

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045336**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.16

(51) Int. Cl. *A61K 47/10* (2017.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(21) Номер заявки
202391917

(22) Дата подачи заявки
2021.08.09

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕТУЛИНА КАК АДЬЮВАНТА В ВАКЦИНЕ ПРОТИВ
КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2**

(31) **2020143732**

(56) RU-C1-2545717
RU-C1-2545714
RU-C1-2355423

(32) **2020.12.29**

(33) **RU**

(43) **2023.09.07**

(86) **PCT/RU2021/000341**

(87) **WO 2022/146174 2022.07.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"БЕТУВАКС" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Исаев Артур Александрович,
Красильников Игорь Викторович,
Фролова Мария Евгеньевна,
Кудрявцев Александр Викторович,
Вахрушева Анна Владимировна,
Иванов Александр Викторович (RU)**

(74) Представитель:
Котлов Д.В., Яшмолкина М.Л. (RU)

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу создания адьюванта бетулина, пригодного для приготовления вакцины против коронавируса SARS-CoV2. Способ предусматривает стерилизующую фильтрацию раствора бетулина в тетрагидрофуране через нейлоновую мембрану с диаметром пор 0,22 мкм, снижение содержания тетрагидрофурана путем добавления 25-кратного объема стерильного 0,01 М трис-буфера (pH 9,0±0,1) с последующей гомогенизацией ультразвуком до получения гомогенной суспензии с образованием сферических аморфных гомогенных частиц, пригодных для связывания белков вируса SARS-CoV-2. Предложенная технология позволяет получать бетулин с высокой стерильностью и иммуногенностью, что повышает качество вакцины против коронавируса.

045336
B1

045336
B1

В декабре 2019 г. в Китае произошла вспышка тяжелой острой респираторной инфекции COVID-19 (CoronaVirus Disease-19), вызванной новым коронавирусом SARS CoV-2. С момента своего появления вирус распространился почти на все страны мира. Всемирная организация здравоохранения объявила, что вспышка приняла характер пандемии. Эпидемия COVID-19 стала третьей по счету, вызванной коронавирусами, после эпидемий тяжелого острого респираторного синдрома 2002-2003 гг. и ближневосточного респираторного синдрома. По данным ВОЗ на начало декабря 2020 г. зафиксировано более 65 млн заразившихся и более 1,4 млн умерших от коронавирусной инфекции. Продолжающаяся эпидемия COVID-19 представляет серьезную угрозу человечеству, включая прямое влияние на повседневную жизнь миллионов людей и негативное воздействие на мировую экономику.

В настоящее время отсутствуют эффективные средства этиотропной и патогенетической терапии коронавирусных инфекций. Основными задачами этиотропной и патогенетической терапии коронавирусных инфекций являются снижение вирусной нагрузки и/или уменьшение выраженности воспаления в легких. Одобренных этиотропных препаратов против SARS-CoV-2 на сегодня нет, хотя имеется довольно большое количество кандидатных препаратов, протестированных в доклинических исследованиях. Применяется также патогенетическая и симптоматическая терапия, направленная на уменьшение выраженности интоксикации и воспалительного процесса в легких, восстановление оксигенации крови, коррекцию водно-солевого баланса и т.д. Поэтому основным подходом борьбы с COVID-19 должна стать своевременная вакцинопрофилактика.

Одобренных к клиническому применению вакцин против SARS-CoV-2 нет, хотя разработано много кандидатных препаратов. Кандидатные вакцины относятся к следующим типам:

- 1) субъединичные вакцины (как правило, на основе рекомбинантного белка S или его рецепторсвязывающего домена);
- 2) ДНК-вакцины на основе генетических конструкций, кодирующих цельный белок S или его рецепторсвязывающий домен;
- 3) векторные вакцины на основе непатогенных вирусов (аденовирусов, вируса Vaccinia и др.), в геном которых встроены один или несколько генов коронавирусов;
- 4) убитые цельновирионные вакцины;
- 5) ослабленные живые вакцины, полученные путем генно-инженерных модификаций вируса дикого типа, направленных на удаление или инактивацию факторов вирулентности (ингибиторов интерфероновой ответа, медиаторов цитопатического эффекта).

Все перечисленные вакцины, возможно, позволят создать защитные титры нейтрализующих антител. С целью повышения эффективности вакцинации целесообразно вводить в состав вакцинных препаратов иммуноадаьюванты.

При использовании адьювантов появляется возможность повысить иммуногенность вакцин в отношении набора антигенно отличных штаммов, а также при иммунизации различных популяционных групп, в том числе групп риска. Кроме того, при значительном повышении иммуногенности за счет добавления адьюванта к вакцине появляется возможность перехода на простые (однократные) схемы иммунизации, а также снижения дозы антигена. Это особенно важно для вакцин в условиях пандемии, поскольку при той же мощности производства будет получено больше доз вакцины и, как следствие, иммунизировано больше людей.

Таким образом, разработка отечественного безопасного и эффективного препарата - вакцины против коронавирусной инфекции, содержащей корпускулярный адьювант, - представляется стратегически важным аспектом защиты населения Российской Федерации от тяжелых социальных и экономических последствий пандемии, которые возможно контролировать с помощью вакцинопрофилактики.

Перечень иллюстраций

Фиг. 1. Структурная формула бетулина.

Фиг. 2. Хроматографический профиль ТГФ в образце корпускулярного адьюванта (КА) после стадии ультрафильтрации.

Фиг. 3. Размер сферических аморфных наночастиц КА САНЧ.

Фиг. 4. Хроматографический профиль ТГФ в образце КА после стадии ультрафильтрации.

Фиг. 5. Хроматографический профиль образца фармацевтической субстанции.

Фиг. 6. Хроматографический профиль испытуемого образца вакцины (надосадочная жидкость).

Описание изобретения.

Заявителями была разработана лабораторная технология получения корпускулярного адьюванта (КА) на основе природного бетулина для последующего его использования при производстве вакцины. Объектом разработки являлся корпускулярный адьювант на основе природного пентациклического три-терпенового вещества - бетулина (бетуленол, бетулинол, лупендиол). Препарат предназначен для использования в качестве адьюванта профилактических вакцин.

Бетулин является тритерпеновым спиртом, обладающим двумя гидроксильными группами (фиг. 1). Растворимость бетулина составляет менее 1 мкг/мл, поэтому создание водорастворимой формы весьма актуально. Поиск таких форм привел к созданию сферических аморфных наночастиц на основе бересты.

К адьювантам, используемым в производстве вакцинных препаратов, в соответствии с руково-

дством ВОЗ и нормативными документами, действующими в России, предъявляются следующие требования: они должны быть стерильными, апиrogenными, нетоксичными. Однако, как в лабораторной технологии получения КА, разработанной на кафедре биотехнологии и нанобиотехнологии Московского государственного университета тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова (МИТХТ им. М.В. Ломоносова), так и в масштабированном ее варианте не предусмотрена стадия стерилизации [RU 2355423"Адьювант"; А61К 47/06; С08Н 5/04; опубликован 20.05.2009]. Согласно данному способу адьювант получают путем растворения коммерчески доступного сухого экстракта бересты в органическом растворителе, тетрагидрофуране (ТГФ), при концентрации 2,5-5 г/л; добавляют к указанному раствору большое количество воды (до 25 объемов воды по отношению к объему раствора); удаляют растворитель и основную часть воды. К полученному водному раствору наночастиц добавляют криопротектор (например, сорбит) и осуществляют лиофилизацию. Перед использованием адьюванты растворяют в фосфатном буфере (рН 7,5), обрабатывают ультразвуком в течение 15 мин, после чего охлаждают.

Задачей изобретения являлось создание технологии получения КА из природного бетулина, отвечающего требованиям к вакцинным препаратам для парентерального введения по показателям стерильности, пирогенности, иммуногенности и безопасности.

Техническим результатом является разработка способа получения корпускулярного бетулина с оптимальным методом стерилизации для использования в качестве адьюванта в вакцине против коронавируса SARS-CoV2.

Отработка методов стерилизации КА.

На первых этапах проводимых исследований был проведен подбор оптимального метода стерилизации КА, который можно было бы использовать на заключительной технологической стадии производства. Для получения стерильного адьюванта оценивалась возможность использования термических и мембранных методов стерилизации.

В качестве термического метода применили паровую стерилизацию при следующих режимах: 120°C - 0,5 атм (0,5 кгс/см²) - 10 мин; 120°C - 1,0 атм (1,0 кгс/см²) - 45 мин. В результате проведенных исследований было установлено, что испытанные условия термической обработки не пригодны: после стерилизации образуются крупные хлопьевидные частицы, не распадающиеся при интенсивном перемешивании, которые при длительном хранении всплывают на поверхность. Термическая обработка, нарушая структуру аморфных наночастиц, вызывала их агрегацию.

С целью отработки мембранных методов стерилизации проводились исследования по изучению возможности применения мембран из нейлона, полиэфирсульфона, ацетатацеллюлозы. При выполнении экспериментов было отмечено, что на поверхности таких фильтров происходит сорбция частиц: фильтруемый материал над мембраной становился прозрачным за счет образования осадка частиц на ней, при этом снижалась фильтрующая способность мембраны. Следовательно, данные фильтроэлементы оказались непригодными для стерилизующей фильтрации КА.

Таким образом, было установлено, что стерилизация КА мембранными и термическими методами на конечных этапах производства невозможна.

Получение стерильного раствора бетулина в тетрагидрофуране, как основы для производства КА.

Для получения адьюванта, отвечающего требованиям к препаратам для парентерального введения, предложена технология, в которой все исходные растворы должны стерилизоваться на начальных этапах производства КА и весь дальнейший технологический процесс должен проходить в стерильных условиях.

При отработке условий стерилизующей фильтрации раствора бетулина в тетрагидрофуране (10 мг/мл) использовали нейлоновую мембрану с диаметром пор 0,22 мкм марки NRG Pall N66+. Данный фильтроэлемент является гидрофильным с модифицированным зарядом, поэтому первоначально представлялось целесообразным оценить его сорбционную способность, которая могла отрицательно отразиться на выходе готового продукта. Для этого Исполнителем были проведены опыты, в ходе которых было определено содержание бетулина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии ВЭЖХ до и после фильтрации и затем рассчитывали процент сорбции бетулина (табл. 1).

Таблица 1

Определение сорбционной способности мембраны

№	Содержание бетулина до фильтрации, мг/мл	Содержание бетулина после фильтрации, мг/мл	Сорбция бетулина, %
1	10,021	9,810	2,11
2	10,518	10,336	1,73
3	10,250	10,009	2,35
M±m			2,06±0,31

Из представленных в табл. 1 данных видно, что используемая мембрана обладает низкой сорбционной способностью: содержание бетулина в растворе до и после фильтрации различаются очень незначительно, только около 2% активного вещества сорбировалось мембраной. Таким образом, сорбционные свойства испытанного в опытах фильтроэлемента марки NRG Pall N66+ позволяют его использовать для стерилизующей фильтрации КА.

Далее необходимо было установить химическую стойкость мембранного материала по отношению к органическому растворителю тетрагидрофурану ТГФ. Для этого был применен метод "точки пузырька", рекомендованный методическими указаниями МУ 42-51-19-93 Минздрава РФ. При использовании фильтрационных систем, в соответствии с требованиями GMP, необходима проверка целостности мембранных фильтрующих элементов. Согласно МУ 42-51-19-93 при стерилизующей фильтрации следует проводить тестирование на целостность до и после каждого процесса фильтрации. Следует отметить, что нарушение целостности фильтроэлемента (мембраны) также может произойти и во время его стерилизации, когда фильтр подвергается воздействию высокой температуры и повышенному давлению. В опытах по определению целостности мембран до и после фильтрования ТГФ-содержащего раствора бетулина с использованием метода "точки пузырька" также проводили визуальный осмотр мембран после процесса стерилизующей фильтрации.

Тест "точка пузырька" по окончании фильтрации осуществляется автоматически. Когда весь объем жидкости отфильтровывался, поток газа, используемый для перекачивания, должен автоматически прекратиться, как только газ достигнет поверхности насыщенной жидкостью мембраны. При этом в стеклянном приемнике не должно наблюдаться появление пузырьков газа.

В результате проведенных испытаний было установлено, что фильтрующая мембрана в течение 20 мин сохраняла избыточное давление, созданное в фильтрующей системе, и через слой жидкости не проходили пузырьки газа. Визуальный осмотр мембран после процесса фильтрации также подтверждал целостность фильтроэлемента (мембраны). Полученные результаты показали высокую химическую стойкость стерилизующей мембраны.

Таким образом, проведенные эксперименты, в которых была установлена низкая сорбционная способность стерилизующей мембраны марки NRG Pall N66+ по отношению к раствору бетулина в тетрагидрофуране и ее устойчивость к действию ТГФ, показали возможность использования мембранного способа стерилизации исходного раствора в технологии получения КА.

Получение гомогенной дисперсии КА.

С целью получения гомогенных дисперсии КА к стерильной смеси 1% раствора бетулина в тетрагидрофуране, в соответствии с технологией, добавляли 25-кратный объем стерильного 0,01 М трис-буфера (рН 9,0±0,1) с помощью перистальтического насоса при постоянном перемешивании в течение 15 мин магнитной мешалкой пропеллерного типа. После добавления буфера содержание ТГФ в растворе составляло 3,85%. Далее полученную суспензию обрабатывали ультразвуком при 35 кГц в течение 10 мин раза в течение 30 с. Для этого стеклянную емкость с полученной суспензией подвергали обработке в ультразвуковой бане. В результате обработки получали белую равномерную суспензию без конгломератов и включений. За гомогенностью суспензии следили по светорассеянию, последовательно обрабатывая по 30 с до получения двух одинаковых спектров распределения частиц в диапазоне 100-150 нм.

Ультрафильтрация. Оработка метода очистки.

На следующем этапе обрабатывали метод очистки дисперсии КА. С целью удаления токсичного ТГФ применяли ультрафильтрацию на полых волокнах с номинальной отсекающей молекулярной массой 100 или 300 кДа в режиме фильтрации. На первых этапах ультрафильтрации при быстром снижении концентрации ТГФ происходила частичная сорбция КА на мембранах установки, при этом скорость фильтрации снижалась незначительно, а выход готового продукта уменьшался. Поэтому необходимо было отработать параметры ультрафильтрационного процесса, препятствующие сорбции на мембранах КА и обеспечивающие эффективное удаление ТГФ. В результате проведенных экспериментов по оптимизации условий очистки было показано, что для предотвращения сорбции необходимо использовать 2-3-кратное разведение исходной дисперсии КА. При этом скорость ультрафильтрации составляла 1,0-1,2 л/мин, давление устанавливали в пределах 0,6-0,8 атм. Для диафильтрации использовали 10-кратный объем 0,01 М трис-буфера с рН 9,00, а для повышения выхода адьюванта после каждого объема диафильтрующего буферного раствора включали обратный поток с последующей обработкой суспензии ультразвуком в течение 3 мин при 35 кГц.

Затем дисперсии концентрировали до содержания бетулина 1,0-2,0 мг/мл. Концентрацию бетулина определяли методом ВЭЖХ. После ультрафильтрации в КА контролировали остаточное количество ТГФ газожидкостной хроматографией (фиг. 2).

После ультрафильтрации было установлено, что содержание ТГФ составляло 0,176±0,009 мг/мл.

Таким образом, отработанные условия процесса ультрафильтрации обеспечивают эффективное удаление токсичного тетрагидрофурана.

Характеристика полученных частиц КА.

По внешнему виду полученный адьювант КА представлял собой дисперсию белого или желтовато-

белого цвета, разделяющуюся при хранении на прозрачную надосадочную жидкость и легкий осадок, полностью разбивающийся при встряхивании.

Первоначально провели оценку готового препарата по показателю стерильности методом прямого посева на питательную среду. В пробирки с тиогликолевой питательной средой вносили по 1 мл адьюванта с концентрацией КА 1 мг/мл, восстановленного из лиофилизата. Посевы инкубировали при температуре $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ и $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$. После 14-суточной инкубации питательная среда в пробирках оставалась прозрачной, т.е. роста микроорганизмов не наблюдалось. Таким образом, было установлено, что полученные лиофилизированные образцы КА стерильны.

Для проверки на пирогенность образцы КА вводили кроликам по 200 мкг на 1 кг массы внутривенно. При этом максимальная сумма изменения температуры у трех кроликов составила $0,9^\circ\text{C}$ (табл. 2), что свидетельствует об апиrogenности КА.

Таблица 2

Тест на пирогенность КА

№ кролика	Вес кролика, кг	Температура до введения, $^\circ\text{C}$	Температура а через час, $^\circ\text{C}$	Температура через 2 часа, $^\circ\text{C}$	Температура через 3 часа, $^\circ\text{C}$	Сумма макс. изменения температуры, $^\circ\text{C}$
1	2,75	39,4	39,3	39,5	39,5	0,9
2	2,65	39,3	38,9	39,0	39,2	
3	2,50	39,5	39,1	39,2	39,3	

Таким образом, разработанная технология позволяет получать препарат КА стерильным и апиrogenным, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к препаратам для парентерального введения, и позволяет их использовать в качестве вакцинных адьювантов.

Основной характеристикой адьювантов на основе наночастиц является размер и дзета-потенциал, так как от размера и заряда частиц зависит их адьювантная способность. Во многих работах отмечают, что именно размер частиц играет определяющую роль в эффективности адьювантов. Причем наиболее эффективны в качестве иммунологических адьювантов частицы субмикронной области. По данным P.L. Mottram. Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus / P. Mottram et al. // Mol. Pharm. - 2006. - Vol. 4. - No. 1. - P. 73-84, частицы с размером до 500 нм являлись оптимальными для поглощения макрофагами.

На этапах отработки технологии корпускулярного адьюванта определяли дзета-потенциал и размер частиц. Дзета-потенциал определяли методом электрофоретического рассеяния по изменению распределения частиц в электрическом поле с помощью прибора Zetasizer Nano фирмы Malvern. Дзета-потенциал - электрический потенциал, который возникает при движении частиц между адсорбционным слоем ионов, располагающимся на поверхности частиц, и диффузионным слоем ионов среды, окружающим частицу. Размер КА определяли на приборе Zetasizer Nano ZS фирмы Malvern методом лазерного корреляционного светорассеяния под углом 170° с длиной волны $\lambda=633$ нм. Метод определения размеров дисперсных частиц основан на анализе спектра рассеянного света. Метод является абсолютным, не требующим предварительной калибровки с использованием стандартных образцов. Лазерное корреляционное светорассеяние - это метод измерения средней скорости движения дисперсных частиц путем анализа динамических флуктуаций интенсивности рассеянного света, т.е. определение спектральной плотности или временной корреляционной функции рассеянного света. Хаотическое броуновское движение дисперсных частиц приводит к микроскопическим флуктуациям их локальной концентрации, что, в свою очередь, вызывает локальные флуктуации показателя преломления среды. При прохождении лазерного луча, представляющего собой плоскую, монохроматическую, линейно поляризованную волну, через такую среду часть света будет рассеяна на этих локальных неоднородностях. Флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флуктуациям локальной концентрации дисперсных частиц, что позволит измерить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости. Поскольку коэффициент диффузии дисперсных частиц однозначно связан с размером частиц, лазерное корреляционное светорассеяние, по существу, является методом измерения размеров таких субмикронных частиц. Размер частиц рассчитывается по формуле Стокса-Эйнштейна, которая связывает размер частиц с их коэффициентом диффузии и вязкостью жидкости.

Как видно из данных, представленных на фиг. 3, частицы в полученных образцах КА имеют средние размеры 160-180 нм. Значение дзета-потенциала составило минус 44,3 мВ. Наличие отрицательного заряда может способствовать эффективному связыванию с антигеном.

Таким образом, с использованием предлагаемой технологии можно получать частицы, эффективно связывающие антиген и обладающие адьювантным действием.

Методики контроля качества образцов КА

Определение концентрации бетулина в дисперсиях КА.

При обработке технологического процесса получения КА и оценке готового продукта одним из важных контрольных параметров является содержание бетулина. Наиболее простой способ определения концентрации дисперсии по оценке рассеивания света не может дать точной информации, поскольку здесь имеет место зависимость не только от количества частиц, но и от их размера и формы. Незначительные изменения размера и формы наночастиц могут вызвать существенные различия в рассеивании света.

При выполнении данных исследований был разработан оригинальный метод определения содержания бетулина с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), интенсивно развиваясь несколько последних десятилетий, зарекомендовала себя в качестве одного из самых универсальных методов разделения и фармакопейного анализа субстанций и лекарственных средств.

Метод ВЭЖХ применим для разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку большая часть веществ не обладает летучестью, а многие биологически активные вещества неустойчивы при высоких температурах.

Из всех вариантов ВЭЖХ обращенно-фазовый применяется в настоящее время наиболее широко. Его привлекательность определяется методической простотой и универсальностью, во многих случаях - простотой механизма сорбции и предсказуемостью поведения веществ на основании их строения. На сегодняшний день большинство анализов выполняется на неполярных привитых фазах с применением следующих типов детекторов: ультрафиолетовые, флуориметрические, электрохимические, масс-спектрометрические.

Метод ВЭЖХ отличается большой селективностью и чувствительностью, а также универсальностью, позволяющей проводить качественный и количественный анализ в субстанциях и готовых лекарственных формах в одних и тех же условиях.

Ранее было установлено, что для идентификации бетулина предпочтительно использовать его раствор в этиловом спирте. Спектр поглощения полученного раствора имеет максимум в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 210 нм, которая была выбрана рабочей при количественном определении бетулина методом ВЭЖХ. Использование тетрагидрофурана в качестве растворителя недопустимо из-за своей непрозрачности при данной длине волны.

Хроматографический анализ проводили с использованием хроматографической системы LC-20 Prominence производства "Shimadzu" (Япония), снабженной спектрофотометрическим детектором на диодной матрице, насосом для подачи подвижной фазы, дегазатором, автоматическим инжектором с возможностью поддержания температуры образцов 4°C, термостатируемым колоночным отделением и компьютером с установленной программой сбора и обработки хроматографических данных.

В ходе работы исследовали параметры разделения исследуемого раствора бетулина на двух аналитических колонках: Kromasil 100-C18 (5 мкм, 150×4,8 мм) и Kromasil 100-C8 (5 мкм, 150×4,8 мм) производства AkzoNobel (Голландия). В результате эксперимента было установлено, что селективное разделение основного вещества и наиболее близко элюирующих пиков наблюдалось на колонке C18, которую использовали в дальнейшей работе.

При выборе состава подвижной фазы были использованы следующие компоненты: метанол, ацетонитрил, вода.

Исследования показали, что в изократическом режиме элюирования при использовании подвижных фаз с содержанием водного компонента 30-40% по объему наблюдалась значительное уширение пика и недостаточное разрешение пика исследуемого вещества и соседнего пика (R_s не превышала 1,3).

Кроме того, при концентрации бетулина в растворе 1,0 мг/мл наблюдалось уширение переднего фронта пика, что приводило к потере эффективности разделения бетулина. Таким образом, была подобрана оптимальная рабочая концентрация раствора бетулина, которая составила 0,2 мг/мл.

В ходе дальнейших исследований удалось добиться удовлетворительных показателей разделения бетулина в изократическом режиме элюирования. Сильным компонентом элюента являлся ацетонитрил.

Исследование зависимости площади пика бетулина от его концентрации в испытуемом растворе было проведено в эксперименте на модельных смесях субстанции бетулина в соотношении, эквивалентном их соотношению в КА лиофилизате. Диапазон концентраций бетулина составлял от 0,16 до 0,24 мг/мл.

Для построения калибровочного графика готовили раствор стандартного образца (СО). Около 10 мг (точная навеска) стандартного образца бетулина помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 10 мл спирта этилового, растворяли, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали. Полученный раствор фильтровали через фильтр типа "Миллипор" с диаметром пор 0,45 мкм или аналогичный, отбрасывая первые 2 мл фильтрата (0,2 мг/мл).

Приготовление стандартных растворов для построения калибровочного графика.

Непосредственно перед анализом готовили пять стандартных растворов бетулина, как указано в табл. 3.

Таблица 3

Концентрация растворов бетулина

Концентрация бетулина, мг/мл	Объем раствора СО бетулина (0,4 мг/мл), мкл	Объем спирта, мкл
0,16	400	600
0,18	450	550
0,20	500	500
0,22	550	450
0,24	600	400

Для приготовления испытуемого раствора отбирали 1 флакон с адьювантом, содержимое которого растворяли в 10,0 мл этилового спирта (около 1,0 мг/мл бетулина). Полученный раствор помещали в темное место на 2 ч, затем обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин, охлаждали и перемешивали. Порцию полученного раствора фильтровали через нейлоновый фильтр типа "Миллипор" с диаметром пор 0,45 мкм или аналогичный, отбрасывая первые 2 мл фильтрата.

5,0 мл фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводили объем раствора этиловым спиртом до метки и перемешивали (около 0,2 мг/мл).

Хроматографическую систему перед началом анализа кондиционировали, пропуская подвижную фазу не менее 30 мин, до достижения стабильной базовой линии.

Последовательно хроматографировали по 20 мкл растворителя, РСО, получая не менее трех хроматограмм для каждого разведения. Строили калибровочную кривую. Далее хроматографировали по 20 мкл испытуемого раствора, получая не менее трех хроматограмм. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора соответствует двукратному времени удерживания основного пика.

Содержание бетулина в испытуемом образце в миллиграммах (X) вычисляли по формуле

$$X = \frac{(S - b) * 10 * 25}{a * 5}$$

где a - тангенс угла наклона линейной регрессии к оси абсцисс;

b - координата точки пересечения линейной регрессии с осью ординат;

S - площадь пика испытуемого образца.

Определение концентрации ТГФ.

Предлагаемая Исполнителем технология получения КА включает стадию ультрафильтрации для удаления ТГФ, который является слаботоксичным веществом (ЛД50=2,3 г/кг; ПДК=100 мг/м³). Контроль качества ультрафильтрационной очистки проводили по содержанию ТГФ в дисперсии и в пермеате. Также определять остаточную концентрацию растворителя нужно и в готовом препарате. Для этих целей использовали метод ГЖХ.

Данные по анализу проб, полученных на стадии ультрафильтрации в пермеате (1) и концентрате (2), представлены в табл. 4. В исходной пробе до стадии ультрафильтрации количество тетрагидрофурана составляло 3,85%.

Таблица 4

Концентрация ТГФ в образцах

Проба	Концентрация ТГФ, мг/мл n=3
1	0,176±0,009
2	0,122±0,004

Анализ полученных результатов показал, что стадия ультрафильтрации способствует снижению остаточной концентрации ТГФ почти до 0,122 мг/мл (фиг. 4). Таким образом, при введении вакцинной дозы (200 мкг в 0,5 мл) в организм попадет доза ТГФ, которая значительно меньше ЛД50. Подобраный метод ультрафильтрации обеспечивает значительное снижение концентрации ТГФ.

Определение фотометрического показателя дисперсности.

С целью стандартизации КА в процессе производства целесообразно использование фотометрического показателя дисперсности (ФПД). Метод определения ФПД основывается на том, что в довольно широких пределах рассеивание света дисперсиями прямо пропорционально зависит от концентрации, размера частиц и их формы и заключается в определении оптической плотности при двух длинах волн с последующим вычислением показателя дисперсности; небольшие изменения в этих параметрах приводят к существенному изменению рассеивания света. Определяя ФПД, можно оперативно следить за технологическим процессом, контролировать формирование частиц.

Анализ шести серий КА показал, что при соблюдении всех параметров технологического процесса получаются стандартные дисперсии (табл. 5).

Таблица 5

Фотометрический показатель дисперсности САНЧ

№ измерения	ФПД
1	0,980
2	0,995
3	0,982
4	1,031
5	0,996
6	1,007
M±m	0,577±0,05

В результате проведенных экспериментов было установлено, что ФПД для КА в концентрации 0,5 мг/мл имеет значение 0,577±0,05.

Таким образом, ФПД может быть использован для стандартизации процесса получения и характеристики готового адьюванта КА на основе природного бетулина.

Далее была разработана лабораторная технология получения вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, рекомбинантной жидкой, 10, 40 мкг/мл с использованием КА.

Первый этап заключался в разработке технологии рекомбинантного RBD-FC белка, созданного на основе генома коронавируса SARS-CoV-19.

Второй этап состоял из выбора оптимальных концентраций антигенного компонента и содержания адьюванта в вакцине с целью оптимизации дозы вакцины.

Третий этап заключался в оптимизации процесса сведения антигенного компонента и адьюванта для формулирования готовой к применению формы вакцины.

Фармацевтическую субстанцию для вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, получали с применением рекомбинантных технологий. Фармацевтическая субстанция представляет собой высокоочищенный рекомбинантный рецепторсвязывающий домен (RBD) шиловидного белка (S белка) вируса SARS-CoV-2.

Технология рекомбинантного RBD белка включает следующие стадии: клонирование последовательности гена RBD в экспрессионный вектор, индуцирование клеток штамма-продуцента, культивирование клеток продуцентов, осаждение клеток из культуральной среды центрифугированием, лизис и разрушение клеток, разделение дифференциальным центрифугированием белков легко растворимой фракции и нерастворимых белков, очистка рекомбинантных белков с помощью аффинной хроматографии на агарозном носителе, содержащем присоединенный ковалентной связью белок protein A, стерилизующая фильтрация. Разработанная методика позволяет очищать рекомбинантный белок из биомассы штамма-продуцента с возможностью последующего масштабирования этого процесса до промышленных объемов.

Разработка технологии вакцины.

В результате проведенных исследований предложен следующий состав одной дозы (0,5 мл):

Название компонентов	Количество на дозу (0,5 мл)	Назначение
<i>Действующие вещества:</i>		
Рекомбинантный рецептор-связывающий белка Spike вируса SARS-CoV-2 (RBD)	5 мкг или 20 мкг	Антиген
<i>Вспомогательные вещества:</i>		
Корпускулярный адьювант на основе природного бетулина	200 мкг	Адьювант
Трис-HCl 0,05M, содержащий 0,15 M натрия хлорида	до 0,5 мл	

Примеры получения вакцинных препаратов.

Были проведены работы по отработке и оптимизации лабораторной технологии получения вакцины. В результате чего был разработан лабораторный регламент производства препарата "Вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, рекомбинантная жидкая, 10 мкг/мл".

Пример 1. Стерильный рекомбинантный рецепторсвязывающий домен белка Spike вируса SARS-CoV-2 (антиген RBD) добавляли в емкость с предварительно приготовленным стерильным адьювантом в Трис-HCl буферном растворе. Адьювант готовили в этой же емкости, помещенной в ультразвуковую баню. В емкость со стерильным буферным раствором подавали стерильный раствор бетулина в тетрагидрофуране с включенным ультразвуком при 35 кГц в течение 10 мин. После подачи и перемешивания

вания раствора бетулина полученную суспензию подвергали ультрафильтрации для удаления ТГФ, по завершении ультрафильтрации суспензию обрабатывали ультразвуком при 35 кГц в течение 3 мин. Далее в емкость подавали стерильный рекомбинантный антиген, растворенный в Трис-HCl буферном растворе из расчета, чтобы конечная концентрация антигена RBD составила 40 или 10 мкг/мл, а адьюванта - 400 мкг/мл. Емкость тщательно перемешивали и помещали в шейкере в холодильнике на 3 ч. Затем бутылки с антигеном RBD и адьювантом хранили в холодильной камере при температуре от 2 до 8°C. Полученный вакцинный балк после проведения контролей разлили во флаконы по 0,5 мл. Получили серии вакцины П1 40 мкг/мл в количестве 905 флаконов и 10 мкг/мл в количестве 840 флаконов для доклинических исследований.

Пример 2. В емкость со стерильным буферным раствором 0,01 М рН 8,8 объемом 5,5 л подавали 200 мл 2% раствор бетулина в тетрагидрофуране (ТГФ) в течение 10 мин при включенном ультразвуке мощностью 40 кГц. Полученную суспензию подвергают ультрафильтрации с применением буферного раствора и мембран с порогом исключения 100 кДа. Для повышения выхода адьюванта после каждого объема диафильтрующего буферного раствора (3×5 л) включают обратный поток с последующей обработкой суспензии ультразвуком в течение 3 мин при 35 кГц. Доводят объем суспензии до 5 л. Далее в емкость, при интенсивном перемешивании, добавляют 5 л раствора антигена, состоящего из белка, представляющего нуклеопротеин (N) вируса SARS CoV-2 и RBD этого же вируса в 0,05 М трис-HCl буфере рН 7,6, содержащего 0,15 М NaCl. Конечная концентрация антигена в суспензии составляла 10 мкг/мл, а адьюванта 400 мкг/мл.

Затем емкость с суспензией помещали в холодильник на 4°C, а через сутки разливали по 0,5 мл во флаконы.

Оценку полноты сорбции вакцин проводили методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа Shimadzu LC-2010 (Япония) и аналитической колонки Superdex 200 Increase 10/300GL. Испытуемый образец вакцины (0,5 мл) центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин. Наличие RBD белка в надосадочной жидкости контролировали по наличию пика со временем удерживания основного компонента, близким ко времени удерживания образца сравнения (субстанции RBD-Fc). На фиг. 5 и 6 представлены хроматографические профили образца фармацевтической субстанции и испытуемого образца вакцины.

Отсутствие пика в образце вакцины с временем удерживания 14,8 мин свидетельствует о полноте сорбции антигена на адьюванте бетулине.

Оценка специфической активности вакцины.

Целью исследования являлось сравнительное изучение иммуногенности вакцины в опытах на животных. В ходе исследования сравнивали выработку антител у иммунизированных опытными вакцинами мышей линии Balb/c массой 12-14 г обоего пола. Испытуемые препараты вводили двукратно (по схеме 0-14) внутривентриально по 0,5 мл шприцем вместимостью 1 мл. Аналогично контрольным группам животных вводили натрия хлорид, раствор для инфузий 0,9%. Забор крови осуществляли на 14 день после однократной иммунизации и на 14 день после двукратной иммунизации. Антитела определяли в сыворотках с помощью метода ИФА.

Исследовали специфическую активность вакцины содержащей только RBD (в двух дозировках: 5 и 20 мкг рекомбинантного белка в дозе (0,5 мл), вакцину N+RBD в дозировке 5 мкг антигена в дозе (0,5 мл), а также вакцину без адьюванта.

Данные о числе животных, о вакцинах и их дозировке при иммунизации представлены в табл. 6.

Таблица 6

Количество животных для определения уровня специфических антител

№	Наименование препарата	Количество животных
1	Вакцина RBD с адьювантом 10 мкг/мл	16
2	Вакцина RBD с адьювантом 40 мкг/мл	16
3	Вакцина RBD без адьюванта 10 мкг/мл	10
4	Вакцина RBD без адьюванта 40 мкг/мл	10
5	Вакцина N+RBD с адьювантом 10 мкг/мл	10
6	Вакцина N+RBD без адьюванта 10 мкг/мл	
7	Не вакцинированные мыши	8
Итого мышей		70

Полученные из крови мышей сыворотки (индивидуально от каждого животного) контролировали на наличие антител к антигену SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа с использованием экспериментальной тест-системы (ИФТС). При конструировании ИФТС использовались коммерческие реагенты: a/mouse IgG (H+L) Strong Zyme HRP Conjugate (фирмы "SDT", Германия); хромоген - 3,3,5,5-

тетраметилбензидин (фирмы "Хема", Россия); блокатор - белково-солевой раствор, в качестве стоп-реагента применялся 5% раствор серной кислоты. Иммуноферментную реакцию выполняли на полистироловых планшетах фирмы Greiner bio-one, Германия. На подложку наносили 1 мкг антигена SARS-CoV-2 и сорбировали в течение суток. Результаты иммуноферментного анализа регистрировали на спектрофотометре PR 2100 производства фирмы "Sanofi Diagnostiks Pasteur" (Франция) при двух длинах волн 450/620 нм.

Таблица 7

Иммуногенность вакцины с адьювантом в опытах на мышах
(средняя геометрическая титра)

Наименование образца (лекарственная форма)	Уровень антител (средняя геометрическая титра, доверительный интервал) *10 ^{3*}	
	1 иммунизация	2 иммунизация
Вакцина с адьювантом 10 мкг/мл	1,7 [0,6-5,0]	18,0 [10,4-31,0]
Вакцина с адьювантом 40 мкг/мл	3,2 [1,7-5,9]	28,7 [12,2-35,2]
Вакцина без адьюванта 10 мкг/мл	0,9 [0,4-2,4]	4,3 [2,7-16,9]
Вакцина без адьюванта 40 мкг/мл	0,8 [0,3-2,0]	3,5 [1,0-12,5]
Вакцина с адьювантом 10 мкг/мл	1,4 (0,7-4,8)	23,6 (15,3-30,7)
Вакцина без адьюванта 10 мкг/мл	0,8 (0,4-2,7)	5,1 (2,3-11,8)

*Величина, обратная разведению.

Таким образом, иммунизация животных вакциной с адьювантом способствует нарастанию титра антител, при этом следует отметить, что более выраженным действием обладает препарат, в состав которого входит адьювант.

Определение содержания адьюванта (КА).

Определение проводили методом обращено-фазовой ВЭЖХ в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.1.2.0005.15. Исследование проводили с использованием жидкостного хроматографа Shimadzu LC-2010 (Япония) и аналитической колонки Kromasil 300-5C8 250×4,6 мм с размером частиц 5 мкм, AkzoNobel (Голландия) в изократическом режиме элюирования и детектировании при 210 нм.

Таблица 8

Результаты определения содержания бетулина в вакцине с адьювантом

Препарат	Содержание бетулина, мкг в дозе (0,5 мл)
Вакцина с адьювантом 10 мкг/мл	220
Вакцина с адьювантом 40 мкг/мл	205

Таким образом, на основании проведенных исследований был разработан проект спецификации на препарат "Вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, рекомбинантная жидкая, 10 и 40 мкг/мл", максимально отражающий все требования, предъявляемые Государственной Фармакопеей к препаратам такого класса. Проект спецификации представлен в табл. 9.

Спецификация вакцины КовиВакс

№ п/п	Показатели	Методы (контроля)	Требования по НД
1.	Описание	Визуальный	Гомогенная дисперсия белого или желтовато-белого цвета, разделяющаяся при стоянии на бесцветную прозрачную жидкость и рыхлый осадок белого или желтовато-белого цвета
2.	Подлинность	Иммуноферментный анализ (ИФА)	Результат реакции на определение рекомбинантного рецептор-связывающего белка Spike вируса SARS-CoV-2 (RBD) должен быть положительным
3.	Механические включения	Визуальный, ГФ РФ, ОФС.1.4.2.0005.18	Должна выдерживать требования
4.	Седиментационная устойчивость	Визуальный, ГФ РФ, ОФС.1.4.1.0014.15	Дисперсия препарата, образующаяся при встряхивании, не должна расслаиваться в течение 2,5 минут
5.	Проходимость через иглу	Визуальный, ГФ РФ, ОФС.1.4.1.0014.15	Дисперсия препарата, образующаяся при встряхивании, должна свободно проходить через иглу №0840
6.	pH	Потенциометрический, ГФ РФ, ОФС.1.2.1.0004.15	От 7,0 до 7,6
7.	Извлекаемый объем	Физический, ГФ РФ, ОФС.1.4.2.0003.15	Должен быть не менее номинального
8.	Общий белок	Спектрофотометрический, ГФ РФ, ОФС.1.8.2.0010.18	От 4,0 до 5,0 мкг в дозе (0,5 мл)
9.	Стерильность	Метод прямого посева или метод мембранной фильтрации, ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0003.15	Дисперсия должна быть стерильна

10.	Пирогенность	Биологический, ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0005.15	Дисперсия должна быть апиrogenна
11.	Аномальная токсичность	Биологический, ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0004.15	Дисперсия должна быть нетоксична
12.	Специфическая активность	Иммуноферментный анализ (ИФА)	Должен вызывать выработку антител не менее чем у 80 % животных (мышей).
13.	Адьювант бетулин	Метод ВЭЖХ, ГФ РФ, ОФС.1.2.1.2.0005.15	от 160 до 240 мкг в дозе (0,5 мл)
14.	Упаковка		По 0,5 мл (1 доза) или по 2,5 мл (5 доз) во флаконы, по ОСТ 64-2-485-85 или ТУ 9462-002-11068395-2005, или импортные, соответствующие требованиям ISO 9187-1.
15.	Маркировка		В соответствии с НД
16.	Хранение		В соответствии с СП 3.3.2.3332-16 при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте. Не замораживать.
17.	Транспортирование		В соответствии с СП 3.3.2.3332-16 при температуре от 2 до 8 °С. Не замораживать.
18.	Срок годности		Устанавливается

Таким образом, установлено, что вакцина, содержащая корпускулярный адьювант на основе природного бетулина, обладает высокой антигенной активностью.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения адьюванта на основе бетулина для использования в вакцине против коронавируса SARS-CoV-2, включающий следующие стадии:

стерилизующая фильтрация раствора бетулина в тетрагидрофуране через нейлоновую мембрану с диаметром пор 0,22 мкм;

снижение содержания тетрагидрофурана путем добавления 25-кратного объема стерильного 0,01 М трис-буфера (pH 9,0±0,1) с помощью перистальтического насоса при постоянном перемешивании в течение 15 мин магнитной мешалкой пропеллерного типа;

гомогенизация ультразвуком при 35 кГц в течение 10 мин до получения гомогенной суспензии с образованием сферических аморфных частиц адьюванта, пригодных для связывания белков вируса SARS-CoV-2;

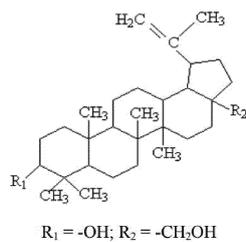
очистка полученной суспензии от тетрагидрофурана путем ультрафильтрации.

2. Способ по п.1, в котором ультрафильтрацию осуществляют с применением тангенциальной ультрафильтрации с буферным раствором на полых волокнах или фильтрах с номинальной отсекающей молекулярной массой 100-300 кДа.

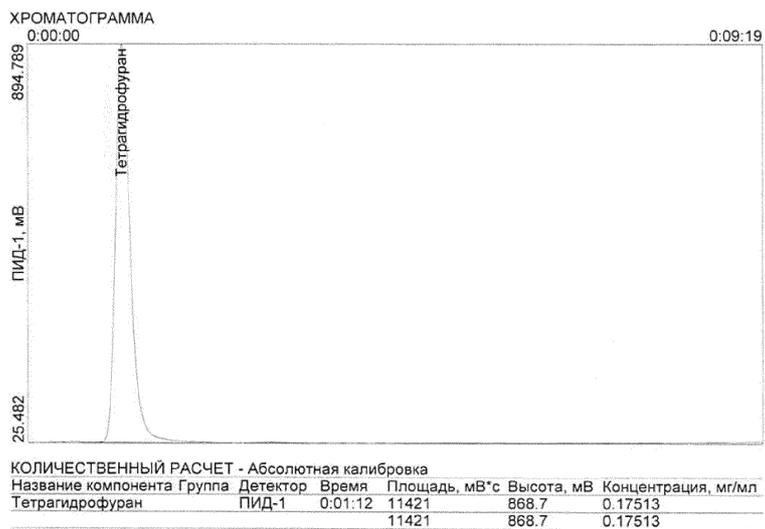
3. Способ по п.1, в котором для получения гомогенной суспензии проводят дополнительную обработку суспензии адьюванта ультразвуком после ультрафильтрации в режиме 35-40 кГц.

4. Способ по п.2, в котором для повышения выхода адьюванта после каждого объема диафильтрующего буферного раствора включают обратный поток с последующей обработкой суспензии ультразвуком в течение 3 мин при 35 кГц.

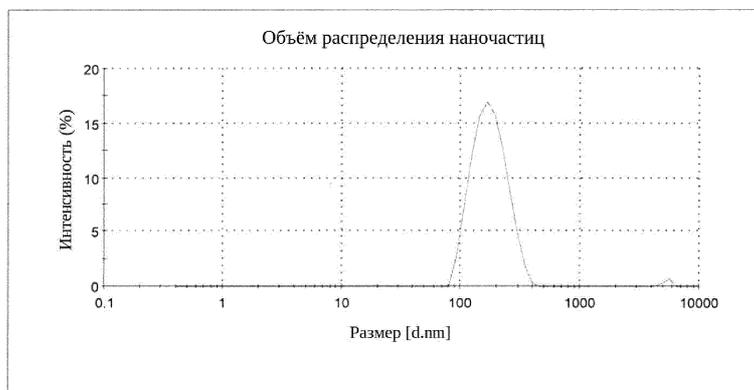
045336



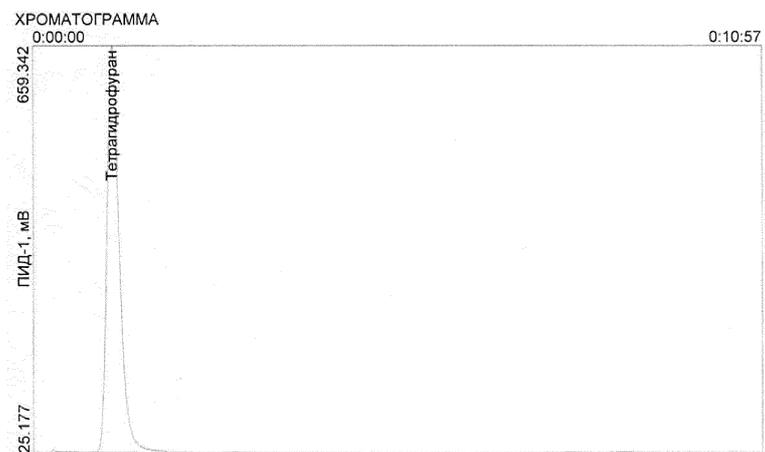
Фиг. 1



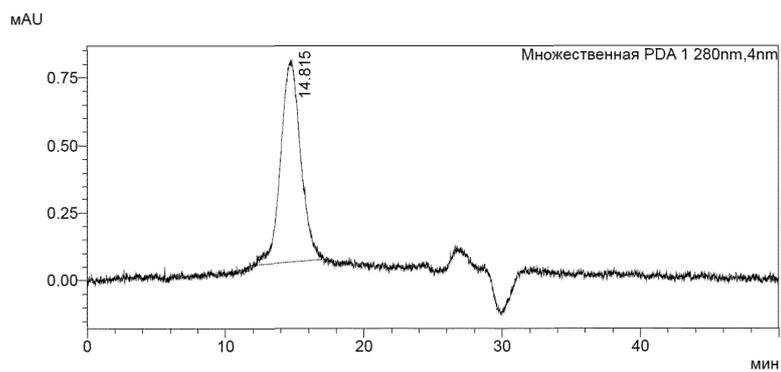
Фиг. 2



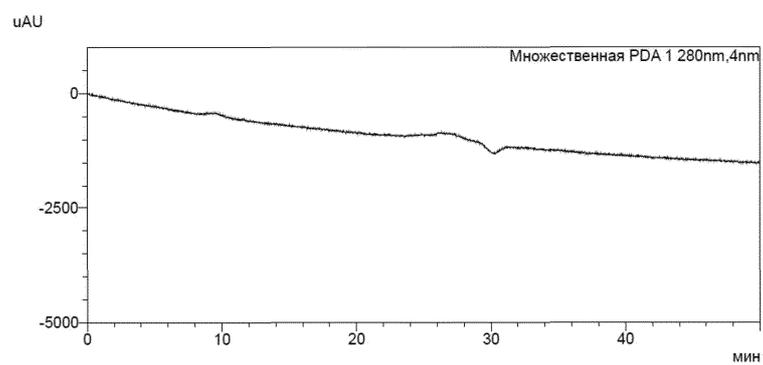
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6