



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122732** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C12N 7/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 07521	(72) Винахідник(и): Бузун Андрій Ігорович (UA), Кольчик Олена Володимирівна (UA), Стегній Марина Юріївна (UA), Рудова Наталія Генадіївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.07.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.01.2018	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.01.2018, Бюл.№ 2	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)

(54) ВАКЦИНА ПРОТИ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ, ЦИРКОВІРУСНОЇ ТА ПАРВОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ СВИНЕЙ АСОЦІЙОВАНА ІНАКТИВОВАНА ЕМУЛЬСОВАНА

(57) Реферат:

Вакцина асоційована емульсована інактивована проти репродуктивно-респіраторного синдрому (РРСС), цирковірусної (ЦВІС) та/або парвовірусної інфекції свиней (ПВІС) містить антигенний матеріал збудників РРСС та ПВІС, репродукованих у чутливих біологічних системах, інактивованих хімічними сполуками, емульсованих у оливному ад'юванті. В якості протективного антигенів вона містить антигенні матеріали штамів "ВД-09" вірусу РРСС, "Е-2" вірусу ПВІС та додатково "І-1024" вірусу ЦВІС у ефективній концентрації.

UA 122732 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної вірусології та біотехнології і її можна використовувати для розроблення та виготовлення засобів специфічної профілактики репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (PPCC), другого типу цирковірусної (ЦВІС) та/або парвовірусної інфекцій (ПВІС).

За епізоотологічною класифікацією PPCC, ЦВІС та ПВІС з низкою інших хвороб належать до групи репродуктивно-неонатальних інфекцій свиней (PHIC), які характеризуються утворенням стаціонарних осередків асоційованих інфекцій за рахунок укорінення їхніх збудників у маточному ядрі свиноголові'я та періодичними спалахами масових репродуктивних захворювань свиноматок і пневмоентеритів поросят переважно неонатального віку. Це пов'язано з виразними імуносупресорною та асоціативною активністю збудників PPCC та ЦВІС: вони вибірково руйнують макрофаги легень, кишечника та репродуктивних органів свиней і активно асоціюються з парвовірусом, вірусом хвороби Ауескі, низкою бактерій тощо.

На сьогодні головним заходом боротьби з PPCC, ЦВІС та ПВІС є вакцинопрофілактика з застосуванням живих та інактивованих вакцин у вигляді як моно-, так і асоційованих вакцинних препаратів. Переваги живих вакцин щодо технологічності виготовлення та простоти використання є поза сумнівом. Проте їх реверсibilitas часто призводить до поставакцинальних ускладнень і навіть спалахів інфекцій, проти яких вони спрямовані. З іншого боку, у зв'язку з імуносупресивними властивостями цих збудників, які проявляються навіть у виробничих штамів, імунна реакція на їх введення не стабільна. Насамкінець, на світовому рівні зареєстровано суттєву мінливість збудників PPCC та ЦВІС, якій протистояти шляхом застосування живих вакцин практично не можливо. Більше того, атенуйовані вакцинні штами можуть генетично та іншими шляхами взаємодіяти з польовими вірулентними варіантами збудників PPCC, ЦВІС та/або ПВІС і, отже, спричинювати негативні епізоотичні наслідки (емерджентні форми PHIC, поява нових антигенних варіантів вірусів тощо). Через це рекомендовано використовувати живі вакцини проти PHIC на першому етапі боротьби з ними, а на заключних етапах - застосовувати інактивовані вакцини за різними схемами.

З інактивованих вакцин, що використовуються у світовому свиноводстві для специфічної профілактики PPCC, ЦВІС та ПВІС, найбільш ефективними є препарати емульсин-вакцин (оливні вакцини). Більшість з них є моновакцинами - тобто містять антигенний матеріал лише одного з зазначених збудників: їх послідовне застосування у разі збільшує трудовитрати на вакцинопрофілактику відразу трьох чи двох з зазначених інфекцій, призводить до додаткових стресів у свиноголові'я. Цей недолік є дуже суттєвим, адже практично у всіх свиногосподарствах Східної Європи циркулює збудник ЦВІС, а сім-вісім з десяти є одночасно неблагополучними і по PPCC, і по ПВІС. Зазначений недолік частково усувається створенням та застосуванням двовалентних асоційованих вакцин проти PPCC і ЦВІС, PPCC і ПВІС чи ЦВІС і ПВІС.

Так, відомою в Україні є імпортна вакцина проти PPCC, ПВІС, лептоспірозу та бешихи свиней асоційована інактивована оливна, яка містить антигенні матеріали збудників зазначених інфекцій у оптимальних співвідношеннях [Пат. США № 5690940, 424-229.1, 25.11.97. вакцина проти PPCC, ПВІС, лептоспірозу та бешихи свиней асоційована інактивована оливна]. Проте вона не захищає свиноголові'я від приживлення польових варіантів збудників PPCC і ПВІС, а в Україні - у багатьох випадках і від клінічного захворювання свиней (мертво́родів, прохолосту і малопліддя свиноматок).

Відома імпортна вакцина проти ЦВІС, ПВІС та лептоспірозу сероварів Pomona й Tarassovi, інактивованих формальдегідом, яка у оптимальних співвідношеннях містить інактивовані димером етиленіміну віруси ЦВІС (штам) та ПВІС (штам 1-82 з титром гемаглютинінів 1:256-1:1512 ГАО/0,025 см³). Як ад'ювант вакцина містить гідроокис алюмінію та білок сироватки крові [Пат. США № 5866401, 435-237, 02.02.99.]. Застосування у вакцині для свиней цього ад'юванта потребує проводити не менш як триразове щеплення тварин у наростаючих дозах; і навіть за цих технологічно ускладнених умов поствакцинний імунітет свиней від таких вакцин залишається малотривалим (до 6 міс.).

Найбільш близькою за сукупністю суттєвих ознак до рішення, що заявляється, є вакцина проти PPCC і ПВІС емульсована інактивована, яка містить антигенні матеріали штамів "БД-ДЕП" вірусу PPCC та "Вл-94-ДЕП" парвовірусу свиней", що розмножено у чутливій біологічній системі, піддано інактивації і у ефективному співвідношенні змішано з оливним ад'ювантом на основі Montanide ISA-70 [Патент РФ на изобретение № 2269361 "Вакцина ассоциированная эмульсионная инактивированная против репродуктивно-респираторного синдрома и парвовирусной инфекции свиней" 2006 г.). Це рішення може бути прототипом.

Вакцина-прототип має суттєві недоліки:

- вона не придатна для вакцинопрофілактики мікст-інфекцій РРСС-ЦВІС та ЦВІС-ПВІС, які найбільш поширені у свинарстві України, оскільки циркуляцію збудника ЦВІС зареєстровано практично у всіх товарних свиногосподарствах України

5 - вона не забезпечує задовільного захисту від епізоотичних варіантів збудників РРСС та ПВІС, що циркулюють на території України;

- вона не забезпечує захисту проти ЦВІС за призначенням, оскільки ЦВІС клінічно проявляється завжди лише у формі мікст-інфекцій, а його моноінфекція проходить безсимптомно;

10 - як інактивант вона містить етиленімін, який заборонено у ЄЕС, США, Канаді та в країнах Австралійського Союзу як сильний канцерогенний і токсичний реагент.

- не забезпечує захисту щепленого свиногоголів'я від приживлення польових/епізоотичних варіантів збудників РРСС та ПВІС, що циркулюють в Україні, а отже не може забезпечити викорінення цих хвороб у їх стаціонарних осередках. Це пов'язано не лише з тим, що в ній використовуються штами вірусів, виділені поза межами України. Найголовніше, отримання вакцинної сировини для цього препарату відбувається шляхом розмноження збудників РРСС та ПВІС у перещеплюваних культурах клітин, що неминуче призводить до клонування вірусів - тобто втрати природного біорозмаїття їхніх антигенів - у тому числі протективних: тобто тих, що відповідають за напруженість поствакцинного імунітету. Цей недолік є критичним для застосування вакцини у стаціонарних вогнищах РРСС і ПВІС, оскільки циркуляція на щепленому клінічно оздоровленому свиногоголів'ї збудників РРСС та ПВІС, особливо у присутності збудника ЦВІС, дуже швидко переростає у активний епізоотичний процес зазначених інфекцій.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити вакцину проти репродуктивно-респіраторного синдрому, цирковірусної та/або парвовірусної інфекції свиней асоційовану, інактивовану, що включає антигенний матеріал збудників РРСС та ПВІС, репродукованих у чутливих біологічних системах, інактивованих хімічними сполуками, емульсованих у оливному ад'юванті шляхом використання як протективних антигенів - антигенні матеріали штамів "ВД-09" вірусу РРСС, "Е-2" вірусу ПВІС та додатково "І-1024" вірусу ЦВІС у ефективній концентрації, культивування виробничих штамів у макрофагах свині, де накопичуються в концентрації за інфекційної активності $7,0 \text{ Ig TCD}_{50/\text{cm}^3}$ (віруси РРСС та ПВІС), а також БУО $_{50/\text{cm}^3}$ (збудник ЦВІС), а за активністю в РПГА не менше 32 ГАО кожний для уніфікації вакцинної сировини, щоб зберегти повний спектр протективних антигенів збудників РРСС, ЦВІС та ПВІС додаткового введення спиртової витяжки з альвеолярних макрофагів хворих свиней з стаціонарних осередків РРСС, ЦВІС та/або ПВІС, яка змішується з антигенами та з оливним ад'ювантом у оптимальних співвідношеннях у випадку двовалентної вакцини обсяг матеріалу РРСС і ЦВІС пропорційно збільшується), мас. %:

- Антигенний матеріал зі штаму "ВД-09" вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней - 15,0-20,0

- Антигенний матеріал зі штаму "І-1024" цирковірусу свиней - 10,0-15,0

- Антигенний матеріал зі штаму "Е-2" парвовірусу свиней - 10,0

40 - Спиртова витяжка альвеолярних макрофагів - 15,0-20,0

- Аніліновий барвник "Нейтророт" - 0,01

- Оливний ад'ювант (емульгатор масло КЕ-1001 та олива ПСП) до 100,0, щоб забезпечити ефективність вакцини.

Зазначений технічний результат досягнуто розробленням вакцини проти РРСС, ЦВІС та/або ПВІС інактивованої емульсованої, що характеризується наступною сукупністю ознак:

1. Вакцина асоційована проти РРСС, ЦВІС та/або ПВІС з підпаштуванням її специфічності під епізоотологічні характеристики оздоровлюваного свиногосподарства з ознаками стаціонарності РРСС, ЦВІС та/або ПВІС.

2. Антигенний матеріал збудника РРСС, виділеного в Україні і накопиченого у вакцинній сировині у ефективному обсязі.

2.1. Як виробничий штам збудника РРСС використано штам "ВД-08" вірусу РРСС, виділений у 2008 році від хворих свиней у первинному осередку РРСС в господарстві "Води Донбасу" Донецької області.

2.2. Антигенний матеріал штаму "ВД-08" вірусу РРСС приготовано з використанням культури макрофагів свині, які підтримують природне розмаїття протективного антигену збудника.

2.3. Антигенний матеріал штаму "ВД-08" вірусу РРСС, приготований з використанням культури макрофагів свині, має інфекційну активність не менше $6,5 \text{ Ig TCD}_{50/\text{cm}^3}$ а антигенну активність в РПГА - не менше 32 ГАО.

3. Антигенний матеріал збудника ЦВІС, виділеного в Україні і накопиченого у вакцинній сировині у ефективному обсязі.

3.1. В якості виробничого штаму збудника ЦВІС використано штам "І-1024" вірусу ЦВІС, виділений у 2010 році від хворих свиней у стаціонарному осередку мікст-інфекції ЦВІС-ПВІС у Інгупецькому районі Херсонської області.

3.2. Антигенний матеріал штаму "І-1024" вірусу ЦВІС приготовано з використанням культури макрофагів свині, які підтримують природне розмаїття протективного антигену збудника.

3.3. Антигенний матеріал штаму "І-1024" вірусу ЦВІС, приготований з використанням культури макрофагів свині, має інфекційну активність не менше $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, а антигенну активність в РПГА - не менше 32 ГАО.

4. Антигенний матеріал збудника ПВІС, виділеного в Україні і накопиченого у вакцинній сировині у ефективному обсязі.

4.1. Як виробничий штам збудника ПВІС використано штам "Е-2" вірусу ПВІС, виділений у 2004 році від хворих свиней у стаціонарному осередку мікст-інфекції ПВІС-РРСС у Харківській області.

4.2. Антигенний матеріал штаму "Е-2" вірусу ПВІС приготовано з використанням культури макрофагів свині, які підтримують природне розмаїття протективного антигену збудника.

4.3. Антигенний матеріал штаму "Е-2" вірусу ПВІС, приготований з використанням культури макрофагів свині, має інфекційну активність не менше $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, а антигенну активність в РПГА - не менше 32 ГАО.

5. Інактивант - формальдегід, джерелом може бути або комерційний формалін марки "чда" або "хч" у кінцевій концентрації 0,08-1,2 %, або уротропін

6. Антигенний матеріал збудника РРСС, виділеного в Україні і накопиченого у вакцинній сировині у ефективному співвідношенні з іншими компонентами вакцини - 15,0-20,0 мас. %.

7. Антигенний матеріал збудника ЦВІС, виділеного в Україні і накопиченого у вакцинній сировині у ефективному співвідношенні з іншими компонентами вакцини - 10,0-15,0 мас. %.

8. Антигенний матеріал збудника ПВІС, виділеного в Україні і накопиченого у вакцинній сировині у ефективному співвідношенні з іншими компонентами вакцини - 10,0 мас. %.

9. Оливний ад'ювант.

9.1. з оливних ад'ювантів масло KE-1001 та з оливних ад'ювантів ПСП до - 100, що відповідає критерію "новизна".

Суть корисної моделі пояснюється прикладами

Приклад 1. Приготування вакцинної сировини

Антигенні матеріали штамів "ВД-08" вірусу РРСС, "І-1024" вірусу ЦВІС та "Е-2" вірусу ПВІС готують у необхідних обсягах шляхом культивування в перещеплюваних культурах клітин Магс-145 (штам "ВД-08" вірусу РРСС) та РК-15 (штами "І-1024" вірусу ЦВІС та "Е-2" вірусу ПВІС) та первинній культурі макрофагів свині (альвеолярних макрофагів чи лейкоцитів). При цьому на перещеплюваних культурах зазначені антигенні матеріали готують у сукупному обсязі до 2/3 обсягу запланованої вакцинної сировини, а на первинній культурі макрофагів - не менше 1/3 запланованого загального обсягу вакцинної сировини. Активність антигенів повинна бути на рівні титрів 1:8 і вище у реакції пасивної гемаглютинації (РПГА) з відповідним (гомологічним) еритроцитарним діагностиком. Отримані антигенні матеріали з зазначеною активністю у РПГА змішують у стерильній ємності. При цьому обсяг антигенного матеріалу збудника РРСС має бути на 25-30 % більше за обсяг антигенного матеріалу збудника ЦВІС і на 35-40 % більше за обсяг антигенного матеріалу збудника ПВІС. Отриману суміш ретельно перемішують при кімнатній температурі з формальдегідом, узятим у кінцевій концентрації 0,22 %, впродовж не менше 10 хв. Після цього ємність/біореактор з сировиною витримують за температури 37 °С впродовж 72 годин, за умови періодичного перемішування (без зволоження пробки/кришки ємності/біореактора, відповідно). Контроль повноти інактивації сировини проводять шляхом або 3-разового пасажування проби з неї у первинній культурі макрофагів свині (альвеолярних макрофагів чи лейкоцитів), або шляхом зараження 4-х поросят сисунів 10-добового віку від стада, вільного від збудників РРСС, ЦВІС та ПВІС. Стерильність вакцинної сировини контролюють стандартним методом. Вакцина сировина має бути вільною від будь-яких інфекційно активних агентів.

Приклад 2. Приготування цільового препарату

Вакцину проти РРСС, ЦВІС та/або ПВІС асоційовану емульсовану інактивовану готують шляхом емульсування вакцинної сировини з масляним ад'ювантом. Для цього у стерильній ємності/біореакторі ретельно перемішують вакцинну сировину, узяту в обсязі 20 % від загального обсягу ємності/біореактора, з масляним ад'ювантом, узятим у обсязі 60 % від загального обсягу ємності/біореактора. Як ад'ювант використовують суміш олив - масло KE-

1001 за ДСТУ у обсязі не менше 35,0 % (емульгатор) та масло "ПСП" ТУ У у обсязі не менше 65,0 % від загального обсягу ад'ювантної суміші. Емульсування вакцини проводять у режимі, що забезпечує отримання стабільної емульсії з в'язкістю не більше ПО сантипуаз. Отриману емульсію розфасовують у стандартні стерильні флакони, закорковують з застосуванням стандартних стерильних корків та ковпачків і етикетки кують, згідно з вимогами ТУ У на вакцину. Після проведення, згідно з вимогами ТУ У на вакцину, відповідних процедур її біологічного контролю, її застосовують для щеплення свиней.

Приклад 3. Контроль біоеквівалентності вакцини

Вакцину проти РРСС, ЦВІС та ПВІС асоційовану емульсовану інактивовану випробували на антигенність та імуногенність у порівнянні з вакциною проти РРСС і ПВІС емульсованою інактивованою з антигенними матеріалами штамів "БД-ДЕП" вірусу РРСС та "Вл-94-ДЕП" парвовірусу свиней, яка виробляється НПО "НАРВАК" (РФ). Для цього кожною з вакцин 2-разово, з інтервалом 3 тижні у однаковій дозі (5 см³) щепили дві групи свиней - по 15 голів холостих свиноматок у кожній. Через 1 і 9 місяців після останнього введення вакцини у свиней відбирали проби крові для дослідження антигенності порівнюваних вакцин. Імуногенність порівнюваних вакцин по РРСС-компонента перевіряли шляхом зараження польовим вірусом-пробійником поросят-сисунів 3-добового віку (по 4 на кожную вакцину), отриманих від щеплених свиноматок. Титри антитіл (в РПГА та ELISA) у свиноматок, щеплених обома порівнюваними вакцинами проти РРСС та проти ПВІС не розрізнялися між собою як за рівнем (1:8-1:32 в РПГА та 1:50-1:100 в ELISA), так і за строкатістю (коефіцієнт варіації 10-15 %). Проте свині, щеплені вакциною, що заявляється як корисна модель, мали додатково антитіла проти ЦВІС (1:16-1:64 в РПГА та 1:50-1:100 в ELISA). При випробуваннях імуногенності 2 з чотирьох заражених поросят, що отримані від свиноматок, щеплених вакциною НПО "НАРВАК", захворіли на респіраторне захворювання на 7-9 добу після зараження. В пробах стабілізованої крові цих поросят (і хворих, і здорових) методом ПЛР виявлено генетичний матеріал вірусу РРСС. Поросят від свиноматок, щеплених цільовою вакциною, після зараження польовим ізолятом вірусу РРСС, виділеним в Україні, впродовж всього терміну спостереження (60 діб) залишалися здоровими, а їх проби крові були негативними на РРСС у ПЛР.

Наведені вище приклади засвідчують, що корисна модель відповідає вимогам патентоспроможності.

Вакцина є нешкідливою, захищає щеплених свиней від захворювання та приживлення польових варіантів збудників РРСС, ЦВІС та/або ПВІС, забезпечує надійний пасивний імунітет у поросят-сисунів до 20-25-добового віку, що дозволяє викорінювати стаціонарні осередки зазначених інфекцій.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Вакцина асоційована емульсована інактивована проти репродуктивно-респіраторного синдрому (РРСС), цирковірусної (ЦВІС) та/або парвовірусної інфекцій свиней (ПВІС), що містить антигенний матеріал збудників РРСС та ПВІС, репродукованих у чутливих біологічних системах, інактивованих хімічними сполуками, емульсованих у оливному ад'юванті, яка **відрізняється** тим, що як протективні антигени вона містить антигенні матеріали штамів "ВД-09" вірусу РРСС, "Е-2" вірусу ПВІС та додатково "І-1024" вірусу ЦВІС у ефективній концентрації.

2. Вакцина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що для збереження повного спектра протективних антигенів збудників РРСС, ЦВІС та ПВІС, що циркулюють в Україні, а також для уніфікації вакцинної сировини, виробничі штами вірусів культивуються у макрофагах свині, де накопичуються в концентрації за інфекційної активності 7,0 lg TCID_{50/см³} (віруси РРСС та ПВІС), а також БУО_{50/см³} (збудник ЦВІС), а за активністю в РПГА не менше 32 ГАО кожний.

3. Вакцина за пп. 1 і 2, яка **відрізняється** тим, що для уникнення приживлення у щеплених свиней польових варіантів збудників, до складу вакцини введено спиртову витяжку з альвеолярних макрофагів хворих свиней з стаціонарних осередків РРСС, ЦВІС та/або ПВІС, яка змішується з антигенами та з оливним ад'ювантом у оптимальних співвідношеннях у випадку двовалентної вакцини обсяг матеріалу РРСС і ЦВІС пропорційно збільшується, мас. %:

- антигенний матеріал зі штаму "ВД-09" вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней - 15,0-20,0;
- антигенний матеріал зі штаму "І-1024" цирковірусу свиней - 10,0-15,0;
- антигенний матеріал зі штаму "Е-2" парвовірусу свиней - 10,0;
- спиртова витяжка альвеолярних макрофагів - 15,0-20,0;
- аніліновий барвник "Нейтророт" - 0,01;
- оливний ад'ювант (емульгатор масло КЕ-1001 та олива ПСП) - до 100,0.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601