



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A61K 35/30 (2018.08); A61K 35/76 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2017133180, 25.09.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
25.09.2017

Дата регистрации:  
29.01.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.09.2017

(45) Опубликовано: 29.01.2019 Бюл. № 4

Адрес для переписки:  
127473, Москва, 2-й Волконский пер., 10, АО  
"НПО "Микроген"

(72) Автор(ы):

Стронин Олег Владимирович (RU),  
Колтунов Александр Анатольевич (RU),  
Епанчинцев Антон Александрович (RU),  
Шарова Ольга Игоревна (RU),  
Учуватова Елена Валерьевна (RU),  
Дьяконова Елена Васильевна (RU),  
Шкуратова Ольга Владиславовна (RU),  
Гаврилова Маргарита Анатольевна (RU),  
Бакулева Надежда Васильевна (RU),  
Теплова Надежда Владимировна (RU),  
Коновалова Олеся Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Акционерное общество  
"Научно-производственное объединение по  
медицинским иммунобиологическим  
препаратам "Микроген" (АО "НПО  
"Микроген") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: SU 1349757 A1, 07.11.1987. RU  
2203089 C2, 27.04.2003. RU 2082432 C1,  
27.06.1997. RU 2084242 C1, 20.07.1997. RU  
2402606 C1, 27.10.2010. БИЛАЛОВА Г.П. и  
др. История производства вакцин для  
профилактики клещевого энцефалита в г.  
Томске: от мозговой вакцины до вакцины  
энцевир, Бюллетень СО РАМН, 2007, 46 126,  
стр. 105-110, найдено 23.07.2018 в (см. прод.)

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинской биотехнологии, а именно к производству и контролю вирусной вакцины клещевого энцефалита (КЭ). Для этого культуры клеток заражают штаммом 205 культурального вируса клещевого энцефалита 2-го пассажа с последующей репродукцией вируса на переливаемой линии клеток Vero; для увеличения

репродукции вируса добавляют глутамин, эмбриональную телячью сыворотку. Культивирование проводят в роллерных бутылках или клеточных фабриках, после чего вирусную суспензию инактивируют формальдегидом. Далее суспензию концентрируют на половолоконных или мембранных модулях с порогом отсека 100-300 кДа с последующей хроматографической

очисткой на полимерном сорбенте и сорбируют на адьюванте. Концентрация ДНК клеток-продуцентов в вакцине не превышает 10 нг/доза, концентрация белков плазмы крови КРС не превышает 50 нг/доза. Изобретение обеспечивает

получение вакцины, которая содержит минимальное количество гетерогенных белков и обладает повышенной безопасностью, эффективностью и стабильностью. 2 з.п. ф-лы, 2 ил., 2 пр.

(56) (продолжение):

Интернете [on-line] на сайте

<https://cyberleninka.ru/article/v/istoriya-proizvodstva-vaktsin-dlya-profilaktiki-kleshevogo-entsefalita-v-g-tomske>.

КОРОЧКИН Р.Б. Культивирование вирусов в культурах клеток, Витебск, ВГАВМ, 2010, стр.

1-43, найдено 23.07.2018 в Интернете [on-line] на сайте

<http://www.vsavm.by/wp-content/uploads/2013/10/Kultivirovanie-virusov-v-kulture-kletok.pdf> LIUY.-S.

et al. Preparation of inactivated tick-borne encephalitis vaccine (Vero cells) by using basket bioreactor,

Chinese Journal of Biologicals, 2015, 28, 12, pp. 1324-1326, 1331, найдено 23.07.2018 в Интернете

[on-line] на сайте

<https://www.embase.com/#advancedSearch/resultspage/history.5/page.1/25.items/orderby.date/source>.

МОРОЗОВА О.В. и др. Динамика репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток.

Вопросы вирусологии, 2012, 57, 2 стр. 40-43, найдено 23.07.2018 в Интернете [on-line] на сайте

<https://socionet.ru/publication.xml?h=spz:cyberleninka:30870:15806655SEPHAROSEINSTRUCTIONS>,

Amresham Bioscience, 2015, pp. 1-8, найдено 23.07.2018 в Интернете [on-line] на сайте

<https://documents.tips/documents/sepharose.html>. МАЙБОРОДА А. Б. и др. Половолоконная

мембрана из поливинилиденфторида и ее применение для очистки природных вод, Мембраны

и мембранные технологии", 2014, 4, 1, стр. 1-7, найдено 23.07.2018 в Интернете [on-line] на сайте

<http://faserkraft.ru/stati-i-publikatsii/statya-iz-zhurnala-membrany-i-membrann>.

RU 2 6 7 8 4 3 1 C 1

RU 2 6 7 8 4 3 1 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 35/30* (2018.08); *A61K 35/76* (2018.08)(21)(22) Application: **2017133180, 25.09.2017**(24) Effective date for property rights:  
**25.09.2017**Registration date:  
**29.01.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **25.09.2017**(45) Date of publication: **29.01.2019** Bull. № 4

Mail address:

**127473, Moskva, 2-j Volkonskij per., 10, AO "NPO  
"Mikrogen"**

(72) Inventor(s):

**Stronin Oleg Vladimirovich (RU),  
Koltunov Aleksandr Anatolevich (RU),  
Epanchintsev Anton Aleksandrovich (RU),  
Sharova Olga Igorevna (RU),  
Uchuvatova Elena Valerevna (RU),  
Dyakonova Elena Vasilevna (RU),  
Shkuratova Olga Vladislavovna (RU),  
Gavrilova Margarita Anatolevna (RU),  
Bakuleva Nadezhda Vasilevna (RU),  
Teplova Nadezhda Vladimirovna (RU),  
Konovalova Olesya Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Aksionernoe obshchestvo  
"Nauchno-proizvodstvennoe obединenie po  
meditsinskim immunobiologicheskim  
preparatam "Mikrogen" (AO "NPO "Mikrogen")  
(RU)**

(54) **METHOD FOR PRODUCING TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS VACCINE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to medical biotechnology, namely the production and control of tick-borne encephalitis virus vaccine (TBE). For this purpose, the cell cultures are infected with strain 205 of the 2nd passage tick-borne encephalitis culture virus with the subsequent reproduction of the virus on the Vero cell line; to increase the reproduction of the virus, glutamine, fetal calf serum is added. Cultivation is carried out in roller bottles or cell factories, after which the viral suspension is inactivated with formaldehyde.

Next, the suspension is concentrated on hollow fiber or membrane modules with a cut-off threshold of 100–300 kDa, followed by chromatographic purification using a polymeric sorbent and sorbing on an adjuvant. DNA concentration of producer cells in the vaccine does not exceed 10 ng/dose, the concentration of cattle blood plasma proteins does not exceed 50 ng/dose.

EFFECT: invention provides a vaccine that contains the minimum amount of heterogeneous proteins and has increased safety, efficacy and stability.

3 cl, 2 dwg, 2 ex

Изобретение относится к области микробиологии, медицинской биотехнологии, производству и контролю вирусных вакцин и может быть использовано при получении вакцины клещевого энцефалита (КЭ).

5 Клещевой энцефалит является трансмиссивным природно-очаговым антропозоонозом. Заражение человека возбудителем - вирусом клещевого энцефалита (семейство Flaviviridae) происходит при присасывании переносчика (клещей рода Ixodes). Очаги КЭ связаны с ареалом обитания иксодовых клещей и эндемичные регионы охватывают широкий пояс хвойных и смешанных лесов умеренной климатической зоны Евразии. Заболевания КЭ регистрируются от Австрии, Швейцарии, Германии, 10 Швеции до Дальнего Востока. В связи с тем, что вирус КЭ поражает нервную ткань, в клинике КЭ в первую очередь выделяют неврологические проявления, которые могут быть очень тяжелыми - вплоть до параличей и поражений ядер ствола мозга. Летальность заболевания может достигать до 30,0% в зависимости от региона.

Для России КЭ является наиболее значимым природно-очаговым заболеванием. 15 Именно на территории РФ циркулируют наиболее вирулентные генотипы вируса. Ежегодно сотни тысяч людей обращаются в медучреждения по поводу присасывания клеща, тысячи заболевают, а для сотен из них заболевание имеет тяжелые исходы - инвалидизация или смерть.

Наиболее эффективным способом специфической профилактики КЭ является 20 вакцинация, которая в десятки раз снижает вероятность заболевания, предотвращает развитие тяжелых форм и осложнений и решает государственную задачу охраны здоровья населения от опасного инфекционного заболевания.

Согласно рекомендациям ВОЗ и требованиям ГФ XIII при производстве вакцин с использованием перевиваемых клеточных культур содержание ДНК клеток-продуцентов 25 не должно превышать 10 нг на 1 дозу вакцины для исключения потенциальной возможности ее онкогенного и трансформирующего действия. Концентрация гетерогенных белков также не должна превышать установленных значений, в частности концентрация белков плазмы крови КРС, используемых при производстве вакцины, не должна превышать 50 нг/доза.

30 Задача, решаемая изобретением, состоит в получении высокоиммуногенной очищенной вакцины клещевого энцефалита, снижении количества и состава гетерогенных белков, снижении риска контаминации, связанного с использованием куриных эмбрионов, повышении технологичности процесса, повышении стандартности качества препарата, что в конечном итоге позволяет повысить безопасность, 35 эффективность и стабильность препарата, сохранить здоровье населения.

Заявляемый способ получения вакцины клещевого энцефалита включает использование аттестованной культуры клеток Vero, культурального вируса КЭ в качестве посевного, концентрирования ультрафильтрацией в тангенциальном потоке и очистки эксклюзионной хроматографией на полужестких полимерных сорбентах.

40 Предложенный способ осуществляется следующим образом.

При подготовке посевного вируса проводят двукратное пассирование производственного штамма на культуре клеток Vero с целью удаления компонентов мозга мышей, в котором культивируют производственный штамм. Вирусный сбор (вирусную суспензию) получают путем репродукции вируса в монослойной или 45 псевдосуспензионной культуре клеток Vero. Для увеличения репродукции добавляют глутамин, эмбриональную телячью сыворотку, другие ростовые факторы.

Культивирование проводят в роллерных бутылках объемом 2-10 л или многослойных Cell-factory или иных устройствах для монослойного или псевдосуспензионного

культивирования в течение 9-10 суток при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  при непрерывном перемешивании на роллерной установке со скоростью 1,0-8 об/мин (для роллерных бутылей), в зависимости от объема. Затем вирусную суспензию инактивируют формальдегидом в конечной концентрации  $200\pm 20$  мкг/мл в течение 3-х суток при температуре  $(32\pm 1)^\circ\text{C}$ . Концентрацию инфекционного вируса в вирусной суспензии контролируют до инактивации, а инаktivированную вирусную суспензию контролируют на отсутствие вирусной активности. Перед объединением культуральную среду, содержащую вирусную взвесь, обрабатывают протаминсульфатом, затем вирусный сбор центрифугируют, объединяя в общую емкость, и фильтруют для освобождения от клеточного субстрата.

Операцию проводят следующим образом.

В инаktivированную вирусную суспензию добавляют 4%-ный раствор протаминсульфата до конечной концентрации 50-100 мкг/мл. Оставляют для взаимодействия при температуре  $(6\pm 2)^\circ\text{C}$  на 0,5-20 часов. Далее преципитат удаляют последовательным центрифугированием полуфабриката из отдельных емкостей на центрифуге при ускорении  $\sim 13000 g$  с последующей фильтрацией объединенного полуфабриката через пакет фильтров с конечным размером пор 0,45 мкм. Полученный таким образом объединенный полуфабрикат концентрируют в 3-30 раз ультрафильтрацией в тангенциальном потоке на мембранных или полуволоконных модулях с порогом отсечения 100-300 кДа. Использование ультрафильтрационных модулей обеспечивает удаление значительной части низкомолекулярных примесей. Концентрат дополнительно очищают эксклюзионной хроматографией (гель-фильтрацией) на колонне с полужестким полимерным сорбентом, в качестве которого могут использоваться сорбенты марок Sepharose 4 Fast Flow, Sepharose 6 Fast Flow, WorkBeads 40 SEC, Toyopearl HW 65C, Toyopearl HW 55 F. Использование этого типа сорбентов позволяет повысить скорость процесса, эффективность очистки и стабильность результатов. В собираемой хроматографической фракции контролируют антигенную активность вируса клещевого энцефалита, количество общего белка, ДНК и белков КРС. Затем полученный очищенный концентрат фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм, разводят в соответствии с его антигенной активностью и используют для приготовления сорбированной вакцины. Сорбированную вакцину разливают в ампулы или флаконы и при необходимости подвергают сублимации.

Пример 1.

Вирусную суспензию получают путем репродукции вируса в монослойной культуре клеток Vero.

Производственный штамм вируса КЭ (штамм 205), хранящийся в виде мозговой суспензии, вносят в культуру клеток Vero, культивируют в течение 2-4 суток. Культуральную жидкость переносят в новую культуру клеток Vero и также культивируют 2-4 суток. Посевной вирус, прошедший два пассажа через культуру клеток, используют для заражения производственной культуры.

Для увеличения репродукции добавляют глутамин, эмбриональную телячью сыворотку в конечной концентрации 2%. Культивирование вируса проводят в роллерных бутылках объемом 2,0 л в течение 9 суток при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  при непрерывном перемешивании на роллерной установке со скоростью вращения 2 об/мин. Затем вирусную суспензию инаktivировать формальдегидом в конечной концентрации  $200\pm 20$  мкг/мл в течение 3-х суток при температуре  $(32\pm 1)^\circ\text{C}$ . Концентрацию инфекционного вируса в вирусной суспензии контролируют до инаktivации. Далее освобождают от клеточного субстрата и объединяют полуфабрикат.

Операцию проводят следующим образом.

В бутылки с инактивированной культуральной средой, содержащей клеточный дебрис, вирусную взвесь, добавляют протаминсульфат до конечной концентрации 50 мкг/мл. Оставляют для взаимодействия при температуре  $(6\pm 2)^\circ\text{C}$  на 19 ч. Затем клеточный детрит и образовавшийся преципитат удаляют центрифугированием. Сбор поступающего с центрифуги полуфабриката производят в общую емкость, затем его фильтруют через пакет фильтров с конечным размером пор 0,45 мкм. Полученный таким образом объединенный полуфабрикат концентрируют в 10 раз ультрафильтрацией на половолоконных модулях Xamplerg UFP-100C- 4x2MA с порогом отсечения 100 кДа. Далее концентрат очищают эксклюзионной хроматографией на колонне с сорбентом Sepharose 6 Fast Flow (Фиг. 1).

В собираемой хроматографической фракции контролируют антигенную активность вируса клещевого энцефалита, остаточные ДНК и белки КРС. Кроме того, контролируется чистота цельновирсионной фракции (Фиг. 2).

Затем полученный очищенный концентрат разводят равным количеством буферного раствора, фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм и используют для приготовления сорбированной вакцины.

Пример 2.

Вирусную суспензию получают путем репродукции вируса КЭ (штамм 205) в монослойной культуре клеток Vero. Для увеличения репродукции добавляют глутамин, эмбриональную телячью сыворотку в конечной концентрации 2%. Культивирование вируса проводят в 10-слойных Cell-factory (объем среды культивирования 2 л.) в течение 10 суток при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  при концентрации углекислоты 5%. Далее инактивацию, очистку и контроль проводят аналогично Примеру 1.

Фиг. 2 Результаты высокоэффективной жидкостной хроматографии исходного концентрата вакцины (А) и очищенного на Sepharose (Б) (колонна Protein Pac 300SW).

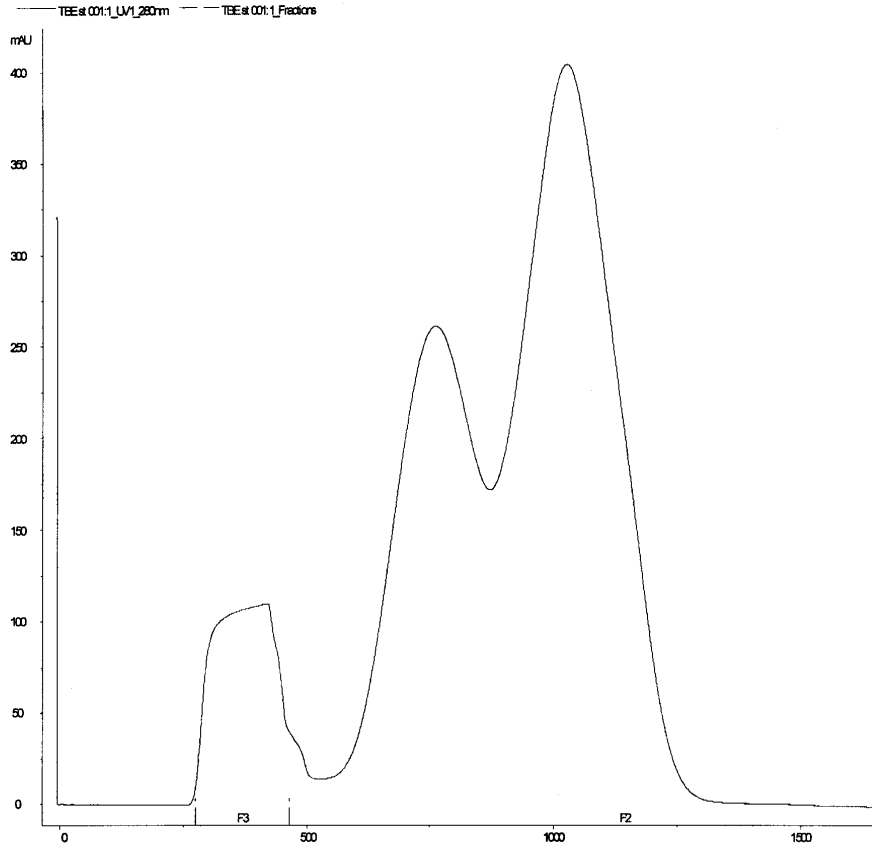
#### (57) Формула изобретения

1. Способ получения вакцины клещевого энцефалита, характеризующийся заражением вирусом культуры клеток с последующей репродукцией и выходом вируса в культуральную среду, его инактивированием, очисткой и сорбцией на адьюванте, включающий репродукцию вируса клещевого энцефалита на перевиваемой линии клеток Vero; использование в качестве посевного вируса культурального вируса штамма 205 вируса клещевого энцефалита 2-го пассажа; добавление глутамина, эмбриональной телячьей сыворотки для увеличения репродукции вируса; культивирование в роллерных бутылках при постоянной скорости вращения 1-8 об/мин; инактивацию вирусной суспензии формальдегидом; концентрирование с использованием половолоконных или мембранных модулей с порогом отсечения 100-300 кДа и очистку концентрированного вируса хроматографией на полимерном сорбенте.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что культивирование проводят в клеточных фабриках при контролируемом 5% содержании углекислого газа.

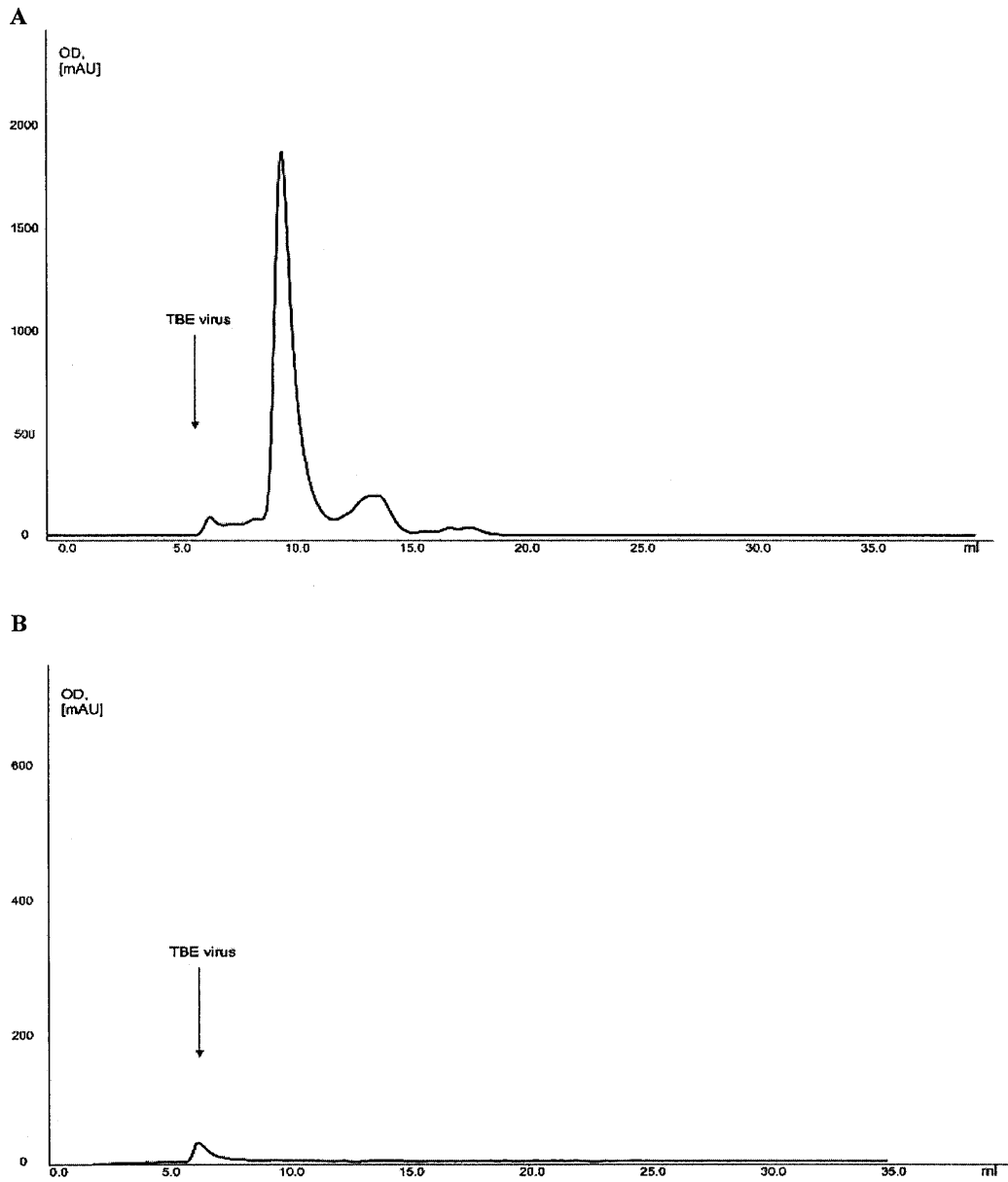
3. Способ по пп. 1, 2, отличающийся тем, что для очистки эксклюзионной хроматографией используют сорбенты на основе сефарозы (Sepharose).

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**



**Фиг. 1** Хроматограмма очистки концентрата вакцины

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА



Фиг. 2 Результаты высокоэффективной жидкостной хроматографии исходного концентрата вакцины (А) и очищенного на Sepharose (Б) (колонна Protein Pac 300SW)