

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 58219 A1** (51) Cl. internationale : **A61P 31/14; A61K 39/12**

(43) Date de publication :
31.05.2023

(21) N° Dépôt :
58219

(22) Date de Dépôt :
13.04.2021

(30) Données de Priorité :
18.05.2020 KZ 2020/0310.1

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:
PCT/KZ2021/000007 13.04.2021

(71) Demandeur(s) :
REPUBLICAN STATE ENTERPRISE ON THE RIGHT OF ECONOMIC MANAGEMENT "SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE OF BIOLOGICAL SAFETY PROBLEMS" OF THE MINISTRY OF HEALTHCARE, 15B.Momyshty Street,Zhambyl'skayaoblast,Kordayskiy rayon,uts. (KZ)

(72) Inventeur(s) :
Khairullin Bcrik Mukhitovich ; Zakar'ya Kunsulu ; Orynbaev Mukhit Barmakuly ; Kutumbetov Lespek Bekbolatovich

(74) Mandataire :
U.T.P.S.CO.LTD

(54) Titre : **Procédé d'obtention de vaccin inactivé de PROPHYLAXIE contre la COVID-19**

(57) Abrégé : La présente se rapporte aux domaines de la biotechnologie, de la virologie, de l'épidémiologie et de la santé publique, et concerne un procédé d'obtention d'un nouveau vaccin inactivé contre le coronavirus de la COVID-19. L'intérêt principal de l'invention est une souche de virus de la COVID-19 "SARS-CoV-2/KZ_Almaly/04.2020" isolée sur le territoire de la République du Kazakhstan. La souche du virus de la COVID-19 selon les conditions de culture optimales est produite dans le système de culture de cellules Vero, inactivée par du formaldéhyde, clarifiée par centrifugation à basse vitesse, purifiée et concentrée par diafiltration sur une unité de diafiltration d'un système Millipore Pellicon Cassette. La filtration par stérilisation est effectuée à travers des cascades de filtres ayant un diamètre de pore de 0,45/0,22 µm. 2 % de gel d'hydroxyde d'aluminium "Algidrogel, 85" sont ajoutés dans le pool de virus obtenu (concentré viral) jusqu'à la concentration finale de 0,5 mg/0,5 ml et embouteillés dans des flacons en verre. Le vaccin obtenu de

cette manière est sans danger par introduction intrapéritonéale à des souris blanches et de manière intraveineuse à des lapins. Le vaccin fournit 80 % de protection contre l'infection par la COVID-19 durant au moins 6 mois après deux vaccinations. Le vaccin conserve ses propriétés durant 12 mois à 4 à 6 °C.

-1-

طريقة الحصول على لقاح مثبت للوقاية من كوفيد-19

الملخص

يتعلق الاختراع بمجالات التكنولوجيا الحيوية، علم الفيروسات، علم الأوبئة والصحة العامة، والتي تعد طريقة للحصول على لقاح جديد مثبت ضد فيروس كورونا COVID-19. يتمثل جوهر الاختراع في عزل سلالة فيروس COVID-19، "SARS-CoV-2/KZ_Almaty/04.2020" عن أراضي جمهورية كازاخستان. يتم إنتاج سلالة فيروس COVID-19 وفقاً لظروف الزراعة النموذجية في نظام استزراع خلايا فيرو، مثبت من خلال الفورمالديهايد، يرشح بالطرد المركزي منخفض السرعة، وينقى ويركز بالترشيح المخفف على وحدة الترشيح المخفف من نظام Millipore Pellicon Cassette. يتم إجراء ترشيح بالتعقيم من خلال سلسلة من المرشحات بقطر مسامي يصل إلى 0.45 / 0.22 ميكرومتر. يتم إضافة هلام من هيدروكسيد الألومنيوم 2% " الجيدروجيل، 85" في تجمع الفيروس الذي تم الحصول عليه (مركز فيروسي) إلى التركيز النهائي الذي يصل إلى 0.5 مجم / 0.5 مل ويتم تعبئته في قوارير زجاجية. 5 10

يُعد اللقاح الذي تم الحصول عليه بهذه الطريقة آمناً عند الإدخال داخل الصفاق للفئران البيضاء وداخل الوريد- للأرانب. يوفر اللقاح حماية بنسبة 80% من عدوى كوفيد 19 لمدة 6 أشهر على الأقل بعد إثنين من التطعيمات. يحتفظ اللقاح بخصائصه لمدة 12 شهر عند 4-6م°.

-2-

طريقة الحصول على لقاح مثبت للوقاية من كوفيد-19

الوصف الكامل

خلفية الاختراع:-

يتعلق الاختراع بمجالات التكنولوجيا الحيوية، علم الفيروسات، علم الأوبئة والصحة العامة، والتي تعد طريقة للحصول على لقاح جديد مثبت ضد فيروس كورونا COVID-19 لتحسين الأشخاص بشكل وقائي.

5 يتمثل جوهر الاختراع في عزل فيروس كوفيد-19 من سلالة "SARS-CoV-2/KZ_Almaly/04.2020" عن أراضي جمهورية كازاخستان حيث تستخدم للحصول على اللقاح المثبت ضد فيروس كورونا COVID-19. تم عزل الفيروس في Almaty عن مرضى أصيبوا بعدوى فيروس كورونا.

10 وفقاً لظروف الزراعة النموذجية في نظام استزراع خلايا فيرو، مثبت من خلال الفورمالديهايد، يرشح بالطرد المركزي منخفض السرعة، وينقى ويركز بالترشيح المخفف على وحدة الترشيح المخفف من نظام Millipore Pellicon Cassette. يتم إجراء ترشيح بالتعقيم من خلال سلسلة من المرشحات بقطر مسامي يصل إلى 0.45 / 0.22 ميكرومتر. يتم إضافة هلام من هيدروكسيد الألومنيوم 2% " الجيدروجيل، 85" في تجمع الفيروس الذي تم الحصول عليه (مركز فيروسي) إلى التركيز النهائي الذي يصل إلى 0.5 مجم / 0.5 مل ويتم تعبئته في قوارير زجاجية. 15

يُعد اللقاح الذي تم الحصول عليه بهذه الطريقة آمن عند الإدخال داخل الصفاق للفئران البيضاء وداخل الوريد- للأرناب. يوفر اللقاح حماية بنسبة 80% من عدوى كوفيد-19 لمدة 6 أشهر على الأقل بعد إثنين من التطعيمات. يحتفظ اللقاح بخصائصه لمدة 12 شهر عند 4-6م. يمكن استخدام الاختراع في الصحة العامة للتحسين الوقائي للأشخاص من كوفيد-19 من أجل ضمان الوقاية الوبائية للسكان من هذه العدوى.

المستوى التكنولوجي

-3-

تُعد فيروسات كورونا عبارة عن فيروسات مغلفة بجين RNA أحادي السلسلة بحساسة إيجابية (32-26 كيلو بايت). تم تحديد أربعة أنواع من الفيروسات التاجية (α , β , γ , δ) حتى الآن لدى البشر (HCoV) تم اكتشافها في فيروس كورونا α - (HCoV-229E و NL63) وفيروس كورونا- β (SARS-CoV، MERS-CoV، HCoV-OC43 و HCoV-HKU1). تم الإبلاغ عن مرضى يعانون من السعال، الحمى وضيق التنفس مع متلازمة ضيق التنفس الحادة (ARDS) بسبب عدوى جرثومية غير محددة في ووهان، الصين في نهاية ديسمبر 2019. كشف تسلسل الجينوم الفيروسي لخمسة مرضى التهاب رئوي تم نقلهم إلى المستشفى في الفترة من 18 إلى 29 ديسمبر 2019 عن وجود سلالة β -CoV غير معروفة سابقاً في كل منهم. ثم تم تسمية β -CoV الجديد باسم "SARS-CoV-2" [He, Y., وآخرون. تحييد فيروسات كورونا المتلازمة التنفسية الحادة الوخيمة في الإنسان وزباد النخيل عن طريق الأجسام المضادة التي تستهدف مجال ربط مستقبلات بروتين سبايك/6085- P. 176. - 2006. - J. Immunol. / 6092. doi: 10.4049/jimmunol.176.10.6085].

تم تحديد أربعة أجناس من فيروس كورونا (α , β , γ , δ) حتى الآن لدى البشر (HCoV) تم اكتشافها في فيروس كورونا- α (HCoV-229E و NL63) وفيروس كورونا- β (SARS-CoV، MERS-CoV، HCoV-OC43 و HCoV-HKU1) [Wirblich C., et al. One-] 15 Health: لقاح آمن وفعال وذو استخدام مزدوج للإنسان والحيوان ضد فيروس كورونا المسبب لمتلازمة الشرق الأوسط التنفسية وفيروس داء الكلب // 16-02040-e02040-91. - 2017. - J. Virol.]. تم الإبلاغ عن مرضى يعانون من السعال، الحمى وضيق التنفس مع متلازمة ضيق التنفس الحادة (ARDS) بسبب عدوى جرثومية غير محددة في ووهان، الصين في نهاية ديسمبر 2019. كشف تسلسل الجينوم الفيروسي لخمسة مرضى التهاب رئوي تم نقلهم إلى المستشفى في الفترة من 18 إلى 29 ديسمبر 2019 عن وجود سلالة β -CoV غير معروفة سابقاً في كل منهم. [Jaume M., et al.، لقاح الوحدة الفرعية لـ SARS CoV: التحييد والتعزيز بواسطة الأجسام المضادة // 31-36 P. 18. (2). - 2012. - Hong Kong Med. J.]. يُظهر هذا الفيروس

- المعزول β -CoV هوية تسلسل 88% لاثنتين من المتلازمة التنفسية الحادة الوخيمة للخفافيش (SARS) - مثل فيروسات كورونا bat-SL-CoVZC45 و bat-SL-CoVZXC21، وحوالي 50% هوية تسلسل مع تسلسل MERS-CoV [Jiaming et al.], يُعد المجال الطرفي N- المؤتلف لبروتينات سبايك لقاح محتمل ضد عدوى فيروس كورونا المتلازمة التنفسية للشرق الأوسط (MERS-CoV) // لقاح [doi: 10.1016/j.vaccine.2016.11.064 - P. 10-18. - 35. - 2017]. 5
- أدى ظهور فيروس كورونا المستجد COVID-19 للإنسان في مدينة ووهان الصينية إلى انتشار وباء المرض في جميع أنحاء العالم في العديد من البلدان حول العالم، واضطرت منظمة الصحة العالمية إلى الإعلان عن بداية جائحة فيروس كورونا الناجم عن COVID-19. في الوقت الحالي، تفتقر المستحضرات المضادة للفيروسات لعلاج هذا المرض، وتهدف جهود العلماء في العديد من دول العالم إلى تصنيع المستحضرات الوقائية ضد هذا المرض. 10
- تم استخدام أساليب مختلفة لتطوير لقاحات ضد عدوى فيروس كورونا. حتى الآن، لا يوجد مستحضر مضاد للفيروسات ذو فعالية مثبتة ضد فيروسات كورونا SARS-CoV، MERS-CoV أو 2019-nCoV. في هذا الإتجاه، يعد تطوير لقاح فعال ضد فيروسات كورونا المعروفة والمستجدة له أولوية قصوى في مكافحة هذه العدوى الخطيرة. حتى الآن، لم يتم تسجيل أي لقاح للوقاية من الإصابة بفيروسات كورونا الممرضة. 15
- حاليًا، يتم تطوير أنواع مختلفة من اللقاحات مثل الوحدات الفرعية القائمة على الحمض النووي، والقائمة على الحمض النووي الريبي (RNA)، والمؤتلفة التي تحتوي على أبيتوبات فيروسية، ناقلات قائمة على الفيروسات الغدية، والفيروس المثبط المنقى [Lurie N. et al., Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed// N Engl J Med. - 2020. doi: 10.1056/NEJMp2005630; Dhama K. et al., 20 :COVID-19: عدوى فيروس كورونا المستجد / Hum التطورات والإحتمالية لتصميم وتطوير اللقاحات، العلاجات المناعية والعلاجات / Hum 0.1080/21645515.2020.1735227; Kim E. et al., :Vaccin Immunother. - 2020. Doi Microneedle array delivered recombinant coronavirus vaccines: Immunogenicity and

-5-

rapid translational development// EBioMedicine. – 2020. – 1:102743. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102743.].

تُستخدم الفيروسات المثبطة المنقاة تقليديًا لتطوير اللقاحات وقد تم إثبات أن مثل هذه اللقاحات آمنة وفعالة للوقاية من الأمراض التي تسببها الفيروسات مثل الإنفلونزا وفيروس شلل الأطفال [Murdin AD et al., Inactivated poliovirus vaccine: past and present] 5
 experience// Vaccine. – 1996. – 14 (8). – P. 735-746.; Vellozzi C. et al., لقاحات الأنفلونزا المثبطة ثلاثية التكافؤ لدى البالغين: خلفية عن رصد سلامة لقاح الأنفلونزا Vaccine. –2009. – 26. – 27 (15). – P. 2114-2120. doi: 10.1016/j. vaccine. //الجائحة
 .[2009.01.125

بالنظر إلى الأهمية الكبيرة للإجراءات الفعالة لمكافحة الوباء، فقد تم تطوير تقنية 10
 تصنيع لقاح كامل virion مثبط ضد COVID-19 في معهد أبحاث مشاكل السلامة البيولوجية.
 يتمتع RIBSP SC MES RK بخبرة واسعة في تطوير وسائل الوقاية المحددة من الأمراض المعدية لدى البشر، الحيوانات والطيور.

من المقرر أن يتم تسجيل اللقاح المطور في المستقبل في وزارة الصحة العامة لجمهورية 15
 كازاخستان نظرًا لمزاياها التقنية. وتعد الاحتمالية الهامة عي الإنتاج الصناعي للقاح الأول ضد
 فيروس كورونا المستجد لضمان الرفاه الوبائي لسكان كازاخستان. ويُعد المستهلكون المحتملون لنتائج المشروع هم وزارة الصحة العامة في جمهورية كازاخستان.

تم تطوير طريقة إنتاج اللقاح المنقى المثبط (PiCoVacc) ضد كوفيد 19 بواسطة شركة 20
 Sinovac Biotech Ltd، بكين، الصين المعروفة [Qiang Gao et al.], تطوير لقاح مثبط مرشح
 SARS-CoV-2// Science 06 مايو 2020: 2020. doi: 10.1126/science.abc1932. [eabc1932.

تم عزل الفيروس من المرضى المصابين. تم نشر الفيروس في مزرعة خلايا فيرو سعة 50 لتر
 باستخدام مصنع الخلايا وتم تنشيطه باستخدام β -بروبيولاكتون لتطوير اللقاح. تمت تنقية

-6-

الفيروس باستخدام ترشيح عميق وإثنين من الخطوات الكروماتوغرافية المحسنة. ويعتبر اللقاح الذي تم الحصول عليه آمن ويوفر مستوى عالٍ من الأجسام المضادة المعادلة للفيروس.

أعلنت منظمة الصحة العالمية أن تفشي مرض فيروس كورونا 2019 (COVID-19) هو حالة طارئة في مجال الصحة العامة الاجتماعية لها المعنى الدولي في 30 يناير 2020 والجائحة في 11 مارس 2020. يُعد فيروس كورونا المستجد هو نوع من فيروس SARS الذي ظهر في الصين في 2002-2003 وتسبب في جائحة بقتل حوالي 800 شخص على مستوى العالم.

وتعد فيروسات كورونا عبارة عن عائلة كبيرة من الفيروسات التي يمكن أن تسبب المرض، من نزلات البرد إلى المتلازمة التنفسية الحادة الوخيمة (SARS). تسبب الفيروسات من هذه العائلة أيضًا عدد من الأمراض لدى أنواع مختلفة من الحيوانات. وتعد متلازمة الشرق الأوسط التنفسية (MERS) هي مرض تنفسي فيروسي يسببه فيروس كورونا المستجد (MERS-CoV)، والذي تم تشخيصه لأول مرة في المملكة العربية السعودية في عام 2012 ثم انتشر إلى 26 دولة في آسيا، إفريقيا وأوروبا مما أدى إلى وفاة الأشخاص المصابين. أظهر تحديد التسلسل الكامل لحينوم الفيروس أنه ينتمي إلى نوع مستجد من الفيروس التاجي من جنس عائلة فيروس كورونا 15 Betacoronavirus family Coronaviridae. يختلف هذا الفيروس عن فيروسات كورونا الأخرى المعروفة، بما في ذلك تلك التي تسبب SARS. تسبب العدوى الحيوانية المنشأ أمراض وخيمة لدى الإنسان تؤدي إلى ارتفاع معدل الوفيات (36%). لم يتم تطوير اللقاح الفعال بعد. إن الانتشار السريع والإمراضية العالية يثبتان القدرة الإمراضية العالية للفيروس وانتقال المرض من شخص لآخر. يتسبب كل ذلك بالفعل في خسائر اقتصادية فادحة في العالم، وصدّات كبيرة وعواقب اجتماعية وخيمة، وإلحاق أضرار كارثية بجميع البلدان.

حاليًا، لا توجد مستحضرات أو لقاحات محددة مضادة للفيروسات ضد فيروس SARS-CoV-2 الذي ظهر مؤخرًا. لذلك، فإن هناك حاجة ملحة لتطوير لقاح والذي يعد أمر حيوي لاحتواء الوباء ومنع تفشي فيروسات جديدة

[<https://rus.postimees.ee/6967335/vakcina-ot-koronavirusa-kogda-i-komu-ona-budet-dostu>].

- يؤتفح الطلب بشكل كبير حاليًا على مستوى العالم على لقاح ضد فيروس كورونا كونه ينتقل إلى فئة الأمراض الموسمية، ويطرح مهمة تطوير لقاح فعال للتطعيم السنوي لمعظم السكان. توصي منظمة الصحة العالمية كل بلد بتطوير لقاح خاص بها وأن يكون لها إنتاجيتها الخاصة، لأنه لن يكون هناك استعدادات وقائية كافية لجميع السكان، مما سيؤثر بشكل خاص على سكان البلدان التي لا يوجد فيها إنتاج لقاح محلي. من المعروف أنه في المستقبل القريب ستبدأ جميع دول العالم في تلقيح 30% على الأقل من السكان سنويًا. في هذا الصدد، تعمل المنظمات العلمية الرائدة في العالم على تطوير تقنية التصنيع، واختبارها وإدخالها في الممارسة الطبية للقاح ضد فيروس كورونا. وفي هذا الصدد، فإن أحد الجوانب المهمة لكل بلد هو الاستعداد العلمي والتقني لإنتاج لقاحات خاصة به ضد فيروس كورونا.
- 5
- 10
- 15
- 20
- في عالمنا المعاصر، يعتبر التطعيم للوقاية من فيروس كورونا ذو نهج هام اجتماعيا، وفعال من حيث التكلفة وموفر للموارد، ويفضل سياسة الانتظار والترقب. لذلك، فإن تطوير الإنتاج المحلي للقاح ضد فيروس كورونا لتلبية احتياجات جمهورية كازاخستان يعد أكبر مهمة للسلامة الوطنية والتنمية المستقرة لبلدنا.
- يُعد التطوير المستمر للتكنولوجيا الحيوية وعلم اللقاحات، على وجه الخصوص، يثبت أبعاد طويلة المدى لتطوير تكنولوجيا إنتاج اللقاحات المثبطة التقليدية. ويظل عدد من اللقاحات المثبطة عالية الفعالية هي الوسيلة الرئيسية للوقاية النوعية من الأمراض المعدية الخطيرة بشكل خاص. وتحدد السلامة المؤكدة وعدم إلحاق الضرر بها، والأهم من ذلك تقوية المناعة المضمون، والحاجة إلى مزيد من التطوير والتحسين لتقنية تصنيع اللقاحات المثبطة. من الهام أيضًا القدرة على خلق التقنية اللازمة بشكل أسرع للوقاية المحددة من الأمراض المعدية، وهو مبدأ تطوير لقاحات جديدة مثبطة.

-8-

مع الأخذ في الاعتبار الأهمية الاجتماعية والاقتصادية لتطوير لقاح جديد على المستويين الوطني والدولي، وكذلك أهميته في مجال ضمان السلامة البيولوجية للبلد، فإن معهد أبحاث مشاكل السلامة البيولوجية في SC MES RK لديه تقنية متطورة لتصنيع لقاح COVID-19 المثبط.

5 الفرق الأساسي بين هذا التطور والمرشحين الحاليين هو أن سلالة فيروس كورونا الجديد تستخدم، ذات الصلة الوبائية بإقليم جمهورية كازاخستان، يتم استخدام الفورمالديهايد لتنشيط الفيروس، ويتم توضيح التعليق المحتوي على الفيروس عن طريق الطرد المركزي منخفض السرعة، ويتم تنقية وتركيز المعلق الفيروسي عن طريق الترشيح والتنقية بتعقيم المادة المركزة المنقاة من خلال سلسلة من المرشحات بقطر مسامي 2.0 / 1.2 ميكرون و 0.45 / 0.22 ميكرون وإضافة المادة المساعدة "الجيدروجيل، 85" في مجمع الفيروس إلى التركيز النهائي 0.5 مجم / 0.5 مل.

15 يتم تحديد الأهمية الكبيرة للتطوير المقدم على المستويين الوطني والدولي من خلال حقيقة أنه تم تطوير طريقة لإعداد لقاح جديد لفيروس كورونا، مما سيجعل من الممكن تنفيذ العمل بشكل فعال على الوقاية من العدوى والقضاء عليها وضمان السلامة الاجتماعية والإقتصادية. يمكن تسجيل اللقاح المطور في وزارة الصحة العامة في جمهورية كازاخستان كمستحضر مناعي فعال للوقاية المحددة من فيروس كورونا.

السمات التي تميز الاختراع، والتي يوفر الجمع بينها نتيجة تقنية، هي:

- 1) يتم تحضير اللقاح باستخدام السلالة الوبائية " SARS-CoV-2/ KZ_Almaly/ " من العامل المسبب لعدوى فيروس كورونا COVID-19 المتواجدة في مجموعة الكائنات الدقيقة لـ RIBSP SC MES RK بموجب الأرقام M-9-20/D؛
- 2) يتم تحضير مزارع خلايا فيرو أحادية الطبقة عن طريق زراعتها في قوارير أو أوعية باستخدام وسط استزراع DMEM يحتوي على 10% من مصل الدم لأجنة الأبقار؛

-9-

- (3) يتم تحضير مجموعات البذور الرئيسية والعاملة وكذلك مجموعات إنتاج الفيروس في مزرعة خلايا فيرو؛
- (4) يُزرع الفيروس في مزارع خلايا فيرو أحادية الطبقة عن طريق الإصابة بسلاية " SARS-CoV-2/KZ_Almaly/04.2020 من العامل المسبب لعدوى فيروس كورونا COVID-19 بجرعة $TCD_{50/cell}$ 0.0001-0.001 عند درجة حرارة 37°م لمدة 72 ساعة؛ 5
- (5) مع تطور التأثير الممرض للخلايا للفيروس في 80% على الأقل من الخلايا أحادية الطبقة، يتم تجميد القوارير المزودة بزراعة الخلايا عند درجة حرارة أقل من 40 درجة مئوية أو أقل. ثم يتم إذابة محتويات القوارير في درجة حرارة الغرفة، مجتمعة، لتحضير مستنبت مشترك فيروسي؛
- (6) يتم تثبيط المعلق المحتوي على الفيروس بواسطة الفورمالديهايد عند التركيز النهائي 0.05% عند درجة حرارة 37°م ودرجة حموضة وسط التفاعل من 6.8-5.7 لمدة 72 ساعة؛ 10
- (7) يتم توضيح المعلق المحتوي على الفيروس المثبط بواسطة الطرد المركزي منخفض السرعة عند 2500 دورة في الدقيقة لمدة 30 دقيقة. يتم استخدام الشحنات الفائقة للتعليق المحتوي على الفيروس بمزيد من العمل؛
- (8) بعد التوضيح، يتم ترشيح المعلق المحتوي على الفيروس المثبط مقابل 10 أحجام من محلول الفوسفات العازل (PBS) من أجل تنقية فعالة؛ 15
- (9) يتم إجراء التنقية النهائية والتركيز للمعلق المحتوي على الفيروس عن طريق الترشيح النهائي عن طريق التعقيم من خلال سلسلة من المرشحات ذات قطر مسام يصل إلى 0.45/0.22 ميكرون؛
- (10) لتحضير اللقاح النهائي، يضاف 2% هلام هيدروكسيد الألومنيوم "الجيدروجيل"، 85 إلى المعلق المحتوي على الفيروس المثبط والمنقى إلى التركيز النهائي 0.5 مجم/0.5 مل؛ 20

-10-

11) يتم تعبئة اللقاح النهائي في 1-10 مل في أمبولات أو قوارير ثم يتم لصقها لاحقًا. من أجل تطوير تقنية تصنيع اللقاح المثبط من مريض مصاب بعدوى فيروس كورونا COVID-19، تم عزل عزل فيروس وبائي في المستشفى السريري المعدي في ألماتي في أبريل 2020. بعد ذلك، سلالة "SARS-CoV-2/KZ_Almaly/04.2020" تم إنتاج/04.2020 "لفيروس عدوى فيروس كورونا COVID-19 من العزل عن طريق التكاثر التكيفي في استزراع خلايا فيرو 5 واختيار الفيروسات المفردة باستخدام التخفيفات المحدودة.

معلومات تؤكد إمكانية تنفيذ الاختراع

فيما يلي وصف للتجسيمات المفضلة للاختراع الحالي. تم وصف هذه التجسيمات لفهم الاختراع بشكل أفضل. بالإضافة إلى ذلك، تجدر الإشارة إلى إمكانية تعديل الطريقة المقدمة من أجل تنفيذها بشكل أفضل. فيما يلي أمثلة لإمكانية تنفيذ الاختراع. 10

مثال 1

إنتاج زراعة خلايا فيرو

لتطوير زراعة خلايا فيرو، يتم إجراء الزراعة الجدارية في قوارير استزراع بلاستيكية في وسط استزراع DMEM مع إضافة 10% مصلى بقرى جنيني و 1% جلوتامين عند 37°م حتى يتم تحضير 80-90% من الخلايا أحادية الطبقة. في السابق، يتم استخلاص الأمبولة المزودة بزراعة الخلايا من النيتروجين السائل، ويتم إذابة المحتويات في حمام مائي بدرجة حرارة 40°م لمدة 1-2 دقيقة، ويتم فتحها بطريقة معقمة ويتم زرع معلق الخلايا المذابة في قوارير تحتوي على وسيط مغذي DMEM يحتوي على 10% مصلى دم من أجنة بقرية. قبل البذر، يتم تحديد تركيز الخلايا المذابة وقابليتها للحياة. يجب أن يكون تركيز الخلايا $10^5 \times 1.0$ سم³ على الأقل مع 90% من الخلايا القابلة للحياة على الأقل. 20

يتم اختبار الزراعة الخلوية التي تم الحصول عليها من أجل التعقيم عن طريق البذر على وسط بكتيري (أجار بيتون اللحم (MPA)، مرق بيتون اللحم (BCH)، وسط سائل سابورو

-11-

وصلب) بحجم 0.5 سم³، بالإضافة إلى التحكم في وجود يتم إجراء المايكوبلازما باستخدام مجموعة الكشف عن المايكوبلازما EZ-PCR.

مثال 2

تحضير معلق يحتوي على فيروس

5 علاوة على ذلك، فإن مزرعة خلايا فيرو مصابة بفيروس "SARS-CoV-2/KZ_Almaty/04.2020". لهذا الغرض، يتم تطبيق المعلق الفيروسي للسلالة "SARS-CoV-2/KZ_Almaty/04.2020" بجرعة $0.0001-0.001$ TCD_{50/cell} على مزرعة الخلية أحادية الطبقة في القارورة، بعد إزالة وسط زراعة النمو. بعد ذلك، يُضاف وسط الاستزراع أو محلول هانكس إلى الوعاء بحجم يصل إلى 10% من الحجم الإجمالي للوعاء/ القارورة ويوضع في جهاز التحضين عند درجة حرارة 37°م لمدة 60 دقيقة. ثم تتم إزالة المحتويات، ويضاف الوسط المغذي الداعم الذي يحتوي على 2% من مصل دم بقري جنيني، وتستمر الزراعة. يتم تحديد وجود الفيروس وتكاثره عن طريق الفحص المجهرى من خلال العمل الممرض للخلايا. مع تطور التأثير الممرض للخلايا للفيروس في 80% على الأقل من خلايا الطبقة الأحادية، يتم تجميد القوارير المزودة بزراعة الخلية ثم يتم دمج المعلق المذاب لتحضير معلق فيروسي مشترك. يجب أن يكون المعلق الفيروسي الناتج معقم، ويجب أن يكون معيار النشاط البيولوجي 15 $10^{5.0}$ /TCD₅₀ سم³ على الأقل.

مثال 3

تنشيط وتوضيح التعليق المحتوي على الفيروس

20 يتم تنشيط المعلق المحتوي على الفيروس من سلالة "SARS-CoV-2/KZ_Almaty/04.2020" بواسطة الفورمالديهايد. يضاف العامل الكيميائي الخامل للفيروس - الفورمالديهايد إلى الكتلة الحيوية المستتنبئة بتركيز 0.05% من إجمالي حجم المنتج، ويخلط جيداً ويحفظ لمدة 72 ساعة عند درجة حرارة 37°م ودرجة حموضة لوسط التفاعل 6.8-7.5، مع تقليب مستمر على جهاز خلط خاص. بعد الوقت المحدد، يتم أخذ عينة بحجم 15 سم³ من الكتلة الحيوية للتحقق

-12-

من التثبيت الكامل للفيروس. يتم توضيح المعلق المحتوي على الفيروس المثبط بواسطة الطرد المركزي منخفض السرعة عند 3000 جم لمدة 30 دقيقة. تتم إزالة الرواسب، ويستخدم المعلق الطافي في أعمال أخرى.

مثال 4

5 تنقية وتركيز المعلق المحتوي على الفيروس المثبط

لغرض التنقية والتركيز، يتم استخدام طريقة الترشيح، والتي يتم استخدام نظام Millipore Pellicon Cassette. لهذا الغرض، يتم تغذية تعليق الفيروس باستخدام مضخة تمعجية، مع ضغط مدخل لا يتجاوز 10 رطل لكل بوصة مربعة، وضغط مخرج التدفق العائد 1- رطل لكل بوصة مربعة. يتم إجراء الترشيح حتى يقل حجم التعليق المحتوي على الفيروس بمقدار 5 مرات. ثم يتم إجراء غسيل الكلى مقابل 10 أحجام من المحلول المنظم 1 (1.0 مولار كلوريد الصوديوم؛ 0.01 مولار FBI أس هيدروجيني 7.4؛ 0.001 مولار EDTA) و 6 أحجام من المحلول المنظم 2 (0.15 مولار كلوريد الصوديوم؛ 0.01 مولار FBI أس هيدروجيني 7.4؛ 0.001 مولار EDTA). بعد تغيير المخزن المؤقت، يتم تنفيذ التركيز النهائي حتى يتم إنتاج الحجم الأدنى (400 مل). ينقل المركز إلى قارورة معقمة بسعة 500 مل. درجة التنقية من الألبومين البياضوي بعد هذه المرحلة من التنقية والتركيز 87.7%. في المستقبل، يتم إجراء ترشيح معقم للمعلق المحتوي على الفيروس المثبط. يتم إجراء الترشيح المعقم للمعلق المحتوي على الفيروس المثبط من خلال سلسلة من المرشحات بقطر مسامي يبلغ 0.45 / 0.22 ميكرون. يتم إدخال تركيز الفيروس المنقى المعقم بدرجة حرارة 15-20 درجة مئوية في نظام وحدة التعقيم باستخدام المضخة التمعجية. يجب ألا يتجاوز ضغط المدخل 100 رطل لكل بوصة مربعة. يتم جمع الترشيح في قوارير قياس معقمة، مغطاة بسدادات مطاطية ومكتوبة باسم المادة وتاريخ الترشيح. يتم خلط محتويات القارورة ويتم أخذ عينة 20 مل لمراقبة الجودة.

-13-

درجة التنقية من الزلال البيضاوي بعد مراحل التنقية والتركيز 90.7%. أظهر التحكم في المادة المحضرة للتعميم عدم نمو البكتيريا الدقيقة الأجنبية على وسائط MPA، BCH، Sabouraud الصلبة، السائلة، Kitta-Tarozzi.

مثال 5

5 إضافة المادة المساعدة والحصول على تجمع الفيروس للقاح الفيروس المثبط

يتم تجانس محلول 2% من 'Alhydrogel® 85' باستخدام نقاط البيع المجانسة. G-30 عند 3000 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق. بعد ذلك، يضاف حجم متساوٍ من لقاح تجمع الفيروسات المعقم إلى الوعاء مع المادة المساعدة المتجانسة ويتجانس مرة أخرى عند 3000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة ويتم تحضينها في الغرفة المناخية عند درجة حرارة (6 ± 2) درجة مئوية، تنظمها وحدة تحكم البرنامج RP 22/4، لمدة 24 ساعة مع التقليب المستمر (60-80 دورة في الدقيقة) باستخدام الدوار "Techne". بعد انتهاء فترة التحضين، يتم أخذ عينات في الحجم لمراقبة الجودة. يجب أن يكون هيدروكسيد الألومنيوم بتركيز 0.5 مجم / 0.5 مل في اللقاح النهائي.

مثال 6

15 تعبئة وغلق اللقاح المثبط ضد فيروس كورونا

يتم سكب مجموعة لقاح الفيروس مع المادة المساعدة في خزانة السلامة البيولوجية وفقاً لقواعد التعقيم في (5.3 ± 0.01) مل (الحجم الزائد) في قوارير من أنبوب زجاجي للأدوية FI-14a 0-5 وفقاً للمواصفات 99-00480678-025-9461-TU بسعة 5 مل باستخدام موزع الحقن. يتم تحديد دقة التعبئة بواسطة منظم حجم التعبئة. يتم خلط القارورة التي تحتوي على تجمع فيروسات سائل بشكل دوري يدويًا وأثناء التعبئة تكون في حاوية مليئة بالتلج المذاب. توضع القوارير المملوءة في حاويات معدنية بغطاء قابل للإغلاق ويتم إغلاق كل قنينة بإحكام بسدادة خاصة وفقاً للمواصفات 94-106612-38-TU. أثناء عملية تعبئة اللقاح، يتم أخذ عينات للمراقبة. يتم غلق أغطية الألومنيوم باستخدام جهاز الغلق وفقاً لـ GOST 51314-99.

-14-

عناصر الحماية

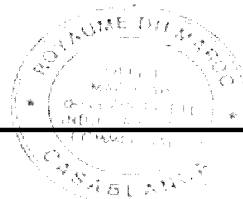
1- طريقة الحصول على اللقاح المثبط للوقاية من كوفيد 19 (COVID-19)، متضمنة استخدام سلالة فيروس COVID-19، زراعة الفيروس في مزرعة خلايا فيرو، تختلف في أن اللقاح تم تحضيره باستخدام السلالة الوبائية "SARS-CoV-2/KZ_Almaty/04.2020"، يستخدم الفورمالديهايد لتنشيط الفيروس، لتوضيح الفيروس المثبط يتم استخدام طريقة التنقية والتركيز بواسطة الترشيح المخفف باستخدام وحدة الترشيح المخفف من نظام Millipore Pellicon Cassette، يتم إجراء ترشيح بالتعقيم المحتوي على الفيروس المثبط من خلال سلسلة من المرشحات بقطر مسامي 0.45/0.22 ميكرومتر، يتم الحصول على تجمع لقاح الفيروس على شكل مركز فيروسي ويضاف 2% هلام من هيدروكسيد الألومنيوم "الجيدروجيل، 85" إلى تركيز نهائي 0.5 مجم/ 0.5 مل.

5

10

**RAPPORT DE RECHERCHE
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée
par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 58219	Date de dépôt : 13/04/2021 Date d'entrée en phase nationale : 20/10/2022
Déposant : REPUBLICAN STATE ENTERPRISE ON THE RIGHT OF ECONOMIC MANAGEMENT "SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE OF BIOLOGICAL SAFETY PROBLEMS" OF THE MINISTRY OF HEALTHCARE	Date de priorité: 18/05/2020
Intitulé de l'invention : Procédé d'obtention de vaccin inactivé de PROPHYLAXIE contre la COVID-19	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport	
<input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté	
<input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention	
<input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: LAHCHIMI Fatima Zahra	Date d'établissement du rapport : 30/03/2023
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	



Partie 1 : Considérations générales**Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description
13 Pages
- Revendications
1

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB: A61K39/12; A61P31/14

CPC : A61K 39/12; A61P 31/14; C12N2770/20021; C12N 2770/20034; C12N 2770/20063

Plateformes et bases de données électroniques de recherche :

EPOQUENET, WPI, ScienceDirect, ORBIT

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
X	Développement rapide d'un vaccin inactivé contre le SARS-CoV-2 ; Qiang Gao et al ; bioRxiv ; 19/04/2020 ; XP027652402 ; pages 1-29 https://doi.org/10.1101/2020.04.17.046375	1
X	CN1566335; SINOVA BIOTECH CO LTD; 19/01/2005	1
X	CN1616654; KEXING BIOLOG PRODUCT CO LTD BEIJING; 15/09/2010	1

***Catégories spéciales de documents cités :**

-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
-« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité**Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications 1 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive	Revendications aucune Revendications 1	Oui Non
Application Industrielle	Revendications 1 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : Développement rapide d'un vaccin inactivé contre le SARS-CoV-2

D2 : CN1566335

D3 : CN1616654

1. Nouveauté

Aucun des documents de l'art antérieur cité ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques de la revendication 1. Par conséquent, l'objet de ladite revendication est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive

Le document D1 est considéré comme l'art antérieur le plus proche de l'objet de la revendication 1 de la présente invention. Il divulgue un vaccin inactivé purifié contre le virus SARS-CoV-2 PiCoVacc et qui été obtenu par passage de la souche CN2 dans des cellules Vero, inactivation par de β -propiolactone et filtration avec deux étapes de chromatographie. Ce vaccin a induit des anticorps neutralisants spécifiques du SARS-CoV-2 chez les souris, les rats et les primates non humains.

L'objet de la revendication 1 diffère du document D1 en ce qu'il divulgue un procédé d'obtention d'un vaccin inactivé contre le COVID-19 à l'aide de la souche épidémique SARS-CoV-2/KZ-Almaty/04.2020 en suivant les étapes décrites.

Aucun effet technique supplémentaire lié à la différence déjà cité n'est divulgué dans la présente invention.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre est considérée comme la fourniture d'une méthode alternative pour la fourniture d'un vaccin contre le SARSCoV 2.

La solution proposée n'est pas inventive pour les raisons suivantes :

Le procédé revendiqué ne présente aucun effet supplémentaire ou surprenant en comparaison avec les autres procédés connus pour l'inactivation des virus du SARS pour l'utilisation en tant que vaccin, aussi les étapes du procédé à savoir d'inactivation de filtration et d'ajout d'adjuvant

sont évidentes et bien connues pour l'homme de métier confronté au problème technique ci-dessus, de plus il est considéré que ce dernier utiliserait une souche épidémiologique telle que celle revendiqué dans une méthode d'obtention d'un vaccin inactivé , en fonction de ses besoins et sans faire preuve d'esprit inventif.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 n'est pas inventif au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Application industrielle

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.