



ЕВРАЗИЙСКАЯ ПАТЕНТНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ

ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ

№ 016866

Название изобретения:

«ВАКЦИНА ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ
ГРИППА»

Патентовладелец (льцы):

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ФОРТ"
(ООО "ФОРТ") (RU)

Изобретатель (и):

Мельников Сергей Яковлевич, Коровкин Сергей Анатольевич,
Катлинский Владимир Антонович, Катлинский Антон Викентьевич,
Семченко Андрей Викторович (RU)

Заявка №:

201100723

Приоритет изобретения:

06 июня 2011 г.

Дата подачи заявки:

30 августа 2012 г.

Дата выдачи патента:

Настоящим удостоверяется, что евразийский патент выдан на изобретение, изложенное в прилагаемом описании и формуле изобретения.

При уплате установленных годовых пошлин патент действует на территории государств-участников Евразийской патентной конвенции – Азербайджанской Республики, Кыргызской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Республики Таджикистан, Российской Федерации, Туркменистана и на территории Республики Молдова на основании Соглашения между Евразийской патентной организацией и Правительством Республики Молдова.

ГРИГОРЬЕВ Александр Николаевич
Президент Евразийского патентного ведомства



(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 016866

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2012.08.30

(51) Int. Cl. A61K 39/145 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(21) Номер заявки
201100723

(22) Дата подачи заявки
2011.06.06

(54) ВАКЦИНА ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ГРИППА

(43) 2012.07.30

(56) МЕЛЬНИКОВ С.Я. и др. Разработка
и доклиническое исследование виросямальной
расщепленной гриппозной вакцины нового
поколения "Грифор®". Журнал микробиологии,
эпидемиологии и иммунобиологии, 2009, № 1, с.
21-26

(96) 2011000076 (RU) 2011.06.06

EP-A1-1652914
RU-A-2008119501

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ФОРТ" (ООО "ФОРТ") (RU)

(72) Изобретатель:

Мельников Сергей Яковлевич,
Коровкин Сергей Анатольевич,
Катлинский Владимир Антонович,
Катлинский Антон Викентьевич,
Семченко Андрей Викторович (RU)

016866
B1

(57) Изобретение относится к области медицины и может быть использовано в вакцинопрофилактике. Предложена вакцина для профилактики гриппа, представляющая собой смесь поверхностных и внутренних антигенов вирусов гриппа типа А и В, полученная расщеплением очищенных вирионов детергентом октилгликозидом, в которой поверхностные антигены представлены в виде виросям размером 100-150 нм, включающих в свой состав собственные вирусные фосфолипиды, и что внутренние антигены представлены в виде мицелл, при соотношении гемагглютинина к внутренним антигенам 1:(0,5-2,5) и соотношении гемагглютинина к вирусным фосфолипидам 1:(2-4). Техническими результатами изобретения являются создание вакцины для профилактики гриппа с высокой иммуногенностью, протективной активностью и низкой реактогенностью, а также расширение арсенала противогриппозных вакцин.

B1

016866

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано в вакцинопрофилактике, в частности для профилактики гриппа.

Уровень техники

На протяжении последних десятилетий вакцины против гриппа постоянно совершенствовались с целью уменьшения реактогенности, но при этом зачастую снижалась иммуногенность, что заставляло разработчиков искать более совершенные формы презентации вирусных антигенов в составе вакцин или вводить в состав вакцин адьюванты.

К настоящему времени для активной профилактики гриппа в основном применяют расщепленные ("Ваксигрипп" (Санофи, Франция), "Флюарикс" (ГлаксоСмиткляйн, Бельгия) и виросомальные ("Инфлексал" (Берна, Швейцария), "Инвивак" (Солвей, Голландия)) вакцины. Однако существующие вакцины имеют ряд недостатков. Так, вакцины "Ваксигрипп" и "Флюарикс" обладают повышенной реактогенностью при сравнительно невысокой иммуногенности и индуцируют преимущественно гуморальный иммунитет. При этом они практически не индуцируют клеточный иммунитет, который очень важен для защиты организма от вируса гриппа.

В состав вакцин "Инфлексал" и "Инвивак" не входят внутренние антигены (белок нуклеокапсида и мембранный белок), вследствие чего указанные вакцины также не способны активно индуцировать клеточный иммунитет. Кроме того, для формирования виросом в этих вакцинах применяют искусственный липид лецитин, что недостаточно технологично: количество образующихся виросом ниже по сравнению с использованием вирусных фосфолипидов, при этом качество упаковки гемагглютинина в виросомах, содержащих лецитин, существенно хуже.

Наиболее близким аналогом вакцины в соответствии с настоящим изобретением является виросомальная расщепленная вакцина "Грифор", описанная в публикации Мельников С.Я. и др. Разработка и доклинические исследование виросомальной расщепленной гриппозной вакцины нового поколения - "Грифор". ЖМЭИ. 2009. № 1, с. 21-26. Указанная вакцина обладает высокой антигенной и иммуногенной активностью и представляет собой смесь высокоочищенных протективных поверхностных и внутренних антигенов вирусов гриппа типа А и типа В. В публикации не приведено соотношение поверхностного антигена (гемагглютинина) к внутренним антигенам (белок нуклеокапсида и мембранный белок) и не обсуждается влияние этого соотношения на реактогенность препарата. Кроме того, в статье не раскрыто соотношение гемагглютинина и фосфолипидов в составе виросом. Размер виросом в описанной в статье вакцине не был определен с достаточной точностью. По приблизительным оценкам он находится в пределах от 90 до 180 нм.

Таким образом, существует потребность в создании усовершенствованных вакцин для вакцинопрофилактики на основе подробного исследования влияния размера виросом, соотношения гемагглютинина к внутренним антигенам и соотношения гемагглютинина и вирусных фосфолипидов на реактогенность и иммуногенность препарата.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлено микроскопическое изображение вакцины в соответствии с настоящим изобретением.

На фиг. 2 представлена электрофореграмма полуфабрикатов (моновалентов) вакцины в соответствии с настоящим изобретением.

Описание изобретения

Авторы настоящего изобретения установили, что недостатки существующего уровня техники могут быть преодолены созданием вакцины,ключающей собственные вирусные фосфолипиды, полученные в процессе расщепления вирионов. Было обнаружено, что применение собственных фосфолипидов вместо липида лецитина приводит к более эффективному и количественному образованию виросом.

Было установлено, что оптимальный результат по антигенной активности на животных был получен с виросомальными структурами размером 100-150 нм. Виросомальные структуры меньшего размера (50-90 нм) обладали более низкой антигенной активностью, а структуры размером от 160 до 200 нм в существенной мере задерживались при стерилизующей фильтрации препарата и, таким образом, снижали выход лекарственной формы.

Содержание фосфолипидов в предлагаемом препарате, превышающее отношение гемагглютинин:фосфолипиды 1:4, приводит к увеличению агрегативности препарата и увеличению его реактогенности. Соотношение гемагглютинин:вирусные фосфолипиды менее 1:2 приводит к тому, что виросомальные структуры не образуются с высоким выходом, а упаковка гемагглютинина в них является неупорядоченной. В результате этого стабильность в процессе хранения препарата с таким соотношением гемагглютинин:фосфолипиды неудовлетворительно низкая.

Было также установлено, что применение методики расщепления вирусов детергентом октилглюказидом позволяет выделить внутренние антигены (белок нуклеокапсида и мембранный белок) в максимально нативном состоянии, что позволяет достигать повышения их иммуногенности по сравнению с известным уровнем техники. Было установлено, что если соотношение гемагглютинина и внутренних антигенов превышает 1:2,5, то полученный препарат обладает повышенной реактогенностью. Если соотношение гемагглютинин:внутренние антигены становится менее 1:0,5, то препарат индуцирует низкий

уровень клеточного иммунитета у лабораторных животных и обладает неудовлетворительной протективной активностью.

В соответствии с настоящим изобретением предлагается вакцина для профилактики гриппа, представляющая собой смесь поверхностных и внутренних антигенов вирусов гриппа типа А и В, полученная расщеплением очищенных вирионов детергентом октилгликозидом, в которой поверхностные антигены представлены в виде виросом размером 100-150 нм, включающих в свой состав собственные вирусные фосфолипиды, и внутренние антигены представлены в виде мицелл, при соотношении гемагглютинина к внутренним антигенам 1:(0,5-2,5) и соотношении гемагглютинина к вирусным фосфолипидам 1:(2-4), и имеющая коэффициент профилактической эффективности по меньшей мере 75% и индекс эффективности от 6,5 до 8,5.

В результате проведенных исследований было установлено, что вакцина, характеризуемая вышеуказанными признаками, обладает более высокой иммуногенностью и протективной активностью, а также пониженной реактогенностью по сравнению с вакцинами известного уровня техники. Также создание вакцины в соответствии с настоящим изобретением расширяет арсенал противогриппозных вакцин за счет использования новых методов очистки и стабилизации антигенов.

Технические результаты изобретения достигаются за счет применения разработанной авторами технологии расщепления и очистки антигенов, раскрытоей в патенте РФ 2283139 (опубл. 10.09.2006). В результате применения этой технологии поверхностные антигены в составе предлагаемой вакцины представлены в виде виросом, а внутренние антигены - в виде мицелл с полным сохранением их антигенной нативности.

Внутренние антигены вируса гриппа, выделенные с максимальным сохранением их молекулярной структуры, чрезвычайно важны для формирования противогриппозного клеточного иммунитета у вакцинируемых людей, что способствует усилению перекрестного иммунитета против дрейфующих штаммов вируса гриппа.

Морфологический анализ методом электронной микроскопии (пример 1) показал, что в вакцине в соответствии с настоящим изобретением поверхностные антигены представлены в виде виросом размером 100-150 нм. Анализ состава полипептидов (пример 3) показал, что в вакцине соотношение гемагглютинина и внутренних антигенов находится в диапазоне 1:(0,5-2,5). Анализ состава фосфолипидов (пример 2) показал, что отношение гемагглютинина к фосфолипидам составляет 1:(2-4).

Оценки иммуногенных и протективных свойств вакцины в соответствии с настоящим изобретением были получены в результате исследования реакции иммунной системы и организма в целом на экспериментальных животных, а также испытания вакцины на добровольцах.

В результате исследований, описанных в примере 3, было установлено, что вакцина вызывает образование гемагглютинирующих антител у животных с незначительными колебаниями по различным серотипам вируса гриппа, что свидетельствует об эффективности предлагаемой вакцины.

Проведенные доклинические исследования на животных (белых мышах, морских свинках, кроликах) позволили сделать следующие выводы:

по показателям острой и хронической токсичности вакцина для лабораторных животных является нетоксичным и безвредным препаратом;

в условиях хронического эксперимента на лабораторных животных выявлено, что вакцина хорошо переносится, не вызывает изменений в поведении, соматических и вегетативных реакций, а также не оказывает местно-раздражающего действия, т.е. обладает низкой реактогенностью.

На основании I фазы клинического исследования на добровольцах (пример 5А) были сделаны следующие выводы.

1. Имунизация предлагаемой вакциной не сопровождалась развитием нежелательных явлений в поствакцинальном периоде, а возникшие слабовыраженные общие и местные реакции были кратковременны и не вызывали ухудшения состояния здоровья привитых, что свидетельствовало о безопасности препарата и его низкой реактогенности.

2. Имунизация добровольцев вакциной обеспечила следующие показатели иммуногенности к вирусу гриппа типов A(H1N1), A(H3N2) и B:

уровень сероконверсии 55, 50 и 45%;

уровень серопротекции 95, 90 и 100%;

кратность прироста антител 3,8; 3,5 и 2,7 соответственно.

Эти результаты свидетельствуют о высокой иммуногенности предлагаемой вакцины.

На основании II фазы клинического исследования на добровольцах (пример 5Б) были сделаны следующие выводы.

1. Вакцинация добровольцев предлагаемой вакциной в дозе 45 мкг и вакциной сравнения в дозе 45 мкг не сопровождалась развитием тяжелых местных и общих реакций в поствакцинальном периоде, а возникшие слабовыраженные реакции были кратковременны и не вызывали ухудшения состояния здоровья привитых, что свидетельствовало о безопасности препарата.

2. Однократная внутримышечная иммунизация добровольцев предлагаемой вакциной в дозе 45 мкг и вакциной сравнения ("Ваксигрип", Санофи Пастер, Франция) в дозе 45 мкг позволила обеспечить сле-

дующие показатели иммуногенности к вирусу гриппа серотипов H1N1, H3N2 и B.

Предлагаемая вакцина в дозе 45 мкг обеспечивает:

уровень сероконверсии 93,3, 88,4 и 77,4%;

уровень серопротекции 90,6, 93 и 75,2%;

кратность прироста антител 17,4; 10,0 и 6,8 соответственно.

Вакцина сравнения в дозе 45 мкг обеспечивает:

уровень сероконверсии 94,8, 92,2 и 82,3%;

уровень серопротекции 96,1, 94,4 и 84,4%;

кратность прироста антител 24,8; 11,0 и 11,5 соответственно.

В результате изучения длительности сохранения поствакцинального иммунитета было показано, что уровень сохранения величины титров антител у добровольцев, привитых предлагаемой вакциной, был выше по отношению к титрам антител у добровольцев, привитых вакциной сравнения.

Полученные результаты показали, что иммуногенность предлагаемой вакцины соответствует всем критериям, содержащимся в рекомендациях Комитета патентованных медицинских продуктов Евросоюза (Concept paper on the revision of the CPMP/BWP note for guidance on Note for guidance on harmonization of requirements for influenza vaccines. CPMP/BWP/214/96, CPMP/EWP/1045/01CPMP EMEA):

Параметр	Возрастные группы	
	18–60 лет	старше 60 лет
Частота серопротекции	более 70%	более 60%
Частота сероконверсии	более 40%	более 30%
Фактор конверсии	более 2,5	более 2,0

Частота серопротекции = % с титрами анти-ГА выше 1:40.

Частота сероконверсии = % с 4-кратным нарастанием титра анти-ГА после вакцинации в сравнении с титром до вакцинации, или % с титром анти-ГА после вакцинации выше 1:40 среди имевших до вакцинации титр анти-ГА менее 1:10.

Фактор конверсии = средняя кратность увеличения СГТ (СГТпосле/СГТдо).

Иммуногенность предлагаемой вакцины в отношении сохранения титров поствакцинальных антител выше, чем у вакцины сравнения.

Результаты III фазы клинического исследования на добровольцах (пример 5В) позволили рассчитать профилактическую эффективность предлагаемой вакцины, коэффициент эффективности которой в отношении лабораторно-подтвержденного гриппа составляет не ниже 75%, а индекс эффективности равен 6,5-8,5. Предпочтительно коэффициент эффективности равен 85-90%, а индекс эффективности 7,0-7,5.

Высокие показатели профилактической эффективности предлагаемой вакцины по сравнению с известными зарубежными и отечественными вакцинами обусловлены несколькими причинами. Во-первых, в состав предлагаемой вакцины входят виросомы, которые способны увеличивать длительность поствакцинального иммунитета. Кроме того, в состав предлагаемой вакцины входят нативные мицеллы внутренних антигенов (мембранный белка и белка нуклеокапсида), которые помимо поверхностных антигенов способны индуцировать существенный уровень клеточного иммунитета. Наличие клеточного иммунитета существенно увеличивает защиту организма от вируса гриппа.

Данное изобретение иллюстрируется следующими примерами, подтверждающими достижение его технических результатов.

Для исследований использовали экспериментальные серии вакцины с содержание гемагглютинина серотипов А (H1N1 и H3N2) от $10(\pm 1,1)$ до $15(\pm 2,2)$ мкг, серотипа В - $15 \pm 2,2$ мкг в одной прививочной дозе. Для конструирования вакцины использовали следующие вакциновые штаммы вируса гриппа: штамм В/Брисбен/60/08 (B), штамм A/Калифорния/7/2009 (H1N1), штамм A/Перт/16/09 (H3N2).

Пример 1. Морфологические исследования полуфабрикатов (моновалентов) вакцины и готовой лекарственной формы вакцины.

Морфологические изучения полуфабрикатов (моновалентов) вакцины и готовой лекарственной формы вакцины проводили методом электронной микроскопии с использованием технологии негативного контрастирования с использованием микроскопа Jeol 100C с увеличением 50000 раз.

Для объективной оценки структурных особенностей вакцины был проведен сравнительный морфологический анализ следующих препаратов:

1) полуфабриката вакцины, серотипа А(H1N1);

2) полуфабриката вакцины, серотипа А(H3N2);

3) полуфабриката вакцины, серотипа В;

4) готовая лекарственная форма вакцины в соответствии с изобретением;

5) очищенного и концентрированного препарата вирионов вируса гриппа серотипа А(H1N1), из которого получен соответствующий полуфабрикат;

6) очищенного и концентрированного препарата вирионов вируса гриппа серотипа А(H3N2), из ко-

торого получен соответствующий полуфабрикат;

7) очищенного и концентрированного препарата вирионов вируса гриппа серотипа В, из которого получен соответствующий полуфабрикат.

В процессе работы было исследовано 18 электронно-микроскопических сеточек, содержащих вышеперечисленные материалы, и просмотрено 500 полей зрения. Из указанного числа полей зрения были выбраны те, которые содержали структуры, наиболее типичные для данного препарата.

При исследовании препаратов электронной микроскопией выявлены морфологические различия между вирионами вируса гриппа серотипов А(H1N1), А(H3N2) и В, с одной стороны, и вирусоспецифическими структурами - виросямами, содержащимися в полуфабрикатах предлагаемой вакцины, полученных из соответствующих серотипов вируса гриппа, с другой.

Содержавшиеся в полуфабрикатах предлагаемой вакцины виросямы характеризовались относительной мономорфностью и меньшими размерами по сравнению с вирионами соответствующих серотипов вируса гриппа. Виросямы имели преимущественно шаровидную форму и диаметр от 100 до 150 нм (фиг. 1). Гемагглютинины, выявляемые на поверхности виросям, имели четко выраженную морфологию, вертикальную ориентировку относительно липидной мембраны и достаточно плотную упаковку. В полуфабрикатах предлагаемой вакцины кроме виросям были обнаружены также мицелярные образования, состоящие из структурированного мембранных белка и из структур нуклеокапсида вируса гриппа.

Пример 2. Определение количества фосфолипидов.

Определение количества фосфолипидов в предлагаемой вакцине проводилось с помощью коммерческого диагностического набора фирмы Sentinel Diagnostics (Италия, каталожный номер 17320).

Метод основан на том, что под действием фосфолипазы-D фосфолипиды гидролизуются до холина и фосфатидной кислоты. Затем холин окисляется холиноксидазой до бетаина и перекиси водорода, которая в присутствии пероксидазы реагирует с 4-аминоантитирином и производными фенола с образованием комплекса красного цвета. Оптическая плотность образующегося стабильного комплекса пропорциональна содержанию фосфолипидов в пробе. Калибровочные стандарты фосфолипидов (3 мг/мл) прилагаются в составе набора. Расчет количества фосфолипидов в составе предлагаемой вакцины проводился путем сравнения оптической плотности калибровочного стандарта и образцов вакцины. Согласно полученным результатам в различных полуфабрикатах вакцины (различные серотипы) отношение содержания гемагглютинина к содержанию фосфолипидов в 1 мл препарата существенно различалось. Наибольшее количество фосфолипидов (отношение 1:4) наблюдалось в полуфабрикатах серотипа В. В полуфабрикатах серотипов H1N1 и H3N2 это соотношение было в диапазоне 1:(2-3). Следует отметить, что это соотношение зависело также и от конкретной партии полуфабриката и зависело от технологии осаждения внутренних структур из полуфабриката. В конечном сведенном препарате вакцины соотношение гемагглютинина к фосфолипидам было в диапазоне 1:(2-4).

Пример 3. Изучение состава полипептидов в полуфабрикатах вакцины и препаратах очищенных вирионов.

Для сравнительного изучения состава полипептидов в полуфабрикатах вакцины и препаратах очищенных вирионов был использован метод электрофореза в 10% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия в нередуцирующих условиях. Исследования проводились согласно МУК 4.1/4.2.558.96.

Для определения чистоты, гомогенности и молекулярной массы генно-инженерных продуктов применяют метод вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) в нередуцирующих условиях с последующей окраской геля как Кумасси ярко-голубым R-250. Образование комплекса SDS с белком устраняет различия между белками, связанные с их зарядом, и переводит молекулы белков в конформацию, при которой радиус Стокса является функцией молекулярной массы белка. При соблюдении этих условий подвижность белков отражает их молекулярные массы.

Полимеризацию геля ведут в ячейке, образованной стеклами и прокладками, определяющими размер и толщину геля. Сборку ячейки проводят в соответствии с инструкцией по работе с конкретным типом прибора для вертикального электрофореза. Описание метода проводится на примере аппарата "Протеан 11" (Био-Рад, США). Для данного прибора размеры стекол ячейки составляют: внешнее стекло - 22×20 см, внутреннее стекло - 20×20 см. Размеры прокладок: длина - 20 см, ширина - 18 см, толщина - 0,75-1,0 мм. При наличии приборов с другими характеристиками необходимо внести соответствующие корректировки в постановку испытаний.

Для проведения электрофореза нижнюю камеру аппарата для электрофореза заполняют электродным буферным раствором и вставляют в нее электрофоретическую ячейку с гелем. Верхний резервуар заполняют электродным буферным раствором, удаляют из лунок пузырьки воздуха. Под слой буферного раствора в лунку вносят исследуемые образцы. Электрофорез проводят при температуре 10-14°C в режиме постоянного тока. При прохождении фронта красителя через концентрирующий гель сила тока составляет 10-12,5 мА на 1 см² сечения геля (20-25 мА/гель). После вхождения фронта красителя в нижний разделяющий слой на 5-7 мм силу тока увеличивают до 20 мА на 1 см² сечения геля (40 мА/гель). После продвижения красителя на 14 см от нижнего края концентрирующего геля ток отключают, отделяют гель от стекол ячейки и переносят в кювету для окрашивания. Для того чтобы можно было выявить

присутствие в исследуемом образце агрегатов и других компонентов, не входящих в гель, концентрирующий гель полностью не обрезают, оставляя 0,5-10 мм. В случае необходимости можно обрезать часть нижнего геля по фронту красителя. Нанесение образцов на гель проводят в следующем порядке. В лунки 1 и 10 вносят соответствующий (с бета-меркаптоэтанолом или без) буфер для приготовления образцов, разбавленный деионизованной водой в 4 раза. В лунки 2 и 9 вносят по 7 мкл смеси стандартных белков, например, фирмы "Фармация", Швеция. В остальные лунки вносят исследуемые образцы. При окрашивании Кумасси ярко-голубым R-250 вносят попарно такие объемы образца, чтобы количество белка в них составляло соответственно 10 и 40 мкг. При окрашивании геля нитратом серебра в зависимости от препарата в лунки вносят 2-5 мкг белка. Параллельно в одну из лунок вносят 0,002-0,01 мкг белка (в зависимости от чувствительности выявления минимальных количеств белка в данных условиях).

Для окрашивания геля Кумасси ярко-голубым R-250 и его последующего обесцвечивания гель фиксируют 1 ч в фиксирующем растворе, после чего окрашивают в течение 16 ч. Затем окрашивающий раствор сливают, гель 2-3 раза сполоскивают обесцвечивающим раствором и помещают в аппарат для обесцвечивания, заполненный обесцвечивающим раствором. Обесцвечивание проводят в течение 15 мин при напряжении 24 В. Гель вынимают из аппарата для обесцвечивания и сполоскивают раствором для обесцвечивания и деионизированной водой. Сканирование обесцвеченного геля проводили с помощью аппарата Gel Dock 170-8170.

В процессе анализа в одном и том же геле проводили сравнительный анализ полипептидов препаратов полуфабрикатов одного серотипа вируса гриппа, а также препаратов очищенных вирионов, из которых был получен соответствующий полуфабрикат.

Эти результаты представлены на электрофорограмме (фиг. 2).

Из представленных результатов следует, что в составе полуфабриката вакцины в соответствии с изобретением обнаруживаются те же полипептиды, что и в препарате очищенных вирионов, из которых был получен этот полуфабрикат. Но соотношение полипептида НА0 к полипептиду М1 в полуфабрикатах было значительно выше такового в препарате очищенных вирионов.

Соотношение поверхностных и внутренних антигенов в предлагаемой вакцине меняется в зависимости от серотипа вируса, а также от технологических условий получения конкретной серии. Так в процессе получения полуфабриката очищенные вирионы разрушаются детергентом и поверхностные антигены, липиды вирусной мембранны, а также мембранный белок перешли в растворимое состояние. После удаления детергента и части вирусных липидов поверхностные антигены образовали псевдовирусные структуры виросомы, а мембранный белок образовал мицеллярные структуры различного размера. На конечной стадии технологического процесса, а именно стерилизующей фильтрации, часть наиболее крупных мицелл мембранный белка была задержана стерилизующей мембраной и, таким образом, не попала в состав полуфабриката вакцины.

Таким образом, экспериментально установлено, что соотношение гемагглютинина и внутренних антигенов составляет 1:(0,5-2,5).

Пример 4. Доклинические исследования на животных.

Доклинические исследования безопасности предлагаемой вакцины в соответствии с настоящим изобретением проводят на основании методических рекомендаций Министерства здравоохранения и социального развития РФ "Доклинические испытания эффективности и безопасности новых иммунобиологических лекарственных препаратов" утверждены и введены в действие Приказом директора ФГБУ "ГИСК им. Л.А. Тарасевича" Минздравсоцразвития России от 31.12.2010 № 46-ОД.

А) Оценка острой токсичности предлагаемой вакцины.

Изучение острой токсичности вакцины в соответствии с изобретением было проведено на 40 мышах массой 18-20 г, рандомизированных на 2 группы - опытную и контрольную. Мышам контрольной группы однократно внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл физиологического раствора, а опытной группе 10 мышам внутрибрюшинно вводили предлагаемую вакцину в дозе по 2250 мкг/кг (45 мкг/мышь) по гемагглютинину и 10 мышам - в дозе по 0,65 мкг/кг (0,013 мкг/мышь). Общая продолжительность наблюдения за животными при определении острой токсичности составила 7 дней.

На 2-е сутки дислокацией шейных позвонков были умерщвлены по 4 мыши из опытной и контрольной групп, вскрыты и осмотрены. У всех этих мышей были забраны внутренние органы, взвешены и помещены в 10% формалин для дальнейших гистологических исследований. За мышами опытной и контрольной групп было продолжено наблюдение. Состояние мышей оценивали по внешнему виду, поведению, изменению массы тела и пищевой активности. За время наблюдения гибели белых мышей при однократном введении предлагаемой вакцины в дозе по 2250 мкг/кг и 0,65 мкг/кг не отмечено.

На 8-е сутки 4-х мышей умерщвляли, проводили патологоанатомическую оценку внутренних органов и отбирали пробы крови. После взвешивания внутренних органов и определения их массы на момент забоя вычисляли коэффициенты масс (КМ) внутренних органов, после чего был проведен статистический анализ КМ и оценена достоверность полученных результатов с помощью критерия Стьюдента.

За период наблюдения за группой животных гибели белых мышей не отмечено. У экспериментальных животных не изменились поведение, двигательная активность, аппетит. Место нанесения препаратов у всех опытных мышей чистое, без воспаления и раздражения. Данные измерения массы тела мышей

опытной группы на 2 и 8 сутки не отличалась от показателей массы тела животных контрольных групп больше чем на 5-8% (табл. 1).

Таблица 1

Динамика изменения массы тела мышей после введения предлагаемой вакцины

№ группы животных	Срок забоя	Препарат	Масса тела, г		
			Исходная	2 сутки	8 сутки
1.	2 сут.	Физраствор	19,4±0,2	19,8±0,4	-
2.		Вакцина 2250 мкг	18,9±0,4	19,3±0,3	-
3.		Вакцина 0,65 мкг	19,3±0,3	19,5±0,4	-
4.	8 сут.	Вакцина Физраствор	19,4±0,2	-	20,6±0,4
5.		Вакцина 2250 мкг	18,9±0,4	-	19,9±0,3
6.		Вакцина 0,65 мкг	19,3±0,3	-	20,8±0,5

Анализ динамики результатов морфологических показателей крови при однократном введении предлагаемой вакцины в дозе 0,65 мкг/кг и 2250 мкг/кг не выявил изменений.

Б) Оценка хронической токсичности предлагаемой вакцины.

При оценке хронической токсичности в качестве контроля служили экспериментальные животные, которым в качестве плацебо вводили физиологический раствор (0,85% раствор натрия хлорида). Наблюдение за животными проводили ежедневно после введения препарата. Оценивали общее состояние, двигательную активность, поедание корма.

Изучение хронической токсичности вакцины было проведено на 40 мышах массой 18-20 г, рандомизированных на 2 группы - опытную и контрольную. Мышам контрольной группы подкожно вводили по 0,2 мл физиологического раствора, а опытной группе ежедневно в течение 14 суток подкожно вводили по 0,2 мл вакцины в суммарной дозе 2250 мкг/кг по гемагглютинину (45 мкг/20 г мыши). Общая продолжительность наблюдения за животными при определении острой токсичности составила 15 дней.

Внутрибрюшинное введение изучаемого препарата во всех дозах не вызывало гибели экспериментальных животных, во время наблюдения за животными не отмечено изменение двигательной активности, достоверно значимого изменения веса, аппетита, не было отмечено воспалительных явлений или раздражения слизистой.

На 1-е сутки дислокацией шейных позвонков были умерщвлены по 4 мыши из опытной и контрольных групп, вскрыты и осмотрены. У всех этих мышей были забраны внутренние органы, взвешены и помещены в 10% формалин для дальнейших гистологических исследований. За мышами опытной и контрольной групп было продолжено наблюдение.

На 15-е сутки 4 мыши умерщвляли, проводили патологоанатомическую оценку внутренних органов и отбирали пробы крови. После взвешивания внутренних органов и определения их массы на момент забоя вычисляли коэффициенты масс (КМ) внутренних органов, после чего был проведен статистический анализ КМ и оценена достоверность полученных результатов с помощью критерия Стьюдента (табл. 2).

Таблица 2

Динамика изменения массы тела мышей после введения предлагаемой вакцины в течение 14 суток

№ группы	Срок забоя	Препарат	Масса тела, г		
			Исходная	7 сутки	15 сутки
1.	7 сут.	Физраствор	19,1±0,2	19,6±0,3	-
2.		Вакцина	19,6±0,4	19,8±0,2	-
3.	15 сут.	Физраствор	19,1±0,2	-	21,3±0,4
4.		Вакцина	19,6±0,4	-	20,9±0,3

Следовательно, длительное подкожное введение предлагаемой вакцины не вызывало выраженного токсического эффекта у белых мышей за время наблюдения, это подтверждается данными морфологического и биохимического исследования крови.

Б) Оценка местно-раздражающего действия вакцины (мышиная модель).

Местно-раздражающее действие вакцины оценивали на мышах в плантарном тесте путем введения

вакцины в подушечку задней лапки. Опытной группе № 1 вводили вакцину однократно в подушечку задней лапки в объеме 50 мкл (0,05 мкг/кг, 1/10 человеческой дозы). Опытной группе № 2 вводили вакцину однократно в подушечку задней лапки в объеме 50 мкл (0,025 мкг/кг, 1/20 человеческой дозы).

Неспецифическую воспалительную реакцию на введение вакцины оценивали с 24 ч и до 7 суток включительно. Индекс данной реакции определяли как процент прироста массы опытной лапки после введения вакцины по отношению к массе контрольной лапки, в которую вводили физиологический раствор (табл. 3).

Таблица 3

Результаты по оценке местно-раздражающего действия вакцины в плантарном teste

Сроки регистрации	Дозы вакцины	Индекс реакции
1 сутки	0,025 мкг/кг	3,5±0,5
	0,05 мкг/кг	4,1±0,9
2 сутки	0,025 мкг/кг	1,5±0,8
	0,05 мкг/кг	1,2±1,1
7 сутки	0,025 мкг/кг	1,3±0,7
	0,05 мкг/кг	0,9±0,6

Представленные данные свидетельствуют, что предлагаемая вакцина не вызывает местных воспалительных реакций на месте введения.

Г) Оценка местно-раздражающего действия предлагаемой вакцины (кролики).

Определение местно-раздражающего действия проводили на модели глаз кроликов по модифицированному методу Драйза. В группе по оценке местно-раздражающего действия вакцины использовали 3 кролика. Контролем служил левый глаз, в который капали по 50 мкл физиологического раствора, а в правый глаз на слизистую оболочку капали по 50 мкл изучаемого вакцинного препарата в дозе 45 мкг/2,5 кг кролика. Препарат наносили за веко кролика и придерживали веки закрытыми в течение 1 с. Реакцию регистрировали через 24, 48, 72 ч и на 7 сутки. Исследуемый материал оказывает раздражающее действие на глаза, если у 3 или более животных из опытной группы наблюдалась положительная реакция.

При регистрации результатов конъюнктивальной пробы у 1-го кролика через 24 ч отмечалось расширение сосудов конъюнктивы, которое исчезало в течение последующих суток. У остальных кроликов применение предлагаемой вакцины не вызывало местного раздражающего действия.

Д) Изучение антигенной активности предлагаемой вакцины.

Готовят двукратные разведения сывороток в лунках плексигласовой доски, начиная с 1:10 до 1:640 и выше в объеме 0,2 мл. К каждому разведению сыворотки добавляют по 0,2 мл рабочей дозы антигена (4 АЕ). Смесь встряхивают, оставляют при температуре 20±2°C на 30 мин, затем в каждую лунку добавляют по 0,4 мл 1%-ной суспензии куриних эритроцитов. Смесь повторно встряхивают, оставляют при температуре 20±2°C в течение 40-45 мин (до оседания эритроцитов в контроле), после чего производят учет результатов реакции.

При наличии специфических антител в сыворотке наступает задержка агглютинации эритроцитов. За титр сыворотки принимают предельное разведение, вызывающее полную задержку гемагглютинации. Задержка гемагглютинации указывает на соответствие типа антигена и взятой сыворотки; отсутствие задержки гемагглютинации свидетельствует о несоответствии типа взятой сыворотки. Препарат считают специфичным, если он не реагирует в РТГА с гетерологичной сывороткой.

Для сравнительного изучения на мышах антигенной активности вакцин против гриппа шести беспородным белым мышам массой 18-20 г двукратно внутрибрюшинно с интервалом 14 суток вводили по 0,5 мл вакцины. Через 12-14 суток после повторной иммунизации полученные сыворотки мышей исследовали с гомологичными антигенами вакцины в РТГА согласно МУ 3.3.2.1758-03 "Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа", утв. 28 сентября 2003 г.

Препарат должен вызывать нарастание антител в титрах не ниже 1:40 к каждому из трех входящих в ее состав штаммов вирусов гриппа типа А и В. В качестве контроля брали смесь сывороток от 2-3 неиммунных мышей.

Результаты изучения антигенной активности предлагаемой вакцины и вакцины сравнения представлены в табл. 4.

Таблица 4

Антигенная активность предлагаемой вакцины и вакцины сравнения против гриппа

Наименование вакцины	Тип вируса / Титр антител:		
	A (H1N1)	A (H3N2)	B
Предлагаемая вакцина	1 : 320	1 : 320	1 : 160
Вакцина сравнения	1 : 80	1 : 80	1 : 40
Контроль (сыворотка крови невакцинированных животных)	<1:10	<1:10	<1:10

Полученные результаты свидетельствуют о том, что вакцина обладает более высокой антигенной активностью, чем вакцина сравнения.

Пример 5. Клинические исследования на добровольцах.

А) Первая фаза клинических исследований (изучение безопасности и иммуногенности на ограниченном контингенте добровольцев).

Целью клинического исследования было изучение реактогенности, безопасности и иммуногенности препарата.

В клиническом исследовании приняли участие 40 человек, в возрасте от 18 до 50 лет, полностью соответствующие критериям включения и исключения протокола клинических исследований. Методом случайной выборки все добровольцы были разделены на 2 группы. В 1 группе 20 человек были привиты предлагаемой вакциной с содержанием гемагглютинина (НА) - 45 мкг/доза - по 15 мкг НА штаммов вирусов гриппа серотипов H1N1, H3N2 и B. Во 2-й группе (контрольной) - 20 человек, в качестве плацебо получили раствор натрия хлорида изотонического в объеме 0,5 мл.

Вакцину вводили однократно внутримышечно (в дельтовидную мышцу). Наблюдение за добровольцами проводили в течение 28 дней после вакцинации.

При лабораторно-инструментальном исследовании общего и биохимического анализов крови, общего анализа мочи, общих IgM и IgA установлено, что все показатели были в пределах нормы. Вакцинация не сопровождалась развитием нежелательных явлений у добровольцев в поствакцинальном периоде, а возникшие слабовыраженные местные и общие реакции были кратковременны и не вызывали ухудшения состояния здоровья привитых, что свидетельствует о низкой реактогенности и безопасности вакцины. Иммуногенность предлагаемой вакцины (табл. 5) определяли в соответствии с указаниями, приведёнными в МУ 3.3.2.1758-03, "Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа", утв. 28 сентября 2003 г.

Таблица 5

Оценка иммуногенности предлагаемой вакцины

Препарат	Штамм	Уровень сероконверсии		Уровень серопротекции		ФС	CPMP
		Абс.	%	Абс	%		
Предлагаемая вакцина	A (H1N1)	11	55	19	95	3,8	+
	A (H3N2)	10	50	18	90	3,5	+
	B	9	45	20	100	2,7	+
Плацебо	A (H1N1)	0	0	16	80	1,0	-
	A (H3N2)	1	5	12	60	1,0	-
	B	0	0	17	85	0,9	-

ФС - фактор сероконверсии.

CPMP - соответствие требованиям CPMP.

На основании I фазы клинического исследования были сделаны следующие выводы.

1. Иммунизация предлагаемой вакциной не сопровождалась развитием нежелательных явлений в поствакцинальном периоде, а возникшие слабовыраженные общие и местные реакции были кратковременны и не вызывали ухудшения состояния здоровья привитых, что свидетельствовало о безопасности препарата.

2. К 28 дню поствакцинального периода наблюдалось снижение среднего уровня общего IgE ($P_{cp}^{0-28} < 0,001$), что, вероятно, связано с входящими в состав вакцины специфическими структурами -

виросямами, способными изменять соотношение Th1/Th2 в сторону Th1.

3. Иммунизация добровольцев вакциной обеспечила следующие показатели иммуногенности к вирусу гриппа типов A(H1N1), A(H3N2) и B:

уровень сероконверсии 55, 50 и 45%;
уровень серопротекции 95, 90 и 100%;
кратность прироста антител 3,8; 3,5 и 2,7 соответственно.

У добровольцев с исходным титром антител, меньшим или равным 1:20, после вакцинации предлагаемой вакциной наблюдался 4-кратный прирост антител в 100% случаев к вирусу гриппа типа А (H1N1) и В и в 70% - к вирусу гриппа типа А (H3N2).

Б) Вторая фаза клинических исследований (изучение безопасности и иммуногенности на расширенном контингенте добровольцев).

В простом слепом сравнительном клиническом исследовании приняли участие 300 волонтеров, по 150 человек на каждой базе, полностью соответствующие критериям включения и исключения протокола. Методом случайного распределения все добровольцы были поделены на 2 группы.

В 1 группе 50 человек были привиты вакциной с содержанием гемагглютинина 45 мкг/доза - по 15 мкг гемагглютинина штаммов вирусов гриппа серотипов H1N1, H3N2 и В.

В 2 группе 50 человек были привиты препаратом сравнения (вакциной "Ваксигрип") с содержанием гемагглютинина - 45 мкг/доза - по 15 мкг гемагглютинина штаммов вирусов гриппа серотипов H1N1, H3N2 и В.

Полученные при исследовании данные позволили сделать следующие выводы.

1. Вакцинация добровольцев предлагаемой вакциной в дозе 45 мкг и вакциной сравнения в дозе 45 мкг не сопровождалась развитием тяжелых местных и общих реакций в поствакцинальном периоде, а возникшие слабо выраженные реакции были кратковременны и не вызывали ухудшения состояния здоровья привитых, что свидетельствовало о безопасности препарата.

2. Однократная внутримышечная иммунизация добровольцев предлагаемой вакциной в дозе 45 мкг и вакциной сравнения в дозе 45 мкг позволила обеспечить следующие показатели иммуногенности к вирусу гриппа серотипов H1N1, H3N2 и В.

Предлагаемая вакцина в дозе 45 мкг обеспечивает
уровень сероконверсии 93,3%, 88,4% и 77,4%;
уровень серопротекции 90,6%, 93% и 75,2%;
кратность прироста антител 17,4; 10,0 и 6,8 соответственно.

Вакцина сравнения в дозе 45 мкг обеспечивает
уровень сероконверсии 94,8, 92,2 и 82,3;
уровень серопротекции 96,1, 94,4 и 84,4%;
кратность прироста антител 24,8; 11,0 и 11,5 соответственно.

Полученные результаты показали, что иммуногенность предлагаемой вакцины, а также вакцины сравнения практически одинаковы и соответствуют всем критериям CPMP EMEA.

Согласно рекомендациям ВОЗ инактивированные гриппозные вакцины должны быть изучены на предмет длительности поствакцинального иммунитета на период 6 месяцев, т.е. 180 дней. В результате изучения длительности сохранения поствакцинального иммунитета было показано, что уровень сохранения величины титров антител у добровольцев, привитых предлагаемой вакциной, был выше по отношению к титрам антител у добровольцев, привитых вакциной сравнения (табл. 6).

Таблица 6
Оценка длительности поствакцинального иммунитета

Препарат	Штамм	Уровень сероконверсии, %		Уровень серопротекции, %		Фактор сероконверсии	
		21 дн.	180 дн.	21 дн.	180 дн.	0-21 дн.	0-180 дн.
Вакцина сравнения	A (H1N1)	90,4	86,1	92,9	86,1	15,7	9,7
	A (H3N2)	96,2	72,2	94,6	80,5	11,3	6,0
	B	90,2	72,2	96,2	75,0	12,7	7,1
Предлагаемая вакцина	A (H1N1)	90,3	87,1	96,8	93,5	18,3	12,8
	A (H3N2)	96,6	74,2	96,8	87,1	17,5	8,9
	B	90,3	83,9	90,3	77,4	10,0	6,1

Б) Третья фаза клинических исследований (изучение профилактической эффективности).

Профилактическую эффективность вакцины оценивали по двум показателям: индексу эффективности и коэффициенту эффективности в соответствии с санитарными правилами СП 3.3.2.561-96.

Для изучения профилактической эффективности предлагаемой вакцины в многоцентровом, контролируемом, проспективном, рандомизированном исследовании приняли участие около 6000 добровольцев (мужчины и женщины) в возрасте от 18 лет и старше, рандомизированные в две группы. Основная группа добровольцев (группа вакцинированных) была привита предлагаемой вакциной в дозе 45 мкг, группе наблюдения вакцину не вводили.

В соответствии с рекомендациями заболевание "грипп" диагностировали на основании клинических данных. Для подтверждения клинического диагноза "грипп" среди вакцинированных и невакцинированных участников исследования проведены лабораторно-серологические исследования парных сывороток в первые дни заболевания и через 14-21 день, а также оценены клиническое течение и тяжесть заболевания. Общая продолжительность наблюдения для каждого участника клинического исследования составила не менее 6 месяцев.

Проведенный в сформированных группах добровольцев анализ заболеваемости гриппом в эпидемический сезон 2007-2008 гг. позволил рассчитать, что профилактическая эффективность предлагаемой вакцины составляет по меньшей мере 79,5% при индексе эффективности, равном по меньшей мере 6,8.

Профилактическую эффективность вакцины оценивали по двум показателям:

индекс эффективности: $K = b/a$,

где K - индекс эффективности;

a - заболеваемость на 1000 среди вакцинированных;

b - заболеваемость на 1000 среди невакцинированных.

коэффициент эффективности: $E = 100 \times (b-a)/b$,

где E - коэффициент эффективности;

a - заболеваемость среди вакцинированных;

b - заболеваемость среди невакцинированных.

В случае заболевания и лабораторного подтверждения диагноза "грипп" у добровольцев была споставлена заболеваемость, оценены клиническое течение и тяжесть заболевания, возникновение осложнений.

В основной и контрольной группах добровольцев на всем протяжении исследования проводили оценку заболеваемости и тяжести клинического течения гриппа, а также осуществляли дифференциальную диагностику гриппа с другими вирусными и бактериальными инфекциями. Грипп диагностировали на основании клинических данных, а именно выявления основных симптомов: высокая температура, достигающая 39-40°C, длительностью около 3-4 дней; озноб; насморк; першение и боль в горле; сухой, "лающий" кашель, который сохранялся в течение 2 недель; общая выраженная слабость, недомогание, разбитость; боль и "ломота" в мышцах и суставах; одышка; боль при движении глаз; конъюнктивит.

Кроме того, для подтверждения клинического диагноза грипп среди вакцинированных и невакцинированных участников исследования проведены лабораторно-серологические исследования парных сывороток в первые дни заболевания и через 14-21 день, а также оценены клиническое течение и тяжесть заболевания. Общая продолжительность наблюдения для каждого участника клинического исследования составила не менее 6 месяцев.

Проведенный анализ заболеваемости гриппом и ОРВИ в эпидемический сезон 2007-2008 гг. у привитых добровольцев и наблюдательной группы (невакцинированные) в Санкт-Петербурге, Томске и Перми позволил рассчитать профилактическую эффективность предлагаемой вакцины, коэффициент эффективности которой в отношении лабораторно-подтвержденного гриппа составляет 86,5%, а индекс эффективности 7,4.

Ранее в России в рамках государственных испытаний проводилась оценка профилактической эффективности различных зарубежных вакцин против гриппа. В результате этого исследования было показано, что для вакцины "Инфлювак" (Солвей Фарма, Голландия) индекс эффективности составил 4,5, а коэффициент эффективности - 77,7%. Для вакцины "Ваксигрип" (Санофи Пастер, Франция) коэффициент эффективности вакцины составил 79%, а индекс эффективности составил 4,7.

Вакцина "Грипол" (Петровакс, Россия) является наиболее применяемой отечественной вакциной. В ходе государственных испытаний было установлено, что данная вакцина имеет коэффициент эпидэффективности 59,3%; а индекс эпидэффективности равен 2,0.

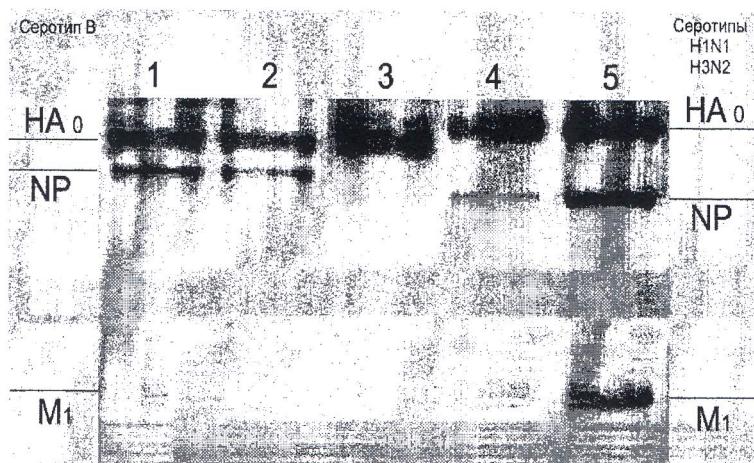
Приведенные выше результаты исследований подтверждают более высокие показатели профилактической эффективности предлагаемой вакцины по сравнению с известными зарубежными и отечественными вакцинами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вакцина для профилактики гриппа, представляющая собой смесь поверхностных и внутренних антигенов вирусов гриппа типа А и В, полученная расщеплением очищенных вирионов детергентом октилгликазидом, в которой поверхностные антигены представлены в виде виросям размером 100-150 нм, включающих в свой состав собственные вирусные фосфолипиды, и внутренние антигены представлены в виде мицелл, причем соотношение гемагглютинина к внутренним антигенам составляет 1:(0,5-2,5), а к вирусным фосфолипидам составляет 1:(2-4).



Фиг. 1



1. Вакцина серотип В, штамм В/Брисбен/60/08, серия 1
2. Вакцина серотип В, штамм В/Брисбен/60/08, серия 5
3. Вакцина серотип H1N1, штамм А/Калифорния/7/2009
4. Вакцина серотип H3N2, штамм А/Перт/16/09
5. Препарат очищенных вирионов серотип H3N2, штамм А/Перт/16/09

Фиг. 2



Евразийское патентное
ведомство (ЕАПВ)

Адрес:
Россия,
109012, Москва,
Малый Черкасский пер., 2

Телефон: (495) 411-6163
Факс: (495) 621-2423

E-mail: info@eapo.org
<http://www.eapo.org>