



Нечаева Елена Августовна

канд. мед. наук, заведующая отделом

клеточных технологий

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

рп Кольцово, Новосибирская область

Сенькина Татьяна Юрьевна

заведующая лабораторией

разработки и контроли МИБП

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

рп Кольцово, Новосибирская область

Радаева Ирина Федоровна

заведующая лабораторией коллекция культур клеток

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

рп Кольцово, Новосибирская область

Богрянцева Марина Поликарповна

канд. биол. наук, заведующая отделом

биологического и технологического контроля

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

рп Кольцово, Новосибирская область

Нечаев Юрий Сергеевич

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

отдела биологического и технологического контроля

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

рп Кольцово, Новосибирская область

Думченко Наталья Борисовна

младший научный сотрудник

лаборатории разработки и контроли МИБП

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

рп Кольцово, Новосибирская область

Руденко Лариса Георгиевна

д-р мед. наук, заведующая отделом вирусологии

ФГБУН «Институт экспериментальной

и клинической медицины»

г. Новосибирск, Новосибирская область

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЖИВОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ТРИВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СЕЗОННОГО ГРИППА

Аннотация: авторами разработана технология производства живой тривалентной культуральной вакцины против сезонного гриппа. В качестве клеточного субстрата использована культура клеток MDCK, аттестованная в соответствии с требованиями ВОЗ. Наработаны 3 серии вакцины для доклинических исследований. Вакцина обладала специфической активностью, равной (7,93–8,0) lg ЭИД₅₀/0,2 мл, была стерильна, не содержала микоплазм и посторонних вирусов. Содержание остаточной клеточной ДНК в дозе вакцины составляло менее 10 нг. Изучение стабильности свойств вакцины в течение 6 месяцев хранения при температуре (4–8)°С подтвердило сохранение специфической активности на исходном уровне.

Ключевые слова: вирус гриппа, вакцина, культура клеток, технология производства.

Перспективность борьбы с гриппом с помощью вакцинации признается специалистами всего мира, что отражено в решениях Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), рекомендациях Комитета США по практике иммунизации и официальных документах Минздрава России. В последние годы значительно возрос интерес к живой гриппозной вакцине. Живые гриппозные вакцины (ЖГВ) включены в глобальный план ВОЗ по подготовке к пандемии, поскольку именно они стимулируют все звенья противогриппозного иммунитета [4; 15]. Другие преимущества живых вакцин – интраназальный путь введения, возможность

быстрой наработки больших объемов вирусного материала, быстрота проведения массовой вакцинации из-за простоты ее применения, а также возможность защищать от дрейфовых вариантов вируса гриппа.

Сегодня в России зарегистрированы, производятся и применяются на практике живые и инактивированные гриппозные вакцины, и для производства вакцин используются куриные эмбрионы; такой препарат не рекомендован для лиц с чувствительностью к яичному белку. В последние годы активно обсуждается вопрос о переводе производства гриппозных вакцин на перевиваемые клеточные линии, что сделает производство независимым от поставок куриных эмбрионов и позволит в короткие сроки нарабатывать большие объемы вирусной биомассы. К настоящему времени существует несколько перевиваемых клеточных линий, аттестованных для их использования в качестве субстрата для производства вакцин, в том числе и гриппозных. Преимуществом клеточной линии MDCK является ее высокая чувствительность к вирусам гриппа, способность поддерживать их репликацию на высоком уровне в присутствии бессывороточных сред и др. Значительным преимуществом перевода производства гриппозных вакцин на культуру клеток является возможность быстрой наработки субстрата, что особенно важно при наступлении пандемической ситуации, когда в кратчайшие сроки необходимо подготовить значительные объемы вакцинного препарата.

Цель исследований – разработка технологии производства живой культуральной тривалентной вакцины против сезонного гриппа на основе холдоадаптированных штаммов A/17/Боливия/2013/6585 (A/H1N1), A/17/Швейцария/2013/1 (H3N2) и B/60/Пхукет/2013/26, получение экспериментальных серий вакцины и их аттестация в соответствии с требованиями, предъявляемыми к медицинским иммунобиологическим препаратам.

Материалы и методы

Вакциновые штаммы A/17/Боливия/2013/6585 (A/H1N1), A/17/Швейцария/2013/1 (H3N2) и B/60/Пхукет/2013/26 получены в Институте экспериментальной медицины (С.-Петербург, Россия) реассортацией холдоадаптирован-

ных доноров аттенуации A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) и B/СССР/60/69 с эпидемически актуальными штаммами. В качестве «диких» родительских штаммов использованы эпидемически актуальные штаммы вируса гриппа типа A/H1N1, A/H3N2 и B, рекомендованные ВОЗ для подготовки вакцин против гриппа. Соответствие состава генома реассортантов вакцинной формуле генома 6:2 и стабильность аттенуирующих мутаций определены с помощью метода секвенирования. Формула генома вакциновых штаммов соответствует требованиям, предъявляемым к штаммам живой гриппозной вакцины: гены, кодирующие поверхностные негликозилированные белки гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA), принадлежат эпидемически актуальным штаммам, а гены, кодирующие внутренние белки (PB2, PB1, PA, NP, M, NS), принадлежат донорам аттенуации [4].

Для разработки технологии производства вакцины использовали производственные штаммы вируса гриппа, полученные после одного пассажа вакциновых штаммов в культуре клеток MDCK. Производственные штаммы были охарактеризованы по подлинности, специфической и гемагглютинирующей активности, стерильности и отсутствию токсичности. Специфическую активность производственного штамма вируса гриппа определяли в соответствии с методикой [7], рассчитывали по методу Рида и Менча [13] и выражали в Ig ЭИД₅₀/0,2 мл.

В качестве клеточного субстрата применяли перевиваемую линию клеток почки нормальной взрослой самки кокер-спаниеля MDCK из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» [9].

Для культивирования клеток использовали питательную среду Игла МЕМ (ГУП «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН, Россия) и сыворотку крови плодов коровы (Invitrogen, США); для наработки вируса использовали бессывороточную питательную среду для культивирования клеток MDCK и Vero (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия); трипсин (Sigma, США); микроноситель из модифицированного полистерена (Solohill, США); стабилизатор (MP Biomedicals, США, Panreac, Испания) [8].

Культивирование клеток проводили в биореакторах с объемом культурального сосуда 2 л («Мультиген», США) и 10 л («Биостат», Германия). Клетки выращивали в биореакторах в питательной среде Игла МЕМ с добавлением 5% сыворотки крови плодов коровы и микроносителя в концентрации (10–14) г/л, наработку вируса – в бессывороточной среде в присутствии трипсина в концентрации (2–4) мкг/мл [8]. Ежедневно оценивали морфологию клеток, выход клеточного материала [1], отбирали пробы вируссодержащего материала для определения специфической активности вируса гриппа. Специфическую активность вируссодержащих сборов определяли титрованием на куриных эмбрионах [7] и выражали в lg ЭИД₅₀/0,2 мл. Через 3–5 сут. вируссодержащие сборы, полученные из биореакторов, освобождали от клеточного детрита, добавляли стабилизатор, разливали в ампулы по 0,2 мл и подвергали лиофилизации (установка лиофильного высушивания ТГ 16–50, Германия) в стандартном режиме в течение 48 час. После высушивания ампулы заполняли аргоном и запаивали.

Полученные серии готовой формы вакцины контролировали на подлинность, специфическую и гемагглютинирующую активность [7], стерильность, отсутствие аномальной токсичности, физико-химические свойства, pH [3], содержание остаточной клеточной ДНК [6], содержание гентамицина сульфата [2], потерю в массе при высушивании [11]. Для определения подлинности использовали гомологичную типоспецифическую сыворотку гриппозную для РТГА по ТУ 938941–00–44429427–2008 и диагностикум гриппозный для РТГА (ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов, С.-Петербург, Россия).

Результаты и обсуждение

Вакциные штаммы депонированы в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Согласно паспорта, специфическая активность лиофилизованных вакциных штаммов А/17/Боливия/2013/6585 (A/H1N1), А/17/Швейцария/2013/1 (H3N2) и В/60/Пхукет/2013/26 составляла 8,0 – 8,2 lg ЭИД₅₀/0,2 мл, гемагглютинирующая активность – 1:32–1:512 с 1%-ными куриными эритроцитами, гемагглютинин и нейраминидаза были идентичны эпидемически актуальным

штаммам. Безвредность реассортантов доказана при подкожном и внутрибрюшинном введении мышам и морским свинкам, а также по результатам клинических испытаний.

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» на основе вакциновых штаммов получены производственные штаммы вируса гриппа путем одного пассажа вакциновых штаммов в культуре клеток MDCK. При контроле производственных штаммов установлено, что они взаимодействуют с гомологичными сыворотками, обладают специфической активностью, равной $6,03\text{--}7,0 \text{ lg ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$, стерильны, не содержат посторонних вирусов, микоплазм и микобактерий туберкулеза, не токсичны для мышей.

Живую культуральную тривалентную гриппозную вакцину получали на основе культуры клеток MDCK. Ранее во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» были созданы и заложены на хранение при температуре жидкого азота посевные и рабочие банки клеток MDCK. Банки аттестованы в соответствии с национальными и международными требованиями ВОЗ, получено решение Комитета иммунобиологических препаратов МЗ РФ на использование их в производстве иммунобиологических препаратов [9].

Клетки MDCK культивировали в биореакторах при температуре $(37\pm0,5)^\circ\text{C}$. В течение 12 ч клетки оседали, распластивались и прикреплялись на поверхности микроносителей, через 2–3 суток образовывали монослои на каждой отдельной частице. Через 2–3 суток количество клеток увеличивалось в 2–3 раза. Используемый метод культивирования в биореакторе на микроносителях сочетает в себе элементы монослоиного и сусpenзионного выращивания клеток, при этом создаются равномерные условия культивирования по всему объему сосуда с высокой плотностью клеточной популяции.

Через 2–3 суток из сосудов биореакторов удаляли питательную среду, клетки отмывали бессывороточной питательной средой, вносили через систему инокуляции вируссодержащий материал из расчета $0,1\text{--}0,0001 \text{ ЭИД}_{50}$ вируса на клетку. Затем в культуральный сосуд биореактора закачивали бессывороточную

питательную среду и трипсин в концентрации (2–4) мкг/мл, включали постоянное перемешивание и продолжали культивирование зараженных клеток в течение 3–5 суток, поддерживая скорость вращения мешалки (70 ± 2 об/мин), рН среды (7,0–7,4) и температуру (33 ± 1) °С. На 3–5 сутки было получено максимальное количество вируса, специфическая активность вируссодержащих сборов составляла $7,8\text{--}9,5 \text{lg ЭИД}_{50}/0,2$ мл, гемагглютинирующая активность – 1:64–1:128. Вируссодержащие сборы собирали в стерильную емкость, в культуральный сосуд вносили порцию свежей питательной среды, равной объему слитой вируссодержащей жидкости. На 3–5 сутки собирали второй вируссодержащий сбор.

Для получения лиофилизированной формы вакцины вируссодержащие сборы, полученные из биореакторов, объединяли в стерильную емкость, подвергали фильтрации через нитроцеллюлозные фильтры, вносили стабилизатор [10], разливали в ампулы по 0,2 мл и подвергали лиофилизации в стандартном режиме в течение 48 час. После высушивания материала ампулы заполняли аргоном и запаивали. На ампулы наклеивали этикетки с названием и дозой вакцины, ампулы укладывали в пачки картонные, далее передавали на режимное хранение.

Ранее было показано, что вирусы гриппа, исходно выделенные в РКЭ, не требуют дополнительной адаптации к культуре клеток MDCK, как и реассортантные вакцинныe штаммы, подготовленные на основе отечественных доноров аттенуации – А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69. Это является преимуществом как культуры клеток MDCK в качестве субстрата для культивирования, так и самих вакцинных штаммов [12]. В нашей работе также было установлено, что вирус быстро адаптировался к новому клеточному субстрату и достигал максимальных титров через 1–2 пассажа.

На основании проведенных исследований были разработаны проект Фармакопейной статьи предприятия и Лабораторный регламент получения лекарственного средства «Вакцина гриппозная тривалентная культуральная живая, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения» ЛР №05664012–029–14, которые использовались в дальнейшем для наработки

экспериментальных серий вакцины. На технологию производства вакцины подготовлена заявка на патентование.

По разработанной технологии были получены 3 экспериментальные серии вакцины, которые прошли контроль в производственной лаборатории и ОБТК ГНЦ ВБ «Вектор» на соответствие требованиям нормативной документации. Характеристика экспериментальных серий вакцины представлена в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика экспериментальных серий живой культуральной тривалентной вакцины против сезонного гриппа

Параметр контроля вакцины	Номер серии вакцины		
	1	2	3
Количество ампул в серии	1005	1002	1001
Специфическая активность, Ig ЭИД ₅₀ /0,2 мл	8,0	7,93	7,97
Подлинность	взаимодействует с гомологичной типоспецифической сывороткой	Взаимодействует с гомологичной типоспецифической сывороткой	Взаимодействует с гомологичной типоспецифической сывороткой
Стерильность	стерильна	стерильна	стерильна
Отсутствие посторонних вирусов, микоплазм	соответствует	соответствует	соответствует
Потеря в массе при высушивании, %	0,8	0,8	0,8
Время растворения, мин	0,5	0,5	0,6
Содержание остаточной клеточной ДНК, нг/доза	<10	<10	<10
Аномальная токсичность для лабораторных животных	не токсична	не токсична	не токсична
Содержание гентамицина сульфата	не обнаружен	не обнаружен	не обнаружен
pH восстановленного препарата, ед. pH	6,9	6,9	6,9

Вакцина имела вид аморфной массы светло-коричневатого цвета, растворялась в течение 30 сек при внесении в ампулу 0,5 мл (1 доза) дистиллированной воды при встряхивании. При растворении вакцина имела вид прозрачной жидкости светло-коричневого цвета без осадка и посторонних включений, показатель pH составлял 6,9. Потеря в массе при высушивании вакцины составляла 0,8%. При определении подлинности было показано, что вакцина взаимодействовала с гомологичными типоспецифическими сыворотками и не взаимодействовала с гетерологичными сыворотками других типов и подтипов вируса гриппа. Образцы живой культуральной гриппозной вакцины были стерильны, не содержали микоплазм и посторонних вирусов. Специфическая активность вируса гриппа в вакцине составляла (7,93 – 8,0) lg ЭИД₅₀/0,2 мл. В тесте «ускоренного старения» при сравнении титра вируса в исходных образцах вакцины и в образцах, прогретых в течение 7 суток при температуре (35–37) °C, падение активности составляло менее 1 lg ЭИД₅₀/0,2 мл, что подтверждает термостабильность вакцины [5]. Содержание остаточной клеточной ДНК составляло менее 10 нг в дозе вакцины, что соответствует требованиям ВОЗ, предъявляемым к препаратам, в производстве которых в качестве клеточного субстрата используются перевиваемые клетки животных [14]. Изучение стабильности свойств вакцины в течение 6 месяцев хранения (срок наблюдения) при температуре (4–8) °C подтвердило сохранение специфической активности и других показателей на уровне исходных.

Использование в технологии производства вакцины культуры аттестованных клеток обладает неоспоримым преимуществом в первую очередь благодаря способности сохранять при пассировании стабильные генетические и биологические характеристики. Замена в производстве гриппозной вакцины куриных эмбрионов на культуру клеток позволяет избежать аллергических реакций при иммунизации лиц, страдающих аллергией к белкам куриных яиц. Использование для наработки вируса гриппа в биореакторах бессывороточных питательных сред, не содержащих продукты животного происхождения, также позволяет снизить возможные аллергические реакции на вакцину и исключить контаминацию

посторонними вирусами, микоплазмами и прионами, которые могут присутствовать в сыворотке крови плодов крупного рогатого скота. Использование аттестованных клеток из посевного и рабочего банков, заложенных на хранение при температуре жидкого азота в коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор», позволит в течение нескольких десятков лет обеспечить производство вакцины стандартным клеточным материалом.

Выходы

В результате проведенных исследований впервые в России разработана технология производства живой культуральной тривалентной вакцины против сезонного гриппа. Получены 3 экспериментальные серии вакцины, которые во всем изученным показателям соответствовали требованиям нормативной документации. Технология является универсальной и может быть использована для получения живой культуральной вакцины на основе различных штаммов вируса гриппа.

Список литературы

1. Аттестация перевиваемых клеточных культур: Методические рекомендации. – М.: ФГБУ «ГИСК им. Л.А.Тарасевича» Минздравсоцразвития России, 2011. – 65 с.
2. Государственная Фармакопея СССР. – XI издание. – Вып. 2. – М., 1990.
3. Государственная Фармакопея Российской Федерации. – XII издание. – Ч. 1. – М., 2007. – 697 с.
4. Гриппозные вакцины: документ по позиции ВОЗ. – 2012. – №47. – Р. 461–476 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/wer>
5. Методические рекомендации: определение стабильности отраслевых стандартных образцов (ОСО) и других МИБП ускоренным методом. – М.: «ГИСК им. Л.А. Тарасевича», 2003. – 8 с.
6. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методические указания 4.1/4.2.588–96. – М.: Минздрав России, 1998. – 128 с.

7. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. МУК 3.3.2.1758–03.
8. Нечаева Е.А. Способ получения живой культуральной вакцины против вируса гриппа / Е.А. Нечаева [и др.] // Патент РФ №2420314, A61K 39/145, C12N7/02, A61P31/14, 2011.
9. Радаева И.Ф. Создание и аттестация банков перевиваемых клеток MDCK для производства гриппозной вакцины / И.Ф. Радиева [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2005. – №2. – С. 43–46.
10. Сандахчиев Л.С. Способ получения микрокапсулированной формы живой вирусной вакцины / Л.С. Сандахчиев [и др.] // Международная заявка PCT/Ru2002/000465.
11. ФС 42–3874–99. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов.
12. Alexandrova G.I., Kiseleva I.V., Naumenko Z.S. Madin-Darby canine kidney cell line is a suitable substrate for manufacturing live influenza vaccine. XIth International Congress of Virology. 9–13 August 1999. – Sydney, Australia. – VP37.23. – P. 215.
13. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent end-points // Amer. J. Hyg. – 1938. – Vol. 27. – P. 493–497.
14. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biological. WHO TRS №927. – Geneva, 2005.
15. World Health Organization. Initiative for Vaccine Research (IVR). Options for Live Attenuated Influenza Vaccines In the Control of Epidemic and Pandemic Influenza 12–13 June 2007 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/meeting_120707/en/index.html