

Изобретение относится к области вирусологии, в частности к получению инактивированных вакцин для иммунизации животных, и может быть использовано для специфической профилактики рота вирусного гастроэнтерита.

Известна инактивированная ротавирусная вакцина для пассивной иммунизации телят против ротавирусного гастроэнтерита [1]. Вакцина состоит из ротавируса крупного рогатого скота с биологической активностью 3-10 ЦПД 50/мл и содержит формалин в качестве инактиватора в конечной концентрации от 0,05 до 0,10% и бисульфат натрия.

Перед введением вакцины животным (коровам) в нее добавляют адъювант - водно-масляную эмульсию, что повышает ее иммуногенность.

Как следует из технической сущности, известная техническая вакцина является токсичной, так как практически нельзя достичь полной инактивации формалина, который является токсичным для микроорганизмов; обладает низкой иммуногенностью, что обусловлено необходимостью введения в нее адъюванта, действие которого направлено на повышение иммуногенности и характеризуется нестабильностью при хранении, т. к. известно, что стабильность ротавирусных вакцин не превышает 24 месяца.

Наиболее близкой к изобретению по технической сущности и достигаемому эффекту является ротавирусная вакцина, содержащая ротавирус обезьян SA-11, инактивированный формалином /WO 94/01134, кл. А 61 К 39/42, 20.04.94/ [2].

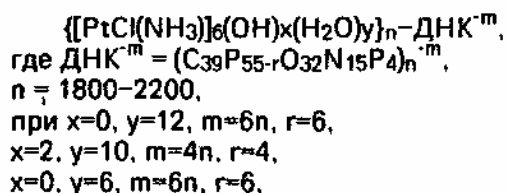
Для вакцины [2] присущи те же недостатки, что и для вакцины [1]: токсичность, низкая иммуногенность, нестабильность при хранении. Подтверждением указанных свойств вакцины [2] служат данные, полученные при исследовании ротавирусной вакцины с использованием вирусного материала, полученного нами из штамма ротавируса обезьян SA-11 с антигенной активностью 1:1024 в РНГА (реакции непрямой гемагглютинации) ГАЕ/0,25 мл и биологической активностью $10^{5,5}$ ЦПД 50/мл. Вакцину готовят путем добавления к вирусному материалу формалина до конечной концентрации 0,1% и последующей инактивации вируса в течение 72 часов при 37°C. Полученную формализированную вакцину испытывают на иммуногенность у кролей и стабильность ротавирусных антигенов при хранении. Результаты приведены в табл. 1, где отражены основные свойства вакцины.

Как следует из данных табл. 1, ротавирусная вакцина, полученная из вируса с высокой антигенной активностью, обладает низкой иммуногенностью против ротавирусного гастроэнтерита, выраженной титром антител в РНГА (реакции торможения непрямой гемагглютинации), равном 1:640; характеризуется невысокой стабильностью, составляющей всего 24 месяца и является токсичной.

К недостаткам получения известной вакцины следует отнести довольно большую продолжительность ее получения, обусловленную медленным протеканием инактивации вируса формалином.

В основу изобретения поставлена задача разработки состава ротавирусной инактивированной вакцины для иммунизации животных, состоящей из штамма ротавируса обезьян SA-11 и производного платины (II) с полианионом дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), что позволяет получить вакцину нетоксичную, характеризующуюся высокой иммуногенностью против рота вирусного гастроэнтерита и стабильностью при минимальных затратах времени на ее получение.

Для решения поставленной задачи предложена вакцина ротавирусная инактивированная для иммунизации животных, содержащая вакцинный штамм ротавируса обезьян SA-11 и производные платины (II) с полианионом дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) общей формулы [1]:



при следующем соотношении компонентов, мас. %:

**Производные платины (II)
с полианионом ДНК общей
формулы (1) (в пересчете
на платину) $(5,3-81) \cdot 10^{-3}$**
**Штамм ротавируса обезьян
SA-11 с антигенной актив-
ностью (1:64)-(1:1024) в
РНГА ГАЕ/0,25 мл и биоло-
гической активностью
 $1 \cdot 10^{5,5} - 1 \cdot 10^{7,5}$ ЦПД 50/мл Остальное**

Система, состоящая из штамма ротавируса обезьян SA-11 и заявляемых производных платины (II) с полианионом ДНК, обеспечивает формирование иммуностимулирующего комплекса "ротавирусные протективные антигены - производные платины (II) с полианионом ДНК".

Комплекс обеспечивает эффективную инактивацию вируса, усиливает иммуногенность и повышает стабильность вакцины при значительном сокращении времени получения нетоксичной инактивированной вакцины.

Производные, платины (II) с полианионом ДНК известны [Патент ЕР № 0374267, кл. А 61 К 35/28, 31/555, 1990]. Данные соединения синтезированы для применения в качестве действующего вещества лекарственного препарата противоопухолевого действия. Соединения платины не обладают

иммунодепрессивным действием и не являются токсичными в концентрациях, используемых для приготовления вакцины (полулегальная доза ЛД₅₀ равна 102 мг/кг тела), в то время, как на одну иммунизацию животного расходуется максимально 144 мг.

Согласно изобретению, полученная вакцина является нетоксичной, обладает высокой иммуногенностью, характеризуемой титрами антител в РТНГА на уровне 1:16400, повышенной стабильностью, характеризуемой постоянством величин титров антиротавирусных антител в РТНГА в течение не менее 40 месяцев при стандартных условиях хранения.

Вакцину готовят следующим образом. Культуру клеток, например Vero, инфицируют ротавирусом обезьян группы А с антигенной активностью (1:64)-(1:1024) РНГА ГАЕ/0.25 мл и биологической активностью $1 \cdot 10^{5.5}$ - $1 \cdot 10^{7.5}$ ЦПД/50 мл, активированным трипсином. Информационные клетки инкубируют при 37°C в течение 48 часов, а затем разрушают информационные клетки трехкратным замораживанием и оттаиванием для увеличения выхода вируса. Затем вирусный материал осветляют при низкоскоростном центрифугировании и вводят во взаимодействие с производным платины (II) с полианионом ДНК, термостатируют при 37°C не менее 90 мин для инактивации вируса.

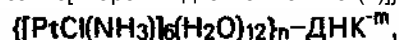
В качестве производных платины (II) с полианионом ДНК общей формулы:



где $DNK^m-(C_{39}H_{55-r}O_{32}N_{15}P_4)_n^m$

$n = 1800-2200$

используют следующие соединения: Соединение I при $x=0$, $y=12$, $m=6n$, $r=6$; поли{гексакис[хлораминдиакваплатина (II)]}-μ-дезоксирибонуклеат формулы



где $n = 1810-1990$, $m = 6n$; DNK^m

$(C_{39}H_{49}O_{32}N_{15}P_4)_n^m$;

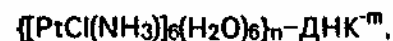
соединение II при $x=2$, $y=10$; $m=4n$; $r=6$; поли{бис(гидроксохлораминдиакваплатина (II))}-μ-тетраakis[хлороамминдиакваплатина (II)]-μ-дезоксирибонуклеат формулы



где $n = 1900-2100$, $m = 4n$; DNK^m

$(C_{39}H_{51}O_{32}N_{15}P_4)_n^m$

Соединение III при $x=0$; $y=6$; $m=6n$; $r=6$; поли{гексакис[хлораминдиакваплатина (II)]}-μ-дезоксирибонуклеат формулы



где $n = 2000-2100$; $m = 6n$; DNK^m

$(C_{39}H_{49}O_{32}N_{15}P_4)_n^m$

Соединения I, II, III представляют собой мелкокристаллические порошки желтого цвета, без запаха, устойчивые на воздухе, способные в течение года храниться без изменения свойств.

Полученный конечный продукт представляет собой инактивированную ротавирусную вакцину для иммунизации сельскохозяйственных животных против ротавирусного гастроэнтерита и имеет следующий ингредиентный состав, мас. %:

**Производные платины (II)
с полианионом ДНК общей
формулы [1] (в пересчете
на платину) $(5,3-81) \cdot 10^{-3}$
Штамм ротавируса обезьян
SA-11 с антигенной актив-
ностью (1:64)-(1:1024) в
РНГА ГАЕ/0,25 мл и биоло-
гической активностью
 $1 \cdot 10^{5.5}-1 \cdot 10^{7.5}$ ЦПД 50/мл Остальное**

Серии полученной ротавирусной вакцины испытывали на иммуногенность, токсичность, стерильность, безопасность и стабильность.

Иммуногенность вакцины - специфическая активность, исследуют в лабораторных тестах с эритроцитарным ротавирусным диагностиком фирмы "Ростэпидкомплекс" в реакции торможения непрямой геммагглютинации и выражают титрами антиротавирусных антител в РТНГА [Зарубинский В. Я., Колпаков С. А. Применение реакции непрямой геммагглютинации для диагностики ротавирусного гастроэнтерита// Вопр. вирусологии, - 1989, № 2, - С. 250-253].

Стабильность вакцины - характеризуется временем, в течение которого сохраняется постоянным величина титра антиротавирусных антител в РТНГА.

Токсичность вакцины - определяется стандартным методом и оценивается по цитотоксическим дозам - ЦТД 50/мл.

Безопасность вакцины - характеризуется отсутствием инфекционной активности в культуре клеток и

определяется по ЦПД 50/мл.

Стерильность вакцины - характеризуется отсутствием роста м/о при посеве на сахарный бульон, МПА, среду Сабуро [Общие требования, предъявляемые к стерильности биологических препаратов // Требования к биологическим препаратам, № 6 - Wld. Hlth Org. techn. Rep. Ser., 1972, № 486].

Пример. Взвесь культуры клеток Vero в ростовой питательной среде, состоящей из основной среды Игла с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, в посевной концентрации 300 тысяч клеток на мл вносят в сосуды для культивирования и выращивают в стационарных условиях до образования в них монослоев. Затем культуральную среду из сосудов удаляют и вносят на монослой посевной ротавирус обезьян штамма SA-11, активированный трипсином, в конечной концентрации 10 мкг на 1 мл вирусной суспензии, с антигенной активностью 1024 в РНГА ГАЕ/0,25 мл и биологической (инфекционной) активностью $10^{5.5}$ ЦПД 50/мл. Адсорбцию вируса проводят в течение 2 часов при температуре 37°C. Затем неадсорбированный вирус удаляют, а монослой клеток дважды отмывают любым сбалансированным солевым раствором, например, раствором Хенкса. После чего в сосуды добавляют среду для размножения вируса, состоящую из стандартной основной среды Игла и трипсина (конечная концентрация трипсина в среде 1 мкг/мл). Инфицированные культуры инкубируют при 37°C в течение 48 часов. После окончания инкубирования остатки клеточного монослоя вместе с вирусосодержащей жидкостью подвергают трехкратному замораживанию и оттаиванию, собирают вирусосодержащий материал и освобождают его от обломка клеток центрифугированием при 1000g в течение 20 минут,

Затем к 100 мл осветленной вирусной суспензии добавляют 10 мл раствора поли[гексакис(хлороаминакваплатины (II))]—μ-дезоксирибонуклеата (соединение III) в конечной концентрации 0,2136 мг/л (в пересчете на платину) и инкубируют при 37°C в течение 90 минут.

Полученный продукт представляет собой инаktivированную ротавирусную вакцину при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Производное платины (II) с полианионом ДНК (в пересчете на платину) (Соединение III)	21·10⁻³
Штамм ротавируса обезьян SA-11 с антигенной актив- ностью 1024 в РНГА ГАЕ/ /0,25 мл и биологической активностью 1·10^{5.5} ЦПД 50/мл	Остальное

Вакцина нетоксична, безопасна, стерильна, обладает иммуногенностью 1:16400 РНГА у кролей, стабильна в течение 40 месяцев (табл. 2, пример 5).

В табл. 2 отражены составы вакцин, полученные с использованием ротавируса обезьяны SA-11, обладающие различной антигенной активностью, и содержащие производные платины (II) с полианионом ДНК, количество которых находится как в заявляемом диапазоне, так и за его пределами.

Установлено, что количественный и качественный состав вакцины выбран из условий, обеспечивающих полную инаktivацию ротавируса обезьян SA-11, иммуногенность у кролей и стабильность вакцины при минимальном времени инаktivации вируса (табл. 2, примеры 1-19).

Оптимальным с точки зрения достижения технического результата является содержание в вакцине производных платины (II) с полианионом ДНК в диапазоне $(5,3-81) \times 10^{-3}\%$ мае. (в пересчете на платину).

Содержание в вакцине производных платины (II) с полианионом ДНК ниже заявляемого предела, даже при использовании ротавируса обезьян SA-11 с высокой антигенной активностью, не обеспечивает вакцине стерильность, безопасность и высокую иммуногенность против ротавирусного гастроэнтерита: титр антиротавирусных антител в РНГА составляет всего 1:640, что находится на уровне, достигаемом известной вакциной (табл. 2, пример 21).

Верхний предел содержания в вакцине производных платины (II) с полианионом ДНК ограничен тем, что дальнейшее увеличение не способствует улучшению качества вакцины и является нецелесообразным (табл. 2, пример 22).

Оптимальными значениями антигенной активности ротавируса SA-11, обеспечивающими высокую эффективность вакцины в заявляемом диапазоне содержания производных платины (II) с полианионом ДНК, является (1:64)-(1:1024) РНГА ГАЕ/0,25 мл.

Использование ротавируса с антигенной активностью ниже заявляемого предела при максимальном содержании соединения III (платины) приводит к получению вакцины с низкой иммуногенностью: титр антиротавирусных антител составляет 1:1280, что практически соответствует иммуногенности известной вакцины (табл. 2, пример 20).

Верхний предел величины антигенной активности ротавируса обезьян SA-11 ограничен биологическими свойствами системы "вирус-клетка". Экспериментально установлено, что в течение 1,5 ч достигается полная инаktivация ротавируса обезьян SA-11 в присутствии производного платины (II) с полианионом ДНК в заявляемом диапазоне его содержания, что обеспечивает получение инаktivированной вакцины.

Уменьшение времени инаktivации ротавируса приводит к получению вакцины, которая является опасной, т. к. содержит неинаktivированный вирусный материал (табл. 2, пример 24).

Увеличение времени инаktivации ротавируса не сказывается на повышении качества вакцины и является нецелесообразным (табл. 2, пример 23).

Данные табл. 3 поддерживают высокую иммуногенность предложенной ротавирус-ной вакцины при вакцинации различных видов животных.

Преимущества предложенной рота вирусной инактивированной вакцины для иммунизации животных по сравнению с известной ротавирусной вакциной подтверждаются данными, представленными в табл. 1 и 2.

Как следует из сопоставительного анализа качества и эффективности вакцин, предложенная вакцина превосходит известную по следующим показателям

- по иммуногенности против ротавирусного гастроэнтерита в 6-25 раз, что выражается в увеличении титров антиротавирусных антител в 6-25 раз, например у кролей;
- по стабильности приблизительно в 2 раза, что выражается в увеличении времени постоянства титров антиротавирусных антител приблизительно в 2 раза;
- является нетоксичной.

Данная вакцина, как и известная, является стерильной и безопасной.

Кроме того, для получения данной вакцины требуется в 48 раз меньшие затраты времени за счет более быстрой и эффективной инактивации вируса.

Следует подчеркнуть, что разработанная вакцина - ротавирусная инактивированная - соответствует основным направлениям создания современных вакцинных препаратов, состоящим в совершенствовании их композиций путем использования в составе иммуностимулирующих комплексов (ИСКО-Мов).

Состав 1 мл вакцины		Продолжи- тельность инактиваци- и вируса, ч	Характеристики ва			
Вирус SA-11 с ан- тигенной актив- ностью в РНГА ГAE/0,25 мл	Формалин, %		Стериль- ность	Токсичность	Безопас- ность	Иммуноген
						антител
						0
1:1024	0,1	72	+	+	+	1:640

№ п/п	Ротавирус обезьяны SA-11 с анти- генной актив- ностью в РНГА ГAE/0,25 мл	Производные платины (II) с полианионом ДНК		Продолжи- тельность инактиваци- и виру- са, ч	Характерист			
		наимено- вание	количест- во x 10 ⁻³		Токсич- ность	Стериль- ность	Безопас- ность	свеж гото н
По изобретению								
1	1:64	Соедине- ние III	21	1,5	-	+	+	1:4
2	1:128		21	1,5	-	+	+	1:4
3	1:256		21	1,5	-	+	+	1:8
4	1:512		21	1,5	-	+	+	1:16
5	1:1024		21	1,5	-	+	+	1:16
6	1:512		5,3	1,5	-	+	+	1:4
7	1:512		11	1,5	-	+	+	1:8

№ п/п	Ротавирус обезьяны SA-11 с антигенной активностью в РНГА ГАЕ/0,25 мл	Производные платины (II) с полианионом ДНК		Продолжительность инактивации вируса, ч	Характерист			
		наименование	количество $\times 10^{-3}$		Токсичность	Стерильность	Безопасность	свеж гото н
8	1:512	Соединение III	42	1,5	-	+	+	1:16
9	1:512		81	1,5	-	+	+	1:16
10	1:64		5,3	1,5	-	+	+	1:2
11	1:64		81	1,5	-	+	+	1:8
12	1:1024		5,3	1,5	-	+	+	1:4
13	1:1024	Соединение II	81	1,5	-	+	+	1:16
14	1:64		81	1,5	-	+	+	1:8
15	1:1024		5,3	1,5	-	+	+	1:8
16	1:512		21	1,5	-	+	+	1:16
17	1:64		Соединение I	81	1,5	-	+	+
18	1:1024	5,3		1,5	-	+	+	1:8
19	1:512	21		1,5	-	+	+	1:16
Запредельные значения								
20	1:32	Соединение III	81	1,5	-	+	+	1:1
21	1:1024		2,5	1,5	-	-	-	1:6
22	1:512		113,2	1,5	-	+	+	1:16
23	1:521		21	2,0	-	+	+	1:16
24	1:512		21	1,0	-	+	-	1:16

Таблица 3

Вид животного	Титры антител в сыворотке крови в РТНГА	
	до иммунизации	после иммунизации
Мыши нелинейные	< 1:20	1:360,6 \pm 14,1
Супоросные свиноматки	< 1:20	1:1810 \pm 7,5
Поросята	< 1:20	1:525 \pm 14,8
Коровы	< 1:20	1:512 \pm 7,2
Телята	< 1:20	1:255 \pm 7,5
Кролики шиншилла	< 1:20	1:5880 \pm 13,4