточує оболонка вірусу з ліпідною дво-

шаровою структурою. Внутрішній шар оболонки складається переважно з білків матриксу, а зовнішній шар містить більшість одержаного з носія ліпідного матеріалу

Так звані "поверхневі білки" - нейрамінідаза (НА) та гемаглютинін (ГА) - з'являються як виділення на поверхні тіла вірусу

Відомі на ринку інактивовані протигрипозні вакцини переважно являють собою так звані "розщеплені" чи "субодиничні" вакцини

"Розщеплені вакцини" одержують обробкою цілого вірусу грипу солюбілізуючими розчинами миючих засобів, після чого видаляють миючий засіб та більшість вірусного ліпідного матеріалу

"Субодиничні вакцини" проти грипу, на відміну від "розщеплених", не містять жодних вірусних білків. Замість того "субодиничні вакцини" збагачено поверхневими білками, які виділяють при вакцинації бажані нейтралізуючі віруси (отже, захисні) антитіла

Більшість промислових протигрипозних вакцин отримують з вірусів грипу, вирощених на зародках курячих яєць. Втім, загальновідомо, що виробництво протигрипозних вакцин на курячих яйцях страждає кількома видами, а саме

1. Такий виробничий процес надто вразливий внаслідок неоднорідної мікробіологічної якості яєць

2. Процес надто негнучкий у випадку раптового зростання попиту, тобто серйозної епідемії, виникають труднощі з постачанням, бо неможливе знайти потрібні яйця у великій кількості

3. Отримані таким чином вакцини протипоказано особам, перчутливим до курячих та/або яєчних білків

4. Вирішити ці проблеми можна, якщо вирощувати віруси грипу на тканинних культурах. Вважається, що такий спосіб виробництва має багато переваг

1. Лінії клітин тканинних культур містяться у чітко визначених банках клітин і не мають мікробіологічних забруднень, отже партії вакцини виходять однорідними і продукцію отримують високої якості

2. Підвищується вірогідність мати достатню кількість вакцини на випадок серйозної загрози епідемії чи пандемії

3. Одержаний вірусний матеріал більш придатний для різних способів введення (перорально, перназально, вдиханням)

4. З точки зору ВООЗ ця технологія дозволить відкладати щорічно рекомендований масовий прийом вакцини (з середини лютого по середину березня) і провадити його згідно з фактичною потребою, пристосовуючись до штаму, який циркулює на даний момент

Втім, ще лишається важлива проблема з тканинною культурою вірусу грипу, оскільки генетичний матеріал з безперервної лінії клітин може залишатися у вакцині

Ця проблема пов'язана з ризиком, і якщо її не вирішувати, директивні органи можуть не дозволити продаж таких протигрипозних вакцин із міркувань безпеки. Наприклад, Управління харчових продуктів та лікарських засобів США вимагає, щоб біотехнологічні продукти для людського використання не мали більше ніж 100 пг ДНК клітин носія на дозу

Отже, цей винахід пропонує спосіб виробництва поверхневого антигену вірусу грипу і не містить шкідливого генетичного матеріалу у неприпустимій кількості, виконуючи таким чином вимоги контролюючих органів. Втім, виявилось бажаним і неочікуваним те, що одержані протигрипозні вакцини містять ДНК клітин носія не більш 25 пг на дозу

У конкретному варіанті здійснення винаходу запропоновано спосіб виробництва поверхневих

антигенних білків, здатних для одержання такої протигрипозної вакцини з низьким вмістом ДНК з вірусів грипу, вирощених на культурі тваринних клітин, згідно з яким

а) обробляють цілий вірус, який містить рідину, одержану з клітинної культури, ферментом, що перетравлює ДНК,

б) додають катіонний миючий засіб, після чого виділяють білки поверхневого антигену

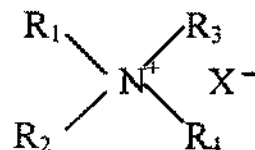
Спосіб, згідно з винаходом, може бути застосовано при виробництві вакцин, що містять різні штами вірусу грипу, серед них віруси людського, свинячого, кіньського та пташиного грипу

Культура тваринних клітин, згідно з винаходом, може містити або первісну клітину, таку як фібробласти курячих зародків (ФКЗ), або безперервну лінію клітин, таку як клітини собачих нирок Мадін Дарбі (СНМД), клітини яєчників китайського хом'яка (ЯКХ) та клітини Веро

Обробку цілого вірусу, який містить рідину, ферментом, що перетравлює ДНК, можна провадити безпосередньо у ферментері, за бажанням уже в ході вирощування клітинної культури та в процесі розмноження вірусу

У ролі ферментів, що перетравлюють ДНК, можуть виступати ДНКази (наприклад, класифікована ЄС - як 3.1.21 та 3.2.22) або нуклеази (класифікація ЄС 3.1.30 та 3.1.31)

Катіонні миючі засоби, згідно з винаходом, переважно містять сполуку загальної формули



де  $R_1$ ,  $R_2$  та  $R_3$  - однакові або різні, та кожен є алкіл чи арил,

або  $R_1$  та  $R_2$  разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, створюють 5-або 6-членне насичене гетероциклічне кільце,

а  $R_3$  - алкіл або арил, або  $R_1$ ,  $R_2$  та  $R_3$  разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, створюють 5-або 6-членне гетероциклічне кільце, не насичене біля атому азоту,

$R_4$  - алкіл або арил, а

$X$  - аніон

Прикладом таких катіонних миючих засобів є солі цетилтриметиламонію, як цетилтриметиламонійбромід (ЦТАБ), та міристилтриметиламонійна сіль. Придатні й такі засоби, як ліпофектин, ліпофектамін, ДОТМА

За бажанням ці катіонні миючі засоби можна доповнювати неіонними, такими, як "Твін"

Після стадії обробки миючими засобами виділення білків поверхневого антигену, наприклад, може мати наступні етапи

1. Виділення частки (тіла) РНП з білків поверхневого антигену центрифугуванням або ультрафільтрацією, та

2. Видалення миючого засобу з білків поверхневого антигену, наприклад, гідрофобною взаємодією миючого засобу з відповідною смолою (наприклад, Амберліт ХАД-4) та/або ультра(діа)фільтрацією

Несподівано спосіб, згідно з винаходом, забезпечує одержання продукту з надзвичайно низьким вмістом ДНК тваринних клітин. Концентрації ДНК не перевищують 25 пг/дозу, а в багатьох випадках вдається одержати навіть 10 пг/дозу.

Білки поверхневого антигену можна переробити на протигрипозну вакцину, наприклад, шляхом додавання буферу (наприклад, забуференого фосфатом фізіологічного розчину) та/або змішування з антигенами інших серотипів вірусу грипу.

За бажанням концентрат поверхневого антигену можна використовувати для подальшого виробництва вакцини.

#### Приклад 1.

##### А Розмноження вірусу

1 Вірус грипу антигенного типу В/Ямагата розмножують на клітинах собак нирок Мадін Дарбі (СМНД) (АТСС ССЛ34) у ферментері шляхом інкубації висіву вірусу на клітинах протягом двох діб при 35 °С.

2 Після того рН рідини у ферментері підвищують до 8,0 додаванням розведеного гідроксиду натрію та вводять Бензоннуклеазу до кінцевої концентрації 1000 од (1 мкг) на літр.

3 Продовжують інкубацію при 35 °С протягом 4 годин В.

##### Виділення вірусу

1 Рідину фільтрують крізь об'ємний фільтр з номінальним розміром пор 0,5 мкм, щоб видалити клітинні частки.

2 Після того вірус грипу концентрують та очищують ультрафільтрацією з використанням мембрани, що відсікає молекули з масою більш ніж 300000.

3 До концентрату додають цукрозу до кінцевої концентрації 30 об %, а потім формальдегід до кінцевої концентрації 0,015 об %. Цю суміш перемішують 72 години при 2-8 °С.

4 Далі концентрат вірусу розводять п'ятикратно солевим фосфатним буфером та завантажують до спорідненої колонки, що містить Амікон-сульфатцелюлозу. Після видалення забруднень промиванням солевим фосфатним буфером, вірус змочують розчином 1 М хлориду натрію у солевому фосфатному буфері.

Елюат концентрують та знесолюють ультрафільтрацією за допомогою мембрани, що відсікає молекули з масою більш ніж 300000.

##### С Виділення субодиночної вакцини

1 Додають неіонний миючий засіб "Твін -80" до кінцевої концентрації 300 мкг/мл та цетилтриметиламонійбромід до кінцевої концентрації 750 мкг/мл. Цю суміш перемішують при 4 °С три години, після чого відокремлюють частки РНП від білків поверхневого антигену центрифугуванням.

2 Супернатант перемішують з Амберлптом ХАД-4 протягом ночі при 2-8 °С, видаляючи миючі засоби. Амберлпт відфільтровують, після чого фільтрат піддають стерильній фільтрації крізь фільтр 0,22 мкм.

На усіх етапах вищеописаного процесу аналізують вміст ДНК клітин носія у пробах згідно з затвердженою методикою на основі гібридизації макромолекул шляхом дифузії крізь шпарковидні отвори у матриці, використовуючи зонд № 32 Р-міченої собачої ДНК.

Підсумки ДНК-аналізу на різних стадіях наведено у таблиці (вміст ДНК у внутрішньовенній дозі виражено у пікограмах на 50 мг ГА).

Проба	Вміст ДНК	Після стадії
Рідина у ферментері після 48 годин інкубації	19 000 000	A1
Рідина у ферментері після обробки нуклеазою	370 000	A2
Рідина після попередньої фільтрації	10 000	B1
Концентрат після ультрафільтрації	4 350	B2
Рідина після інактивації та афінної хроматографії	4 200	B4
Супернатант після обробки "Твіном" і ЦТАБ та центрифугування	<25	C1
Фільтрат після видалення миючого засобу	<25	C2

#### Приклад 2.

Розмноження, очищення, інактивація та розщеплення вірусу, як у прикладі 1. Обробка рідини у ферментері бензоннуклеазою протягом останніх годин оброблення вірусом (стадії А2 та А3) з використанням рН розмножувального середовища (стадія А1) дає аналогічні наслідки щодо видалення ДНК. ДНКазу І, хоч і потрібна у більшій концентрації, так само ефективно видаляє ДНК клітин носія (протягом стадій А1-А3). Аналогічні результати одержано при застосуванні інших ендонуклеаз.

#### Приклад 3.

Процес здійснюють, як у прикладах 1 та 2, тільки клітинні частки (стадія В1) видаляють на центрифугу.

#### Приклад 4.

Процес здійснюють, як у прикладах 1, 2 та 3, за виключенням того, що вірус концентрують та очищують (стадія В2) з ферментерної рідини на зональній центрифугі з безперервним потоком (наприклад, моделі РК фірми Електро-Нуклеонікс), використовуючи градієнт цукрози у солевому фосфатному буфері.

#### Приклад 5.

Процес здійснюють, як у прикладах 1-4, тільки замість розчину цетилтриметиламонійброміду на стадії С1 додають розчин цетилпіридинійброміду, мірістилтриметиламонійброміду, бензотоній-хлориду, метилбензотонійхлориду, декаметонійхлориду або стеарил-диметилбензиламонійброміду.

Результати щодо видалення ДНК клітин носія аналогічні.

**Приклад 6.**

Спосіб згідно з прикладом 1 з успіхом використовували для приготування протигрипозної

вакцини з низьким вмістом ДНК з штамів В/Харбін, В/Панама, А/Техас (H1N1), А/Тайвань(H1N1), А/Йоганесбург (H3B2) та А/Ухань (H3N2)

---

Тираж 50 екз

Відкрите акціонерне товариство «Патент»  
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101  
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03

---