

На правах рукописи

ПИНЯЕВА

Анастасия Николаевна

**РАЗРАБОТКА ПРОЦЕССОВ ОЧИСТКИ
ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОЛИОМИЕЛИТА
НА ОСНОВЕ ШТАММОВ СЭБИНА**

1.5.10. – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2023

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Научный руководитель:

Ишмухаметов Айдар Айратович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН.

Официальные оппоненты:

Юминова Надежда Васильевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний отдела вирусологии им. О.Г. Анджaparидзе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Красильников Игорь Викторович – доктор биологических наук, профессор, генеральный директор Акционерного общества «Развитие Биотехнологий».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» _____ 2023 года в __ час. на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) и на сайте <https://chumakovs.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Белякова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Благодаря массовой вакцинации полиомиелит ликвидирован почти во всех странах мира. Применяются два типа вакцин: 1) пероральная (живая) полиомиелитная вакцина (ППВ), приготовленная из аттенуированных штаммов Сэбина (штамм Сэбина типа 1 LSc 2ab, штамм Сэбина типа 2 P712 Ch 2ab, штамм Сэбина типа 3 Leon 12a,b) и 2) инактивированная вакцина (ИПВ), приготовленная из диких штаммов (тип 1 — Mahoney, тип 2 — MEF-1, тип 3 — Saukett).

В 2008 году в Национальном календаре профилактических прививок России была изменена схема иммунизации против полиомиелита:

1-ая и 2-ая аппликации - в возрасте 3 и 4,5 месяцев – с помощью инактивированной вакцины;

3-я – 6-ая – в возрасте 6, 18, 20 месяцев и 14 лет - с помощью пероральной вакцины.

В 2022 году в Национальный календарь профилактических прививок России вновь были внесены изменения: сроки проведения первых 4 аппликаций остаются без изменений и проводятся инактивированной вакциной, а 5-ая и 6-ая ревакцинации – пероральной вакциной, причем срок проведения 6-ой ревакцинации смещен с 14 лет на 6 лет. Таким образом, потребности страны в ИПВ возросли вдвое.

В настоящее время в качестве важных потенциальных источников распространения диких штаммов полиовирусов в регионах, свободных от их циркуляции, выступают производства ИПВ. Использование альтернативных штаммов в производстве ИПВ, например, вакцинных штаммов Сэбина, позволит снизить такую опасность в эпоху ликвидации полиомиелита. Глобальная инициатива по ликвидации полиомиелита (ГИЛП) также поощряет разработку и производство инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина (сИПВ).

Разработка технологии производства сИПВ велась независимо несколькими группами с 1980-х г. в США, Европе, Китае и Японии. Первые клинические исследования, целью которых являлось определение иммуногенности и безопасности сИПВ, начались в 1985 году. Однако промышленное производство сИПВ налажено только в Японии и Китае. В Японии с ноября 2012 года в программу рутинной иммунизации включена первая в мире лицензированная сИПВ. сИПВ успешно применяется на протяжении уже 10 лет в Японии и с 2018 года в Китае. Таким образом, для эпидемиологического благополучия населения РФ необходима разработка технологии производства отечественной сИПВ.

Степень разработанности темы

За прошедшие десятилетия исследователями из Института трансляционной вакцинологии Intravacc (Нидерланды), Национального института инфекционных болезней Японии, Института медицинской биологии Китайской академии медицинских наук IMBCAMS и др. проводились работы по разработке технологии производства сИПВ. Несмотря на это, мало проработанными остаются процессы очистки полуфабрикатов сИПВ. Нет доступных данных об условиях проведения хроматографических очисток: скорость элюирования, объем загрузки (нагрузка на сорбент), применяемые хроматографические колонны, а также не приводятся такие данные как степень извлечения целевого антигена и степень очистки от примесей. Разработка высокоэффективных технологичных процессов очистки полуфабрикатов сИПВ по-прежнему актуальная тема исследований.

Цель исследований: разработка высокоэффективных технологичных процессов очистки полуфабрикатов инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина и получение доказательств безопасности и иммуногенности препарата, производимого по новой технологии.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Провести анализ технологических подходов, используемых при производстве инактивированных противовирусных вакцин, а также аналитических методик оценки качества полученного вакцинного препарата для оптимизации производства отечественной инактивированной вакцины против полиомиелита.
2. Разработать критерии оценки эффективности проведения стадий очистки концентратов полиовируса и определить контролируемые показатели на стадиях хроматографических очисток вирусных концентратов при промышленном производстве вакцины.
3. Осуществить подбор условий очистки концентратов полиовируса штаммов Сэбина трех серотипов методом гель-фильтрации на сорбентах с разным диапазоном фракционирования.
4. Определить особенности очистки концентратов полиовируса штаммов Сэбина трех серотипов при проведении ионообменной хроматографии на слабых и сильных анионообменных сорбентах в градиентном и изократическом режимах.
5. Для проведения клинических исследований приготовить полупромышленные опытные образцы инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина с применением биореакторных технологий.
6. Оценить переносимость, реактогенность и безопасность вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина в сравнении с плацебо на первой фазе клинических исследований.
7. Изучить переносимость, безопасность и иммуногенность вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина в сравнении с коммерческой вакциной Имовакс Полио по результатам второй фазы клинических исследований.

Научная новизна

В результате экспериментальных исследований разработаны научно обоснованные биотехнологические приемы очистки концентратов полиовирусов штаммов Сэбина трех типов, которые стали применяться в технологии производства отечественной инактивированной вакцины для профилактики полиомиелита.

Установлена степень влияния изоэлектрической точки вакцинных штаммов Сэбина на эффективность извлечения вирусного антигена при проведении ионообменной хроматографии на сорбентах с разной ионной емкостью, что послужило основой для разработки эффективной технологии очистки целевого компонента инактивированной вакцины против полиомиелита на основе трех штаммов Сэбина.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Разработана технология получения высокоочищенных концентратов полиовируса для производства инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина с применением биореакторной технологии. Производство полного цикла данной вакцины позволит обеспечить страну отечественным препаратом, что положительно скажется на эпидемиологическом благополучии населения РФ.
2. Определены контролируемые показатели на стадиях хроматографических очисток вирусных концентратов при промышленном производстве вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина, включающие контроль на бактериальные эндотоксины, остаточную клеточную ДНК, бычий сывороточный альбумин, общий белок и содержание D-антигена.
3. Используемые биотехнологические приемы, такие как снятие профиля элюции на сорбентах с разной матрицей и с разным диапазоном фракционирования для эксклюзионной хроматографии и проведение ионообменной хроматографии в градиентном режиме для определения оптимальных режимов хроматографической очистки, могут применяться при изучении процессов очисток различных вирусных суспензий, а разработанные критерии оценки эффективности проведения хроматографических очисток вирусных концентратов позволят проанализировать полученные результаты.

4. Результаты клинических исследований с участием добровольцев в возрасте 18-60 лет подтверждают хорошую переносимость, высокий профиль безопасности и выраженные иммуногенные свойства вакцины ПолиовакСин в сравнении с Имовакс Полио. Полученные данные позволили продолжить регистрационные мероприятия, направленные на внедрение в клиническую практику отечественной вакцины и дальнейшее ее использование в рамках Национального календаря профилактических прививок.

Методология и методы исследования

В исследованиях, проведенных в рамках настоящей диссертационной работы, применяли комплекс современных лабораторных методов (включая вирусологические, иммунологические и молекулярно-генетические).

Клинические исследования проводили в соответствии с нормативно-регламентирующими документами.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработаны подходы для подбора условий проведения гель-фильтрации и ионообменной хроматографии вирусных суспензий, а также определены критерии оценки эффективности проводимых процессов.

2. Показано влияние изоэлектрической точки вакцинных штаммов полиовируса и рН элюирующего буферного раствора на степень извлечения целевого антигена при проведении ионообменной хроматографии. Установлено, что степень извлечения целевого антигена выше при рН элюирующего буферного раствора близком к изоэлектрической точке штамма полиовируса.

3. Доказано, что разработанная технология позволяет получать серии инактивированной вакцины против полиомиелита ПолиовакСин, полностью соответствующие требованиям, предъявляемым к медицинским иммунобиологическим препаратам.

4. Введение вакцины ПолиовакСин добровольцам I и II фаз клинических исследований показало ее хорошую переносимость, низкую реактогенность и высокий профиль безопасности. Аллергизирующие свойства у вакцины ПолиовакСин не были выявлены.

5. Установлено, что антитела, индуцируемые вакциной ПолиовакСин, могут нейтрализовать не только вакцинные штаммы полиовируса типа 1 (штамм Сэбина LSc 2ab), типа 2 (штамм Сэбина P712 Ch 2ab) и типа 3 (штамм Сэбина Leon 12a₁b), но и дикие штаммы полиовируса тип 1 (штамм Mahoney), тип 2 (штамм MEF-1) и тип 3 (штамм Saukett).

6. Показана хорошая переносимость, высокий профиль безопасности и выраженные иммуногенные свойства вакцины ПолиовакСин в сравнении с Имовакс Полио в клиническом исследовании с участием добровольцев в возрасте 18-60 лет.

Личное участие автора

Автором проведен анализ литературы, изучена степень разработанности проблемы с определением цели, задач исследования и его дизайна. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор лично провёл статистическую обработку, сформулировал основные положения и выводы диссертации. С участием автора подготовлены основные публикации по материалам исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют пунктам 2, 7, 10, 11 паспорта специальности 1.5.10. - «Вирусология».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в ходе работы данных основана на их воспроизводимости при многократном повторении экспериментов, длительном сроке наблюдений, комплексном подходе к проведению исследований, выполненных с использованием современных методов, и статистической обработкой полученных результатов. Все выводы и практические рекомендации

диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы.

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» (Москва, 2018 г.), Европейской встрече пользователей XFEL (Европейский рентгеновский лазер на свободных электронах) (Германия, Гамбург, 2019), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы эпидемиологии инфекционных и неинфекционных болезней» (Москва, 2019 г.), международной конференции Вирусология Африка (ЮАР, Кейптаун, 2019), на IV международной конференции, посвященной вакцинам, вакцинации и иммунотерапии «Перспективные технологии вакцинации и иммунотерапии» (онлайн, 2020), на всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 2021 год).

Публикации

Основные результаты диссертационного исследования полностью отражены в печати. По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы: 2 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 1 в зарубежном журнале, индексируемом в международных системах (Web of Science, Scopus, PubMed) и 1 глава в книге.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 124 страницах и состоит из введения и 6-ти глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, гель-фильтрация концентратов полиовируса, ионообменная хроматография концентратов полиовируса, разработка технологии получения и контроля качества инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина, клинические исследования вакцины ПолиовакСин, а также заключение, перспективы дальнейшей разработки темы, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, содержащий 113 источников. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 27 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ПРИНЦИПЫ ПРОИЗВОДСТВА ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОЛИОМИЕЛИТА

Основы современной технологии производства инактивированных вакцин против полиомиелита были заложены в 70-80-е года прошлого века, с тех пор общее ее описание осталось неизменным, однако были внедрены существенные изменения в технологические процессы.

Технологическую цепочку можно описать следующим образом (Рисунок 1):

- 1) Нарботка вирусной суспензии в культуре-продуценте. В этот этап можно включить и наработку самой культуры клеток, заражение культуры и культивирование вируса.
- 2) Первичная фильтрация продукта от крупных остатков клеток, стерилизующая фильтрация.
- 3) Концентрирование вирусной суспензии с помощью ультрафильтрации.
- 4) Хроматографическая очистка, которая, как правило, состоит из двух этапов: гель-фильтрация (ГФ) и ионообменная хроматография (ИОХ).
- 5) Инактивация вируса раствором формалина.
- 6) Формуляция вакцины. Сведение 3-х типов вируса.

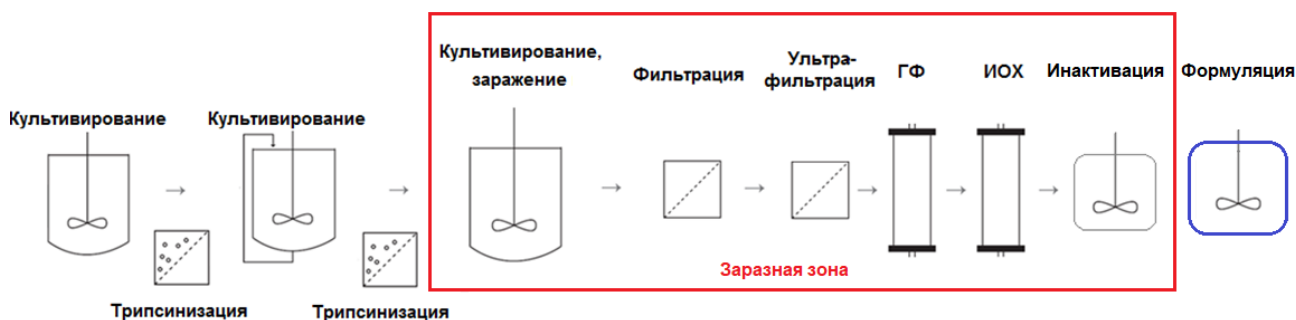


Рисунок 1 – Основные этапы производства инактивированной вакцины против полиомиелита

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Клетки и вирусы

В качестве клеточной системы использовали культуру клеток линии Vero. Партии культуры-производителя готовили из клеточного пула аттестованного рабочего банка клеток Vero (РБКVero ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Института полиомиелита)). Культуры использовали до 150 уровня пассажа. Клетки выращивали на среде Игла MEM (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Института полиомиелита)) с добавлением 5%-ной сыворотки крови эмбрионов коров («Биолот», Россия).

Для реакции нейтрализации использовали культуру клеток Hep-2 (Cincinnati), полученную из NIBSC (Великобритания, Саут-Мимс). Клетки выращивали на среде Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Института полиомиелита)), с добавлением 5%-ной сыворотки крови эмбрионов коров («Биолот», Россия), стрептомицина (0,1 мг/мл) и пенициллина (100 ед/мл) (PanEco, Россия).

Аттенуированные штаммы полиовируса типа 1 (штамм Сэбина LSc 2ab), типа 2 (штамм Сэбина P712 Ch 2ab) и типа 3 (штамм Сэбина Leon 12a,b) были использованы для производства вакцины и для постановки реакции нейтрализации. Дикие штаммы полиовируса тип 1 (штамм Mahoney), тип 2 (штамм MEF-1) и тип 3 (штамм Saukett) также использовали для реакции нейтрализации. Все штаммы были получены от ВОЗ или NIBSC для производства пероральной вакцины против полиомиелита или лабораторного тестирования.

2.2 Технология производства инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина

Производство инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина включает несколько этапов: 1) наработка партий культуры-производителя из пула аттестованного рабочего банка клеток, 2) наработка вирусных суспензий каждого из трех серотипов полиовируса на культуре-производителе, 3) фильтрация и концентрирование полученных вирусных суспензий, 4) хроматографические очистки вирусных концентратов (ГФ и ИОХ), 5) инактивация формалином, 6) сведение и розлив трехвалентного препарата, 7) контроль качества, включая контроль на специфическую активность и безопасность.

2.2.1 Нарработка партий культуры-производителя из пула аттестованного рабочего банка клеток Vero

Для получения серий вакцинного препарата клеточную биомассу при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ нарабатывали в роллерных бутылках объемом 1 л, а также в биореакторах BIOFLO 510 (New Brunswick Scientific) с рабочим объемом 32 литра, XDR-50 Xcellerex (Cytiva) с рабочим объемом 50 литров, BIOSTAT STR 200 (Sartorius) с рабочим объемом 200 литров на микроносителях Cytodex 1 и Cytodex 3 (Cytiva). Пассирование клеток проводили по общепринятым методикам: для отделения клеток от подложки использовали смесь (1:1) 0,25%-го раствора трипсина и 0,02%-го раствора Версена. Снятие клеток с частиц микроносителя производили непосредственно в культуральном сосуде биореактора. К мешку подключали сосуды с 0,02%-ым раствором Версена и 0,25%-ым раствором трипсина.

2.2.2 Раздельная наработка вирусных суспензий каждого из трех серотипов полиовируса на культуре-продуценте

Перед заражением культуру-продуцент промывали стерильным физиологическим раствором, буфером Хенкса или фосфатным буферным раствором. Заражение проводили при температуре $34 \pm 1^\circ\text{C}$. Для заражения вносили вирус полиомиелита, разведенный в среде 199 из расчета 0,01-0,1 ТЦД₅₀/кл.

После дегенерации клеток, но не позже, чем через 4 дня после заражения вирусом, вирусосодержащую жидкость направляли на осветляющую и стерилизующую фильтрацию.

2.2.3 Фильтрация и концентрирование вирусных суспензий

Осветляющую и стерилизующую фильтрацию вирусосодержащих жидкостей проводили через каскад фильтров с размерами пор 0,45 и 0,22 мкм (Pall Corporation), в случае применения культивирования на микроносителях дополнительно проводили предварительную очистку от частиц микроносителя с помощью фильтра из нержавеющей стали (размер пор 70 мкм). Затем вирусосодержащие жидкости концентрировали при помощи модульной настольной тангенциальной ультрафильтрационной системы (Sartoflow Advanced, Sartorius) через мембраны из полиэфирсульфона с границами отсечения 50 кДа или 100 кДа (Sartorius). В случае малого объема вирусосодержащей жидкости финальное концентрирование проводили на кассетах тангенциальной фильтрации (Vivaflow 200, Sartorius) с мембранами из полиэфирсульфона с границами отсечения 100 кДа (Sartorius).

2.2.4 Хроматографические очистки вирусных концентратов

Гель-фильтрация

Для проведения ГФ использовали хроматографические системы АКТА purifier и АКТА pure 150M (Cytiva), оснащенные УФ-детектором. Хроматографические колонки HiScale 26/40 (Cytiva) и ХК 50/100 (Cytiva) упаковывали сорбентами для эксклюзионной хроматографии. Нагрузка составляла 5,0-7,5% от объема колонки. Оптическую плотность фракций определяли при двух длинах волн – 260 и 280 нм. В качестве элюента использовали фосфатный буферный раствор. Скорость потока и условия регенерации были выбраны согласно рекомендациям производителя сорбента.

Ионообменная хроматография

Для проведения ИОХ использовали хроматографические системы АКТА purifier и АКТА pure 150M (Cytiva), оснащенные УФ-детектором. Применяли предупакованные колонки для ИОХ, также применяли хроматографические колонки HiScale 26/40 (Cytiva) и ХК 50/60 (Cytiva), которые были самостоятельно упакованы сорбентами для ИОХ. Оптическую плотность фракции определяли при двух длинах волн – 260 и 280 нм. В качестве элюента применяли фосфатный буферный раствор. Скорость потока и условия регенерации были выбраны согласно рекомендациям производителя сорбентов.

2.2.5 Инактивация очищенных вирусных концентратов

Очищенные вирусные концентраты инактивировали раствором формалина (конечное содержание формальдегида 0,025% масс/об). Пул вирусосодержащих фракций после ИОХ разводили средой 199 без красителя, добавляли 37%-ный раствор формалина до вышеуказанной конечной концентрации, перемешивали, фильтровали через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм (для стерилизации и удаления вирусных агрегатов). Инактивацию проводили при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 13 сут. Нейтрализацию формальдегида проводили бисульфитом натрия (NaHSO_3).

2.2.6 Сведение и розлив трехвалентной инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина

Сведение включает в себя объединение очищенных инактивированных моновалентных концентратов типов 1, 2 и 3 в количествах, необходимых для обеспечения в одной дозе препарата содержания D-антигена:

- 1 типа - не менее 15 единиц;
- 2 типа - не менее 15 единиц;
- 3 типа - не менее 50 единиц.

Для получения указанных значений D-антигена для каждого серотипа вируса полиомиелита в одной дозе (0,5 мл) готовой вакцины объединенный сбор очищенных инактивированных моновалентных концентратов типов 1, 2 и 3 разбавляли средой 199 (10-кратный концентрат) и буферным раствором. Объединенный сбор фильтровали через стерелизующий фильтр с размером пор 0,22 мкм и разливали в ампулы из стекла 1 гидролитического класса по ISO 9187 объемом 1 мл по 0,6 мл.

2.3 Контроль качества полупродуктов на различных этапах производства инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина

Для оценки степени извлечения целевого антигена определяли концентрацию D-антигена. Для оценки степени очистки полученного вирусного материала определяли содержание остаточной клеточной ДНК и содержание общего белка. Для оценки выхода вирусных частиц в ходе хроматографического разделения также определяли содержание вирусной РНК, титр вируса и содержание вирусного структурного белка VP2.

2.3.1 Определение концентрации D-антигена

Концентрацию D-антигена полиовируса определяли с помощью метода твердофазного ИФА в «сэндвич» варианте, разработанного во ФГАНУ «ФНЦИРИП им.М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). В состав набора входили антитела IgY к полиовирусам штаммов Сэбина трех серотипов [Вопросы вирусологии. 2014; 59(6):39].

2.3.2 Определение концентрации общего белка

Концентрацию общего белка в вирусных препаратах определяли по методике Лоури без осаждения согласно [ОФС.1.2.3.0012.15. Определение белка. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том I].

2.3.3 Анализ фракций на наличие вирусной РНК

С помощью фенольной экстракции выделяли РНК. Наличие вирусной РНК анализировали окраской бромистым этидием в агарозном геле [Биотехнология. 2021; 37 (6):84].

2.3.4 Определение титра вируса

Титрование вируса проводили на культуре клеток Нер-2 (Cincinnati) по стандартной методике. Титр выражали в ТЦД₅₀/мл [ФС.3.3.1.0037.18. Вакцина полиомиелитная пероральная, моновалентная, живая аттенуированная 2 типа, раствор для приема внутрь. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том IV].

2.3.5 Определение содержания структурного белка VP2 полиовируса

Содержание структурного белка VP2 полиовируса определяли методом иммуноблоттинга при помощи специфичных поликлональных кроличьих антител [Биотехнология. 2021; 37(6):84].

2.3.6 Определение концентрации остаточной клеточной ДНК

Определение концентрации остаточной клеточной ДНК в вирусных препаратах проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Этот метод основан на измерении концентрации ДНК относительно количества копий гена актина в стандартном и исследуемом препарате. Выделение геномной ДНК проводили на колонках К-СОРБ (Синтол, Москва) согласно инструкции производителя, после чего определяли концентрацию ДНК в пробах с помощью ПЦР в реальном времени, используя реактивы TaqMan (Синтол, Москва) [Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022; 21 (5):107].

2.3.7 Определение содержания белков клеток Vero

Содержание белков клеток Vero в вирусных препаратах определяли методом иммуноблоттинга при помощи специфичных антител [Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022; 21 (5):107].

2.4 Клинические исследования вакцины ПолиовакСин

2.4.1 Дизайн исследования

I фаза клинических исследований

В I фазе клинических исследований препарата ПолиовакСин (Вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая из аттенуированных штаммов Сэбина) проводилась с участием добровольцев в возрасте 18-60 лет. Изучение препарата было выполнено в Федеральном государственном учреждении здравоохранения «Медико-санитарная часть № 163 Федерального медико-биологического агентства» (ФГУЗ МСЧ № 163 ФМБА России) (Новосибирск, Россия). Целью двойного слепого плацебо-контролируемого рандомизированного одноцентрового клинического исследования была оценка переносимости, реактогенности и безопасности вакцины против полиомиелита ПолиовакСин (IPV-04-09.17) по сравнению с препаратом Плацебо (физиологический раствор).

Все добровольцы, прошедшие скрининг и включенные в исследование, были рандомизированы методом конвертов на 2 группы:

Группа 1 – 30 добровольцев, которые были привиты вакциной ПолиовакСин однократно в дозе 0,5 мл;

Группа 2 – 30 добровольцев, которые были привиты Плацебо однократно в дозе 0,5 мл.

II фаза клинических исследований

Целью II фазы клинических исследований было изучение переносимости, безопасности и иммуногенности вакцины ПолиовакСин в сравнении с вакциной Имовакс Полио (инактивированная вакцина для профилактики полиомиелита, приготовленная из диких штаммов полиовируса) на добровольцах в возрасте 18-60 лет. Двойное слепое сравнительное рандомизированное исследование переносимости, безопасности и иммуногенности вакцины ПолиовакСин проводилось в двух клинических центрах: ГБУЗ № 163 ФМБА России (Новосибирск, Россия) и Пермском государственном медицинском университете имени академика Е.А. Вагнера (Пермь, Россия). Все добровольцы, прошедшие скрининг и включенные в исследование, были рандомизированы методом конвертов на 2 группы:

Группа 1 – 100 добровольцев, которые были привиты вакциной ПолиовакСин (IPV-04-09.17) однократно в дозе 0,5 мл;

Группа 2 – 100 добровольцев, которые были привиты вакциной Имовакс Полио (эталонный препарат) (SANOFI PASTEUR, S.A., лот P3B636M) однократно в дозе 0,5 мл.

2.4.2 Этические аспекты проведения исследования

Данное клиническое исследование проводилось в соответствии с Протоколом клинического исследования, а также в соответствии с Хельсинкской декларацией (в последней редакции, принятой на 64-ой Генеральной Ассамблее Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association - WMA), Форталеза, Бразилия, октябрь 2013 г.), надлежущей клинической практикой ICH GCP и российскими нормативными документами.

Протокол исследования, форма информированного согласия и другие документы, требующие предварительного рассмотрения, были утверждены Комитетом по этике при Министерстве здравоохранения Российской Федерации (№ 162 от 23 января 2018 года и № 168 от 24 апреля 2018 года).

2.4.3 Реакция нейтрализации

У каждого добровольца производился забор крови для проведения лабораторных исследований. Образцы крови для оценки иммуногенности были взяты до и на 28-й день после вакцинации. Кроме того, на 0, 3, 14 и 28-й дни были взяты образцы крови на клинический, биохимический анализы и определение общего IgE. Кровь оставляли для образования сгустка, центрифугировали 10 мин 3 тыс об./мин и отбирали сыворотку.

Исследование сыворотки проводили согласно стандартному протоколу ВОЗ и методическим указаниям по организации и проведению серологического мониторинга — МУ 3.1.1760-03 в лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Определение титров антител к полиовирусам серотипов 1, 2 и 3 проводили в реакции нейтрализации на 96-луночных планшетах с использованием культуры клеток Hep-2 (Cincinnati), вакцинных штаммов (тип 1 - штамм Сэбина LSc 2ab, тип 2 - штамм Сэбина P712 Ch 2ab и тип 3 - штамм Сэбина Leon 12a₁b) и диких штаммов полиовирусов (тип 1 - штамм Mahoney, тип 2 - штамм MEF-1 и тип 3 - штамм Saukett) из рабочей коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

2.5 Статистический анализ

Для представления количественных данных использовалась описательная статистика с определением среднего и среднеквадратичного отклонения, а также медиан с межквартильным промежутком для переменных, не удовлетворяющих условиям нормальности распределения. Для показателей, не удовлетворяющих условиям нормальности распределения, дополнительно проводились сравнения с помощью критерия Манна-Уитни. Для анализа качественных признаков применялись точный тест Фишера и критерий Хи-квадрат. Проверка на соответствие нормальному распределению проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Критический уровень значимости был принят равным 0,05. Статистический анализ выполняли с помощью лицензионного программного обеспечения OriginPro 8 (OriginLab Corp., США).

3. ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ КОНЦЕНТРАТОВ ПОЛИОВИРУСА

3.1 Оценка эффективности проведения гель-фильтрации концентрата полиовируса типа 2 на сорбентах с разным диапазоном фракционирования

В настоящее время при производстве инактивированной полиовирусной вакцины на первой стадии хроматографических очисток используют ГФ. Очистка позволяет отделить высокомолекулярную фракцию, содержащую цельный вирус полиомиелита, от фракции основных загрязнителей – балластных белков и компонентов питательной среды. В качестве тест-модели был выбран серотип 2 полиовируса. Выбор был обусловлен тем обстоятельством, что при изготовлении СИПВ наиболее проблемным оказывается получение моновакцины именно серотипа 2. Так, чтобы получить моновакцину 2 типа из штамма Сэбина, сопоставимую по иммуногенности вакцине, приготовленной из дикого штамма вируса MEF-1, необходимо использовать в 10 раз больше исходного полуфабриката.

Для подбора оптимального диапазона фракционирования при очистке концентрата полиовируса от балластных белков были проведены хроматографические очистки концентрата полиовируса с одинаковой загрузкой на упакованных с одинаковой высотой сорбента колонках HiScale 26/40 (Cytiva) сорбентами Sepharose 6 FF (Cytiva), Sephacryl S-1000 (Cytiva), Sephacryl S-400 HR (Cytiva) и Sephacryl S-300 HR (Cytiva). Характеристика сорбентов представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика сорбентов для гель-фильтрации

№ п/п	Наименование	Матрица	Диапазон фракционирования молекул (глобулярных белков), кДа	Средний размер частиц сорбента, мкм
1	Sepharose 6 FF	Сшитые 6% агарозные гранулы	10 – 4 000	90
2	Sephacryl S-1000	Аллилдекстран и N, N'-метилен бисакриламид	500 – 1 000 000	70
3	Sephacryl S-400 HR		20 – 8 000	50
4	Sephacryl S-300 HR		10 – 1500	50

3.1.1 Условия проведения исследования

Для проведения ГФ использовали хроматограф АКТА pure 150M (Cytiva), оснащенный УФ-детектором. Хроматографические колонки HiScale 26/40 (Cytiva) были упакованы сорбентами Sepharose 6 FF (Cytiva), Sephacryl S-1000 (Cytiva), Sephacryl S-400 HR (Cytiva) и Sephacryl S-300 HR (Cytiva) с высотой столба сорбента 31±2 см. Ввод концентрата полиовируса выполняли через петлю объемом 10 мл (Cytiva). Нагрузка составляла 5% от объема колонки. В процессе хроматографической очистки собирали фракции: №1 – №9 (объем одной фракции 5 мл),

№10 – №11 (объем одной фракции 10 мл), №12 (объем фракции 50 мл). К целевому пулу фракций относили фракции со степенью извлечения D-антигена более 4% и степенью очистки не менее 95%. Оптическую плотность каждой фракции определяли при двух длинах волн – 260 и 280 нм. В качестве элюента применяли 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, pH 7,2±0,1, содержащий 0,15 М натрия хлорида. Хроматографию проводили при скорости потока 5,5 мл/мин (сорбент Sepharose 6 FF), 3 мл/мин (сорбент Sephacryl S-1000) и 1,5 мл/мин (сорбенты Sephacryl S-400 HR и Sephacryl S-300 HR). Скорость потока и условия регенерации были выбраны согласно рекомендациям производителя сорбентов.

3.1.2 Расчет степени очистки от примесей и степени извлечения целевого антигена при проведении гель-фильтрации

Для оценки эффективности проведения ГФ определяли степень очистки фракций от балластных белков (1) и степень извлечения целевого антигена (2). Соответствующие расчеты проводили по приведенным ниже формулам:

$$CO_{\text{ББ_ГФ}} = 100 - \frac{C_{\text{ОБ_ГФ}} \times V_{\text{ГФ}}}{C_{\text{ОБ_К}} \times V_{\text{К}}} \times 100, (1)$$

$$СИ_{\text{ГФ}} = \frac{C_{\text{D-АГ_ГФ}} \times V_{\text{ГФ}}}{C_{\text{D-АГ_К}} \times V_{\text{К}}} \times 100, (2)$$

- где $CO_{\text{ББ_ГФ}}$ – степень очистки от балластных белков при проведении ГФ, %;
 $C_{\text{ОБ_ГФ}}$ – концентрация общего белка в очищенном концентрате полиовируса после ГФ, мкг/мл;
 $V_{\text{ГФ}}$ – объем очищенного концентрата полиовируса после ГФ, мл;
 $C_{\text{ОБ_К}}$ – концентрация общего белка в концентрате полиовируса после ультрафильтрации, мкг/мл;
 $V_{\text{К}}$ – объем концентрата полиовируса после ультрафильтрации, мл;
 $СИ_{\text{ГФ}}$ – степень извлечения целевого антигена при проведении ГФ, %;
 $C_{\text{D-АГ_ГФ}}$ – концентрация D-антигена очищенного концентрата полиовируса после ГФ, D-АГ/мл;
 $C_{\text{D-АГ_К}}$ – концентрация D-антигена концентрата полиовируса после ультрафильтрации, D-АГ/мл.

3.1.3 Гель-фильтрация на сорбенте Sepharose 6 FF

На Рисунке 2 представлены результаты хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sepharose 6 FF. К целевому пулу фракций отнесли 6 фракций (со 2 по 7 включительно) общим объемом 30 мл и концентрацией D-антигена 148±20 D-АГ/мл. Пик элюции D-антигена приходится на правое плечо первого пика и плато между первым и вторым пиками, который содержит балластные белки (Рисунок 2А). В этих фракциях также наблюдали высокий титр вируса (более 8,5 lg ТЦД 50/мл) и обнаружили структурный белок VP2 (во фракциях со 2 по 6). Несмотря на высокий титр вируса в целевых фракциях, вирусную РНК из них выделить не удалось, что косвенно может свидетельствовать об инактивации вирусных частиц. Таким образом, сорбент Sepharose 6 FF позволяет отделить вирусные частицы от основной массы балластных белков (степень очистки составляет 93%). Однако очистка сопровождается значительными потерями D-антигена (степень извлечения 45%).

3.1.4 Гель-фильтрация на сорбенте Sephacryl S-1000

На Рисунке 3 представлены результаты хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sephacryl S-1000. Фракции 11 и 12 характеризуются наибольшей степенью извлечения D-антигена (11% и 40% соответственно), высоким титром вируса (9,9 lg ТЦД50/мл), значительным содержанием структурного белка VP2 и вирусной РНК. Степень извлечения D-антигена в 11-й фракции составила всего 11 % при очень высокой степени очистки 99%. В 12-й фракции соответствующие показатели составили более 40% и всего 39%. Таким образом, на основании вышеприведенных данных можно сделать вывод о непригодности сорбента Sephacryl S-1000 для очистки частиц полиовируса, так как большая часть D-антигена элюируется вместе с балластными белками (Рисунок 3А).

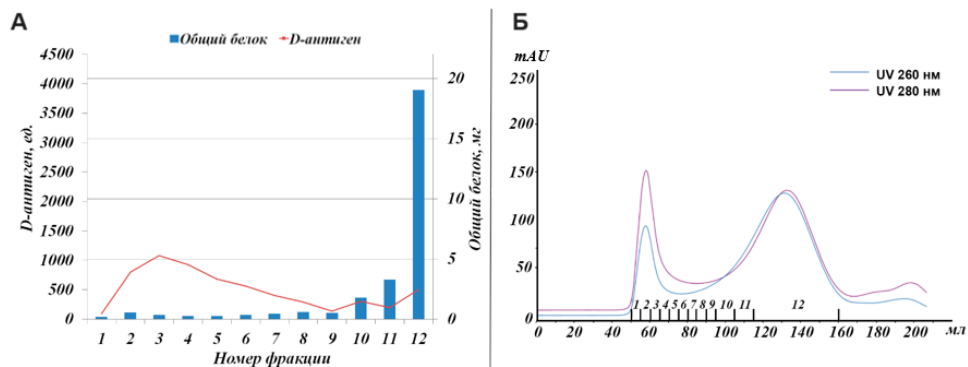


Рисунок 2 – Результат хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sepharose 6 FF: А – содержание D-антигена (красная линия) и общего белка во фракциях (диаграмма синего цвета); Б – профиль элюции

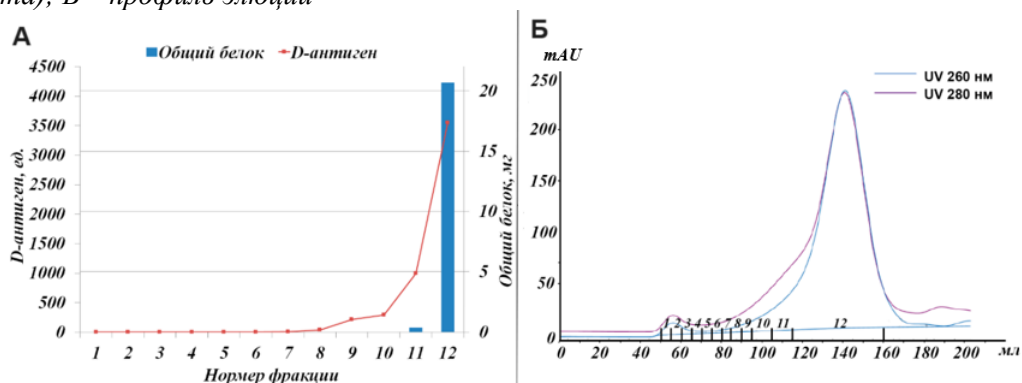


Рисунок 3 – Результат хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sepharose S-1000: А – содержание D-антигена (красная линия) и общего белка во фракциях (диаграмма синего цвета); Б – профиль элюции

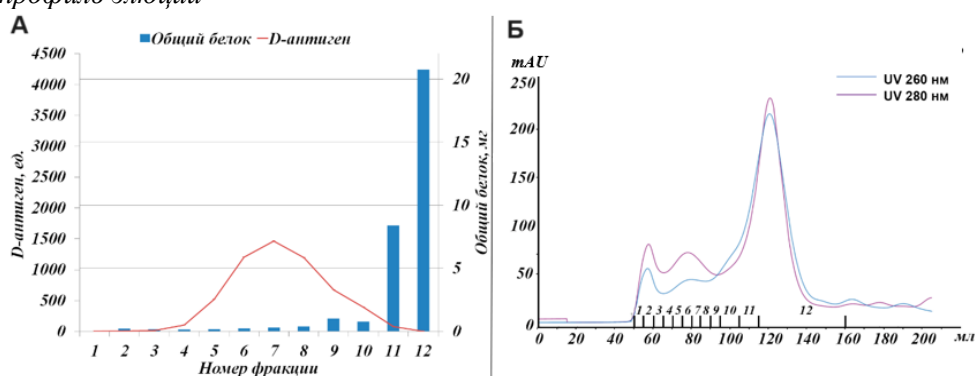


Рисунок 4 – Результат хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sepharose S-400 HR: А – содержание D-антигена (красная линия) и общего белка во фракциях (диаграмма синего цвета); Б – профиль элюции

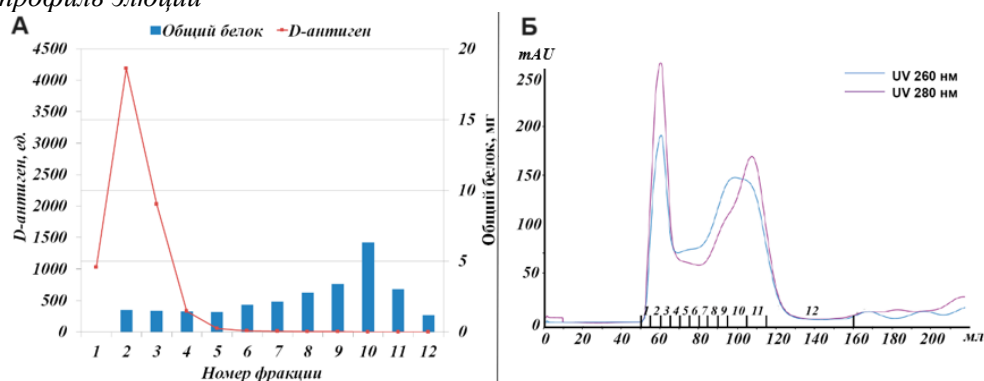


Рисунок 5 – Результат хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sepharose S-300 HR: А – содержание D-антигена (красная линия) и общего белка во фракциях (диаграмма синего цвета); Б – профиль элюции

3.1.5 Гель-фильтрация на сорбенте Sephacryl S-400 HR

На Рисунке 4 представлены результаты хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sephacryl S-400 HR. К целевому пулу фракций отнесли 5 фракций (с 5 по 9 включительно) общим объемом 25 мл и концентрацией D-антигена 202 ± 20 D-АГ/мл. Пик элюции D-антигена совпадает со вторым пиком на хроматограмме (Рисунок 4А). В этих же фракциях отмечен наибольший титр вируса (более $9,0 \lg$ ТЦД₅₀/мл во фракциях с 5 по 10), обнаружен структурный белок VP2 и вирусная РНК (фракции 5-10 и фракции 4–9 соответственно). При этом балластные белки элюируются позже во фракциях 11–12 (Рисунок 4Б), что обеспечивает достаточно высокую степень очистки вирусных частиц – 94%. Однако очистка на этом сорбенте сопровождается существенными потерями антигена – степень извлечения составляет 57%.

3.1.6 Гель-фильтрация на сорбенте Sephacryl S-300 HR

На Рисунке 5 представлены результаты хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sephacryl S-300 HR. К целевому пулу фракций отнесли 3 фракции (с 1 по 3 включительно) общим объемом 15 мл и концентрацией D-антигена 483 ± 25 D-АГ/мл. Пик элюции D-антигена совпадает с первым пиком на хроматограмме (Рисунок 5А). Эти же фракции характеризуются высоким титром вируса (более $9,0 \lg$ ТЦД₅₀/мл), содержанием структурного белка VP2 и вирусной РНК. Балластные белки элюируются во фракциях 5–12 позже вирусных частиц, что обеспечивает высокую степень очистки – 91%. Потери D-антигена при хроматографии на данном сорбенте оказались наименьшими – степень извлечения достигала 73%.

3.1.7 Сравнение сорбентов с разным диапазоном фракционирования

Согласно данным, полученным при проведении ГФ на сорбентах с разным диапазоном фракционирования, результаты сопоставимы по степени очистки вируса от балластных белков на сорбентах Sepharose 6 FF, Sephacryl S-400 HR и Sephacryl S-300 HR (93, 94 и 91% соответственно). Однако хроматография на всех сорбентах, кроме Sephacryl S-300 HR, сопровождалась значительными потерями антигена. Таким образом, только сорбент Sephacryl S-300 HR имеет оптимальный диапазон фракционирования 10 – 1500 кДа и позволяет эффективно отделить вирус от балластных белков, одновременно избегая размывания целевого пика и инактивации вирусных частиц. Однако, данный сорбент имеет ряд существенных недостатков в использовании:

1) Сорбент Sephacryl S-300 HR представляет собой декстран, сшитый N, N – метиленбисакриламидом. Для предотвращения неспецифического связывания рекомендуется использовать в качестве элюирующего раствора буферные растворы с содержанием не менее 150 мМ натрия хлорида. Это, в свою очередь, необходимо учитывать при выборе буферного раствора для ИОХ;

2) Сравнительно низкие скорости потока.

Заключая, можно отметить, что для хроматографических очисток концентратов полиовируса на стадии ГФ требуется сорбент с диапазоном фракционирования 10-1500 кДа, с размером частиц сорбента ~ 50 мкм. Кроме того, сорбент должен быть инертен и позволять работать на больших скоростях.

3.2 Гель-фильтрация концентрата полиовируса типа 2 на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC

Сорбент WorkBeads 40/1000 SEC компании Bio-Works представляет собой инертный сорбент на основе агарозы с диапазоном фракционирования 10-1200 кДа и средним размером частиц сорбента 45 мкм. Рекомендованная скорость потока при проведении хроматографических очисток 15-150 см/час, хотя максимально допустимая скорость потока составляет 600 см/час.

3.2.1 Условия проведения исследования

Для проведения ГФ использовали хроматограф АКТА pure 150M (Cytiva), оснащенный УФ-детектором. Хроматографическая колонка HiScale 26/40 (Cytiva) была упакована сорбентом WorkBeads 40/1000 SEC (Bio-Works) с высотой столба сорбента 31 ± 2 см. Ввод концентрата

полиовируса выполняли через петлю объемом 10 мл (Cytiva). Нагрузка составляла 5% от объема колонки. В процессе хроматографической очистки собирали фракции: №1 – №9 (объем одной фракции 5 мл), №10 – №11 (объем одной фракции 10 мл), №12 (объем фракции 50 мл). Оптическую плотность каждой фракции определяли при двух длинах волн – 260 и 280 нм. В качестве элюента применяли 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, pH 7,2±0,1, содержащий 0,10 М натрия хлорида. Хроматографию проводили при скорости потока 4,5 мл/мин. Скорость потока и условия регенерации были выбраны согласно рекомендациям производителя сорбента. К целевому пулу фракций относили фракции со степенью извлечения D-антигена более 4% и степенью очистки не менее 95%.

3.2.2 Результаты гель-фильтрации на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC

На Рисунке 6 представлены результаты хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC (Bio-Works). Как и в предыдущих экспериментах, к целевому пулу фракций относили фракции со степенью извлечения D-антигена более 4% и степенью очистки не менее 95%. К целевому пулу фракций отнесли 4 фракции (с 1 по 4 включительно) общим объемом 20 мл и концентрацией D-антигена 1610±100 D-АГ/мл. Пик элюции D-антигена совпадает с первым пиком на хроматограмме (см. Рисунок 6А). Эти же фракции характеризуются высоким титром вируса (более 9,5 lg ТЦД₅₀/мл) и наибольшим содержанием вирусной РНК. Балластные белки элюируются во фракциях 5–12 позже вирусных частиц, что обеспечивает высокую степень очистки – 90%. Потери D-антигена при хроматографии на данном сорбенте оказались минимальными – степень извлечения достигала 82%.

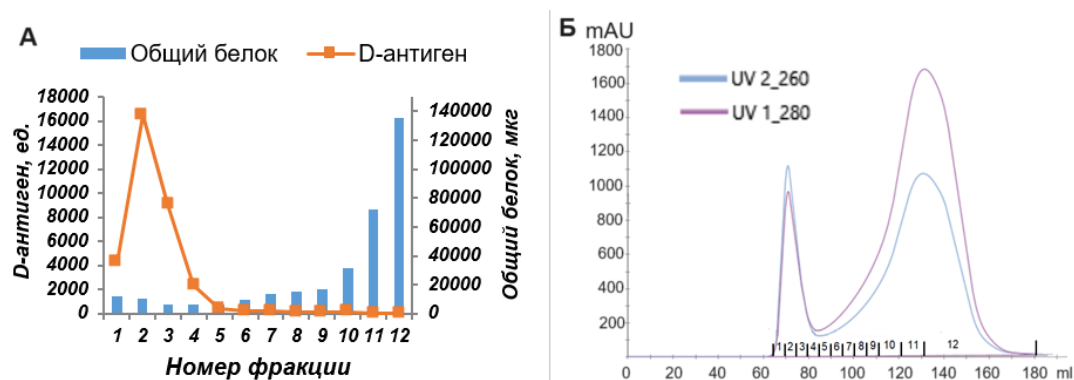


Рисунок 6 – Результат хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC: А – содержание D-антигена (красная линия) и общего белка во фракциях (диаграмма синего цвета); Б – профиль элюции

При проведении хроматографической очистки на колонке с диаметром 26 мм, упакованной с высотой сорбента WorkBeads 40/1000 SEC на уровне 31±2 см, скорость потока была 4,5 мл/мин, а давление на колонке составляло 0,38±0,02 МПа. При проведении хроматографической очистки на аналогичной колонке, упакованной сорбентом Sephacryl S-300HR, при скорости потока была 1,5 мл/мин давление составляло 0,36±0,02 МПа.

Средний размер частиц сорбента WorkBeads 40/1000 SEC составляет 45 мкм. По всей видимости благодаря малому размеру частиц достигается большее количество теоретических тарелок, что оказывает положительное влияние на разделение целевого антигена и балластных белков. Степень извлечения 82% и степень очистки от балластных белков 90%.

3.3 Гель-фильтрация концентратов полиовируса трех серотипов на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC

Было проведено более 60 хроматографических очисток с использованием сорбента WorkBeads 40/1000 SEC (Bio-Works). Для получения концентратов полиовирусов трех серотипов клеточную и вирусную биомассу нарабатывали в 50-литровых одноразовых биореакторах (XDR-50 Xcellerex, Cytiva, Великобритания) на микроносителе Cytodex 1 и Cytodex 3 (Cytiva). Для получения вирусных суспензий культуру-продуцент заражали полиовирусом типа 1 (штамм Сэбина LSc 2ab), типа 2 (штамм Сэбина P712 Ch 2ab) и типа 3 (штамм Сэбина Leon 12a1b).

Хроматографические колонки HiScale 26/40 (Cytiva) и XK 50/100 (Cytiva) были упакованы сорбентом WorkBeads 40/1000 SEC. Нагрузка составляла 5,0-7,5% от объема колонки. Результаты экспериментов по очистке концентратов полиовируса типа 1, типа 2 и типа 3 на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC (Bio-Works) представлены в Таблице 2 и на Рисунке 7. Значения степени извлечения представлены в виде медиан с межквартильным промежутком, так как полученные данные не удовлетворяли условиям нормальности распределения (Шапиро-Уилка, $p < 0,05$). Значения степени очистки от балластных белков представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Таблица 2 – Результаты гель-фильтрации концентратов полиовируса трех серотипов на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC

Тип полиовируса	Количество опытов	Степень извлечения, % Me (Q1;Q3)	Средняя степень очистки от балластных белков±SD, %
Тип 1	7	72,92 (64,48 ; 90,25)	96,61±1,76
Тип 2	31	77,33 (72,23 ; 81,45)	96,68±1,80
Тип 3	24	69,73 (66,34 ; 78,79)	95,76±3,59

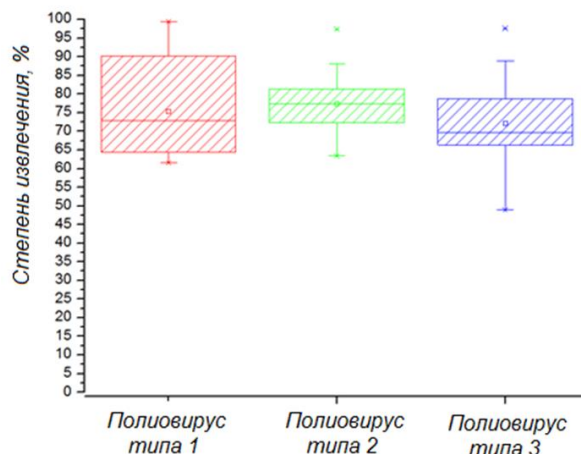


Рисунок 7 – Результаты гель-фильтрации концентратов полиовируса типа 1, типа 2 и типа 3 на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC по показателю степени извлечения, представленные в виде медианы (Median) и интерквартильного размаха (Q1-Q3)

Статистически значимого отличия между степенью извлечения целевого антигена трех серотипов полиовируса не обнаружено, также его нет между степенью очистки от балластных белков трех серотипов полиовируса на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC (Bio-Works).

Можно сделать вывод, что проведение ГФ концентратов полиовируса трех серотипов с использованием сорбента WorkBeads 40/1000 SEC (Bio-Works) на основе агарозы с диапазоном фракционирования 10-1200 кДа и средним размером частиц сорбента 45 мкм позволяет получать очищенные концентраты полиовируса трех серотипов с высокой степенью извлечения целевого антигена (~70%) и со степенью очистки от балластных белков не менее 90% и является наиболее предпочтительным для очистки концентратов полиовируса в промышленных объемах.

4. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КОНЦЕНТРАТОВ ПОЛИОВИРУСА

4.1 Расчет степени очистки от примесей и степени извлечения целевого антигена при проведении ионообменной хроматографии

Для оценки эффективности проведения ИОХ определяли степень очистки фракций от балластных белков (3), степень очистки фракций от остаточной клеточной ДНК (4) и степень извлечения целевого антигена (5). Соответствующие расчеты проводили по приведенным ниже формулам:

$$CO_{ББ_ИОХ} = 100 - \frac{C_{об_ИОХ} \times V_{ИОХ}}{C_{об_ГФ} \times V_{ГФ}} \times 100, (3)$$

$$CO_{ДНК} = 100 - \frac{C_{днк_ИОХ} \times V_{ИОХ}}{C_{днк_ГФ} \times V_{ГФ}} \times 100, (4)$$

$$СИ_{ИОХ} = \frac{C_{D-AG_ИОХ} \times V_{ИОХ}}{C_{D-AG_ГФ} \times V_{ГФ}} \times 100, (5)$$

- где $CO_{\text{Об}}_{\text{ИОХ}}$ – степень очистки от балластных белков при проведении ИОХ, %;
 $CO_{\text{Об}}_{\text{ИОХ}}$ – концентрация общего белка в очищенном концентрате полиовируса после ИОХ, мкг/мл;
 $V_{\text{ИОХ}}$ – объем очищенного концентрата полиовируса после ИОХ, мл;
 $CO_{\text{Об}}_{\text{ГФ}}$ – концентрация общего белка в очищенном концентрате полиовируса после ГФ, мкг/мл;
 $V_{\text{ГФ}}$ – объем очищенного концентрата полиовируса после ГФ, мл;
 $CO_{\text{ДНК}}$ – степень очистки от остаточной клеточной ДНК при проведении ИОХ, %;
 $CO_{\text{ДНК}}_{\text{ИОХ}}$ – концентрация остаточной клеточной ДНК в очищенном концентрате полиовируса после ИОХ, мкг/мл;
 $CO_{\text{ДНК}}_{\text{ГФ}}$ – концентрация остаточной клеточной ДНК в концентрате полиовируса после ГФ, мкг/мл;
 $SI_{\text{ИОХ}}$ – степень извлечения целевого антигена при проведении ИОХ, %;
 $CO_{\text{D-AG}}_{\text{ИОХ}}$ – концентрация D-антигена очищенного концентрата полиовируса после ИОХ, D-АГ/мл;
 $CO_{\text{D-AG}}_{\text{ГФ}}$ – концентрация D-антигена очищенного концентрата полиовируса после ГФ, D-АГ/мл.

4.2 Градиентная ионообменная хроматография

Для проведения градиентной ИОХ использовали хроматограф АКТА pure 150M (Cytiva) и предупакованные хроматографические колонки HiPrep Q FF 16/10 и HiPrep DEAE FF 16/10 (Cytiva). Для градиента на линии А1 был установлен 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, рН 7,2±0,1 и на линии В1 был установлен – 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, рН 7,2±0,1, содержащий 1М натрия хлорида.

При нанесении концентратов, полученных с помощью 0,04 М натрий фосфатного буферного раствора (рН 7,2±0,1) на стадии ГФ, на уравновешенные этим же раствором колонки с сорбентами DEAE Sepharose FF и Q Sepharose FF, происходит связывание D-антигена с сорбентами. Элюирование D-антигена начинается только с увеличением концентрации натрия хлорида в элюирующем буферном растворе (Рисунок 8). Фракции, полученные с концентрацией 100 мМ натрия хлорида в элюирующем растворе, содержат наибольшее количество D-антигена при минимальных показателях присутствия балластных белков и остаточной клеточной ДНК. Увеличение концентрации натрия хлорида в буферном растворе приводит к увеличению содержания балластных белков и остаточной клеточной ДНК во фракциях.

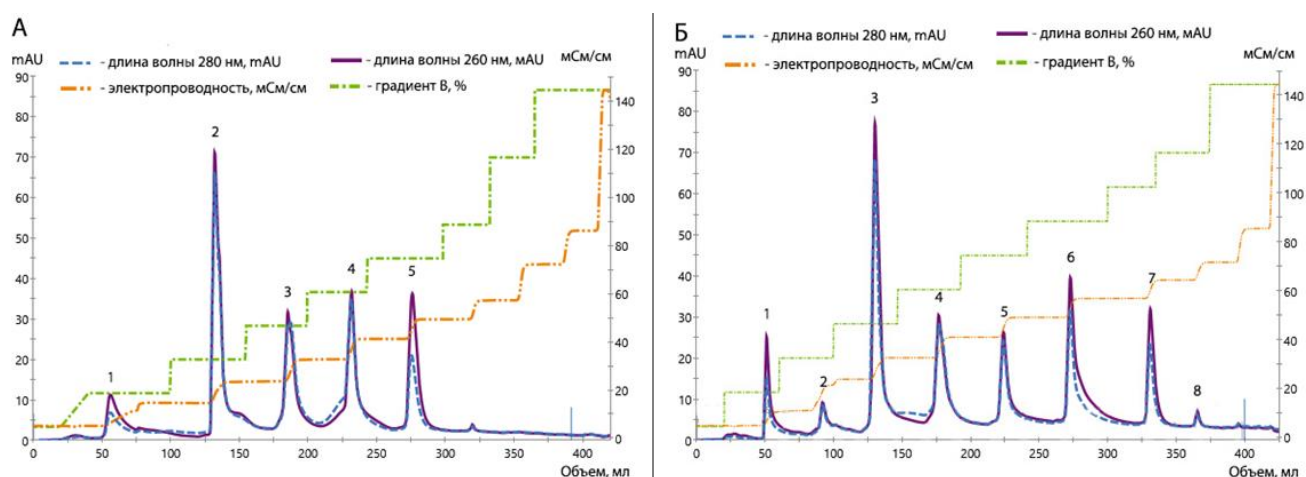


Рисунок 8 – Градиентная ионообменная хроматография концентрата полиовируса типа 2 на сорбенте DEAE Sepharose FF (А) и Q Sepharose FF (Б)

Дальнейшие эксперименты проводили с применением 0,04 М натрий фосфатного буферного раствора, рН 7,2±0,1, содержащего 0,10 М натрия хлорида в качестве элюирующего буферного раствора на колонках HiPrep Q FF 16/10 и HiPrep DEAE FF 16/10, а также на колонке

HiTrap Capto DEAE 4×5 мл (Cytiva). Сорбент Capto DEAE является аналогом сорбента DEAE Sepharose FF, но обладает большей ионной емкостью.

Результаты очистки трех серий концентратов полиовируса (Таблица 3) подтвердили эффективность ИОХ, когда в качестве элюирующего раствора применяли натрий фосфатный буферный раствор, содержащий 100 мМ натрия хлорида. Высокая степень очистки от балластных белков и остаточной клеточной ДНК при сохранении наибольшей степени извлечения целевого продукта (т.е. максимальное содержание D-антигена) была достигнута при очистке концентратов полиовируса типа 2 на сорбенте Capto DEAE (Cytiva).

Таблица 3 – Результаты очистки трех серий концентратов полиовируса типа 2

Сорбент	Номер серии	Степень извлечения, %	Степень очистки от балластных белков, %	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, %
DEAE Sepharose FF (Cytiva)	3	47,82	92,94	98,09
	4	42,29	97,21	99,93
	5	39,28	95,81	
Q Sepharose FF (Cytiva)	3	49,01	95,29	98,70
	4	50,26	97,01	99,98
	5	42,21	96,55	
Capto DEAE (Cytiva)	3	58,74	92,79	100,00
	4	66,47	97,34	99,97
	5	67,67	94,48	

4.3 Ионообменная хроматография на сорбентах DEAE Sepharose FF (Cytiva), DEAE Sepharose FF (Bio-Works) и Capto DEAE (Cytiva)

Было проведено более 80 экспериментов по очистке концентратов полиовируса типа 1, типа 2 и типа 3 на сорбенте Capto DEAE (Cytiva), а также на сорбентах DEAE Sepharose FF, производства Cytiva и Bio-Works. Сорбенты DEAE Sepharose FF (Cytiva) и DEAE Sepharose FF (Bio-Works) обладают одинаковой ионной емкостью и являются аналогами сорбенту Capto DEAE, но с меньшей ионной емкостью. Результаты экспериментов по очистке концентратов полиовируса типа 1, типа 2 и типа 3 на сорбенте Capto DEAE (Cytiva) и на сорбентах DEAE Sepharose FF, производства Cytiva и Bio-Works представлены на Рисунке 9 и в Таблице 4.

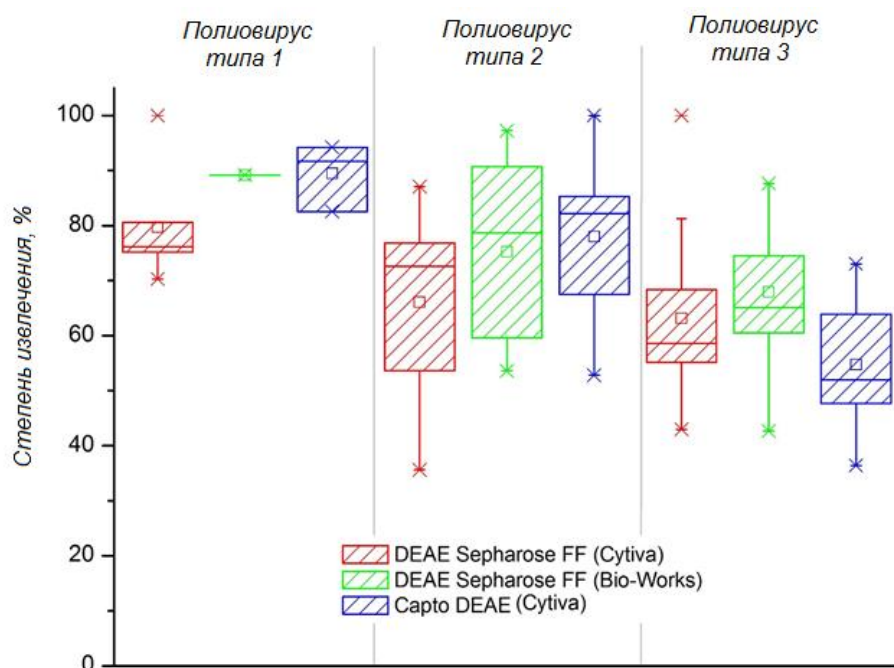


Рисунок 9 – Результаты ионообменной хроматографии концентратов полиовируса типа 1, типа 2 и типа 3 на трех сорбентах по показателю степени извлечения, представленные в виде медианы (Median) и интерквартильного размаха (Q1-Q3)

Таблица 4 – Степень извлечения целевого антигена при проведении ионообменной хроматографии концентратов полиовируса типа 1, типа 2 и типа 3 на трех сорбентах

Сорбент	Тип полиовируса					
	Тип 1		Тип 2		Тип 3	
	Количество опытов	Степень извлечения, % Me (Q1;Q3)	Количество опытов	Степень извлечения, % Me (Q1;Q3)	Количество опытов	Степень извлечения, % Me (Q1;Q3)
DEAE Sepharose FF (Cytiva)	6	76,15 (75,18;80,61)	14	72,59 (53,62;76,84)	19	58,57 (55,16;68,36)
DEAE Sepharose FF (Bio-Works)	1	89,17	7	78,71 (59,57;90,72)	11	65,09 (60,51;74,52)
Capto DEAE (Cytiva)	3	91,67 (82,57;94,21)	13	82,17 (67,49;85,31)	14	51,96 (47,69;63,88)

Медиана степени извлечения на сорбенте Capto DEAE выше в сравнении с сорбентами DEAE Sepharose FF для полиовируса типа 1, но между сорбентами нет статистически значимого различия ($p>0.05$).

Медиана степени извлечения на сорбенте Capto DEAE выше в сравнении с сорбентами DEAE Sepharose FF для полиовируса типа 2. Также можно отметить, что между сорбентами DEAE Sepharose FF двух производителей нет статистически значимого различия ($p>0.05$), но есть статистически значимое различие между сорбентами DEAE Sepharose FF (Cytiva) и Capto DEAE ($p<0.05$).

Для полиовируса типа 3 медиана степени извлечения выше на сорбенте DEAE Sepharose FF (Bio-Works). При этом степень извлечения на всех трех сорбентах имеет статистически значимое различие ($p<0.05$). Также наблюдается статистически значимое различие между степенью извлечения полиовируса типа 3 и степенью извлечения полиовируса типа 1 ($p<0.05$).

Результаты проведения ИОХ в градиент режиме позволяют предположить, что на степень очистки от остаточной клеточной ДНК концентратов полиовируса трех серотипов прежде всего оказывает влияние концентрация натрия хлорида в элюирующем буферном растворе. При проведении ИОХ концентратов полиовируса трех серотипов нет статистически значимого различия между степенью очистки от остаточной клеточной ДНК на трех сорбентах при использовании в качестве элюирующего буферного раствора натрий фосфатный буферный раствор, содержащий 100 мМ натрия хлорида ($p>0.05$). Степень очистки от остаточной клеточной ДНК составляет около 99% и концентрация клеточной ДНК не превышает 20 нг/мл в очищенных концентратах полиовирусов.

5. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИНЫ ПОЛИОВАКСИН

На основе разработанных нами методов хроматографических очисток концентратов полиовируса была приготовлена полупромышленная серия вакцины ПолиовакСин (Вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая из аттенуированных штаммов Сэбина) №IPV-04-09.17 для проведения клинических исследований. Вакцина ПолиовакСин представляет собой раствор для внутримышечного введения 0,5 мл (1 доза). Состав вакцины описан в Таблице 5. Основные показатели качества вакцины ПолиовакСин № IPV-04-09.17 представлены в Таблице 6. Они полностью соответствовали требованиям спецификации на готовый продукт.

Таблица 5 – Состав вакцины ПолиовакСин на 1 дозу (0,5 мл)

Наименование компонента	Количество
<i>Действующие вещества:</i>	
Вирус полиомиелита тип 1, аттенуированный штамм Сэбина, инактивированный	не менее 15 единиц D-антигена
Вирус полиомиелита тип 2, аттенуированный штамм Сэбина, инактивированный	не менее 15 единиц D-антигена
Вирус полиомиелита тип 3, аттенуированный штамм Сэбина, инактивированный	не менее 50 единиц D-антигена

Наименование компонента	Количество
<i>Вспомогательные вещества:</i>	
Полисорбат 80	не более 500 мкг
Формальдегид	не более 25 мкг
Среда 199 (10-кратный концентрат)	0,05 мл
Буферный раствор (динатрия фосфат дигидрат, натрия дигидрофосфата дигидрат, натрия хлорид, вода для инъекций)	до 0,5 мл

Таблица 6 – Основные показатели качества вакцины ПолиовакСин № IPV-04-09.17.

№ п/п	Наименование показателя	Требования	Результаты контроля
1.	Описание	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
2.	Подлинность	Вакцина должна быть подлинной и должна индуцировать образование антител к вирусам полиомиелита типов 1, 2, 3 при внутримышечной иммунизации экспериментальных животных. Индекс иммуногенности ЭД50 должен быть не менее 2 lg	Соответствует
3.	Прозрачность	Должна быть прозрачной не более эталона I	Прозрачная
4.	Цветность	Должна быть бесцветной не более эталона B9	Бесцветная
5.	Извлекаемый объем	Не менее номинального	Не менее номинального
6.	Механические включения	Вакцина должна соответствовать требованиям ОФС	Соответствует требованиям
7.	pH	От 6,8 до 7,6	7,3
8.	Общий белок	Не более 30 мкг/доза	15
9.	Формальдегид	Не более 25 мкг/доза	4,5
10.	Стерильность	Вакцина должна быть стерильной	стерильно
11.	Бактериальные эндотоксины	Не более 25 ЕЭ/дозе	0,96
12.	Аномальная токсичность	Вакцина должна быть не токсичной	Не токсично
13.	Специфическая активность: Количественное определение D-антигенов полиовирусов типов 1, 2 и 3 Иммуногенная активность	Содержание D-антигенов, инактивированных полиовирусов в одной дозе вакцины в единицах ИФА должна составлять: 1 типа – не менее 15 единиц 2 типа – не менее 15 единиц 3 типа – не менее 50 единиц Должна быть иммуногенной и индуцировать выработку антител к каждому из трех типов вируса полиомиелита у 50% иммуногенных животных (морских свинок). Индекс иммуногенности ЭД50 должен быть 2 lg	1 типа – 15 единиц D-антигена 2 типа – 32,5 единиц D-антигена 3 типа – 124 единиц D-антигена IN тип 1 – 2,7 ЭД50 IN тип 2 – 2,0 ЭД50 IN тип 3 – 2,18 ЭД50
14.	Упаковка	Вакцина по 1 дозе (0,5 мл) в ампулах объемом 1,0 мл из стекла 1-го гидролитического класса	Соответствует
15.	Маркировка	В соответствии с проектом НД	Соответствует

5.1 I фаза клинического исследования

Было проведено двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование переносимости, реактогенности и безопасности препарата ПолиовакСин на добровольцах в возрасте 18-60 лет. Были получены следующие данные:

1. За весь период поствакцинального наблюдения объективно (на основании осмотров врача-исследователя) были выявлены 3 реакции, из них 2 местных реакций в группе вакцинированной исследуемым препаратом и 1 – системная – в группе плацебо. В большинстве своем все реакции были слабой степени выраженности, носили транзиторный характер, продолжались, в целом, не более 2 дней.

2. Субъективно (на основании Дневников самонаблюдения) местных и системных реакций не было выявлено ни у одного добровольца.

3. Изучение влияния вакцины ПолиовакСин в сравнении с плацебо на лабораторные показатели показало:

- ✓ Изменения показателей клинического и биохимического анализов крови, общего анализа мочи, регистрируемые в динамике наблюдения, расценены как клинически незначимые и независимые от вакцинации, что свидетельствует о безопасности вакцины ПолиовакСин;
- ✓ Аллергизирующих свойств у изучаемой вакцины не выявлено - показатели сывороточного IgE не претерпевали значительных изменений в динамике исследования. Достоверных различий этого показателя на 28 сутки после вакцинации в сравнении с фоновыми значениями не обнаружено;
- ✓ Отмеченные незначительные отклонения от лабораторных норм некоторых показателей крови и мочи не имели клинического проявления и были объяснены физиологическими причинами.

4. За весь период поствакцинального наблюдения объективно (на основании осмотров врача-исследователя) нежелательные явления не отмечались ни у одного добровольца. Сообщения о развитии у добровольцев серьезных нежелательных явлений не поступали.

5. Данные, полученные в исследовании, подтверждают хорошую переносимость, низкую реактогенность и высокий профиль безопасности вакцины ПолиовакСин в сравнении с плацебо с участием добровольцев в возрасте 18-60 лет.

5.2 II фаза клинического исследования

Сравнительная оценка иммуногенности вакцин определялась до вакцинации (определение исходного уровня антител) и через 28 дней после вакцинации.

В соответствии с МУ 3.1.2943-11, вакцина считается эффективной, если отмечается не менее 80 % серопозитивных добровольцев (титр 1:8 и выше) к каждому из трех серотипов вируса полиомиелита.

Сыворотку крови, собранную у всех 200 участников до и после вакцинации, тестировали в реакции нейтрализации с использованием культуры клеток Нер-2 (Cincinnati) против вакцинных штаммов полиовируса трех серотипов и штаммов дикого полиовируса Mahoney, MEF-1 и Saukett (N = 200). Титры нейтрализующих антител представлены в Таблицах 7 и 8 и на Рисунке 10.

Все участники, за исключением одного, имели нейтрализующие антитела по крайней мере против одного типа полиовируса до вакцинации. Более того, у 66 участников не было обнаруживаемых титров против дикого полиовируса типа 3 (штамм Saukett). Однако группы ПолиовакСин и Имовакс Полио не отличались статистически по титрам нейтрализующих антител против любого используемого полиовируса ($p > 0,05$) до вакцинации. Полученные данные указывают на то, что все участники были вакцинированы ранее в своей жизни.

Таблица 7 – Средние титры нейтрализующих антител против вакцинных штаммов полиовируса трех серотипов, обнаруженных до и после вакцинации

Группа наблюдения	Титры нейтрализующих антител против вакцинных штаммов полиовируса до вакцинации, log ₂			Титры нейтрализующих антител против вакцинных штаммов полиовируса после вакцинации, log ₂			Нарастание титра нейтрализующих антител против вакцинных штаммов после вакцинации, log ₂		
	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3
Группа 1. Вакцина ПолиовакСин	7,74±0,35	6,83±0,24	4,70±0,41	11,00	11,00	10,67±0,16	3,06±0,36	4,29±0,27	6,08±0,51
Группа 2. Вакцина Имовакс Полио	8,07±0,28	6,63±0,27	4,40±0,41	11,00	11,00	11,00	2,97±0,31	4,33±0,33	6,41±0,45

Таблица 8 – Средние титры нейтрализующих антител против штаммов дикого полиовируса Mahoney, MEF и Saukett, обнаруженных до и после вакцинации

Группа наблюдения	Титры нейтрализующих антител против штаммов дикого полиовируса до вакцинации, \log_2			Титры нейтрализующих антител против штаммов дикого полиовируса после вакцинации, \log_2			Нарастание титра нейтрализующих антител против штаммов дикого полиовируса после вакцинации, \log_2		
	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3
Группа 1. Вакцина ПолиоакСин	6,18±0,22	6,36±0,18	3,22±0,27	10,67±0,16	10,67±0,09	10,74±0,07	4,47±0,25	4,38±0,20	7,16±0,29
Группа 2. Вакцина Имовакс Полио	5,91±0,21	6,43±0,16	3,61±0,26	10,76±0,06	10,97±0,02	10,65±0,09	4,85±0,21	4,53±0,17	7,04±0,25

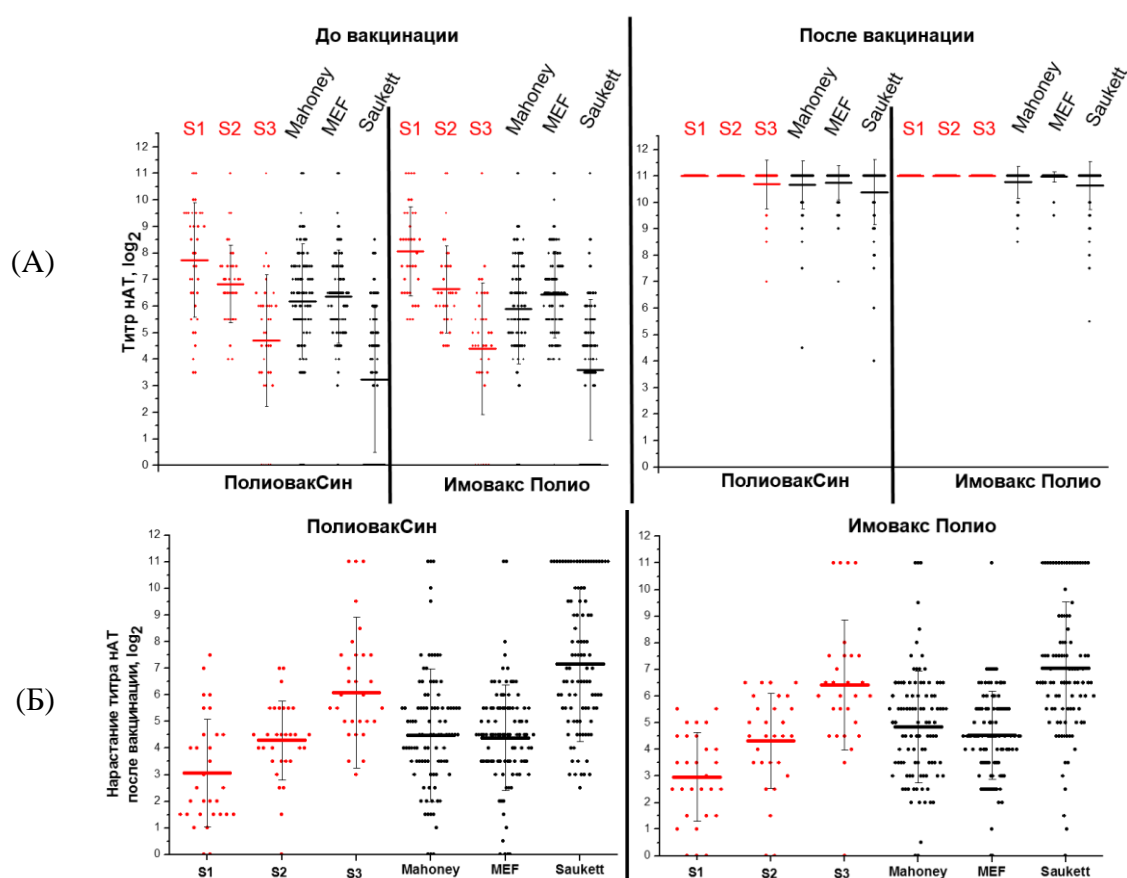


Рисунок 10 – Титры нейтрализующих антител против вакцинных штаммов полиовируса трех серотипов (S1, S2 и S3) и штаммов дикого полиовируса Mahoney, MEF-1 и Saukett, обнаруженных до и после вакцинации: (А) абсолютные значения (Б) Нарастание титра нейтрализующих антител после вакцинации. При расчетах титр менее 1:8 принимали за 0, титр более 1:1024 за титр 1:2048. Различия в нарастании титра нейтрализующих антител, индуцированных вакцинами Полиовакс Син и Имовакс Полио, статистически незначимы (критерий Манна–Уитни, $p < 0,05$)

После вакцинации у всех участников были нейтрализующие антитела против всех протестированных полиовирусов, вакцинных и диких, в высоких титрах: 68 в группе Полиовакс Син и 80 в группе Имовакс Полио показали титры $\geq 1:1024$ против всех вирусов. Титры против штаммов Mahoney, Сэбина типа 1 и Сэбина типа 2 существенно не различались между двумя группами. С другой стороны, титры против штаммов Сэбина типа 3, MEF-1 и Saukett, как правило, немного ниже в группе, вакцинированной Полиовакс Син ($p < 0,05$). Однако

различия между титрами нейтрализующих антител, индуцированными ПолиовакСин и Имовакс Полио до и после вакцинации, достоверно не различались ($p < 0,05$).

Результаты исследования сывороток крови, полученных на 28 сутки после вакцинации, в реакции микронеutralизации свидетельствуют об интенсивной активации гуморального звена иммунной системы после введения вакцины ПолиовакСин и Имовакс Полио у добровольцев в возрасте 18-60 лет, что подтверждает выраженную иммунологическую эффективность данных вакцин.

Было проведено двойное слепое сравнительное клиническое исследование переносимости, безопасности и иммуногенности препарата ПолиовакСин (Вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая из аттенуированных штаммов Сэбина) на добровольцах в возрасте 18-60 лет. Были получены следующие данные:

1. За весь период поствакцинального наблюдения объективно (на основании осмотров врача-исследователя) было выявлено 26 реакций, из них 13 местных и 13 системных. Большинство реакции были слабой степени выраженности, носили транзиторный характер, продолжались, в целом, не более 2-3 дней.

2. Субъективно (на основании Дневников самонаблюдения) было выявлено 3 нежелательных явления в виде системных реакций у двух добровольцев, привитых вакциной ПолиовакСин.

3. Изучение влияния вакцины ПолиовакСин в сравнении с Имовакс Полио на лабораторные показатели показало, что введение исследуемых препаратов добровольцам не оказывает негативного влияния на основные показатели клинического и биохимического анализов крови, уровень IgE и показатели общего анализа мочи. Выявленные колебания средних значений в показателях крови и мочи до вакцинации и на различных сроках после прививки не позволяют говорить о влиянии вакцинации на эти показатели и могут быть объяснены случайными факторами и перестройкой иммунной системы организма привитых в ответ на введение антигена.

4. За весь период поствакцинального наблюдения отмечалось 29 нежелательных явления в виде 13 местных реакций и 16 – системных. Сообщения о развитии у добровольцев серьезных нежелательных явлений не поступали.

5. Исследование иммуногенности сывороток, вакцинированных показало увеличение титров антител у всех добровольцев, независимо от используемой вакцины. Для оценки спектра антительного ответа, индуцированного вакциной против полиомиелита, в тесте на нейтрализацию использовали штаммы дикого полиовируса, а также аттенуированные штаммы полиовируса (Сэбина типа 1, Сэбина типа 2, Сэбина типа 3). Титры против штаммов Сэбина типа 1, Сэбина типа 2 и Mahoney существенно не различались между группой вакцины ПолиовакСин и группой вакцины Имовакс Полио. Однако титры против штаммов Сэбина типа 3, MEF-1 и Saukett, как правило, были немного ниже в группе, привитой вакциной ПолиовакСин, чем в группе получившей дозу Имовакс Полио. Тем не менее, антитела, индуцируемые вакциной ПолиовакСин, могут нейтрализовать не только штаммы Сэбина, но и дикие штаммы полиовируса. Таким образом, профиль иммуногенности вакцины ПолиовакСин можно считать сопоставимым с вакциной Имовакс Полио.

6. Данные, полученные в исследовании, подтверждают хорошую переносимость, высокий профиль безопасности и выраженные иммуногенные свойства вакцины ПолиовакСин в сравнении с Имовакс Полио с участием добровольцев в возрасте 18-60 лет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гель-фильтрация концентратов полиовируса трех серотипов с использованием сорбента WorkBeads 40/1000 SEC (Bio-Works) на основе агарозы с диапазоном фракционирования 10-1200 кДа и средним размером частиц сорбента 45 мкм позволяет получать очищенные концентраты полиовируса трех серотипов с высокой степенью извлечения целевого антигена (~70%) и со степенью очистки от балластных белков не менее чем 90%.

Включение в технологию изготовления инактивированных вакцин стадии очистки препарата методом ионообменной хроматографии является вполне оправданным для повышения безопасности и снижения реактогенности как самой вакцины, так и комбинированных вакцин. Анализ результатов градиентной ионообменной хроматографии концентратов полиовируса типа 2 на разных сорбентах показал, что элюирование D-антигена начинается с увеличением концентрации натрия хлорида в элюирующем буферном растворе. Причем фракции, полученные с концентрацией 100 мМ натрия хлорида в элюирующем растворе, отличались высоким содержанием D-антигена и высокой степенью очистки от балластных белков и остаточной клеточной ДНК. На основании этих данных было сделано заключение, что концентрация 100 мМ натрия хлорида в буферном растворе является оптимальной для очистки концентрата полиовируса от балластных белков и остаточной клеточной ДНК.

В следующей серии экспериментов показано, что при использовании в качестве сорбента *Capto DEAE* для очистки концентратов полиовирусов типа 1 и типа 2 показатель степени извлечения целевого компонента вакцины - D-антигена для обоих вирусных препаратов был относительно высоким. В случае очистки концентратов полиовируса 3 типа степень извлечения D-антигена была значительно ниже степени извлечения D-антигена для вируса типа 1 и типа 2.

По данным Y. Thomassen et.al (2013 г.) изоэлектрическая точка полиовирусов типа 1, типа 2 и типа 3 вакцинных штаммов Сэбина составляет 7,4, 7,2 и 6,3, соответственно. По-видимому, при pH=7,2 полиовирусы типа 1 и типа 2 имеют слабые заряды, что обуславливает высокую степень извлечения. При pH=7,2 полиовирус типа 3 имеет отрицательный заряд, как следствие происходит частичная адсорбция вируса при проведении ионообменной хроматографии. Вероятно, отрицательный заряд полиовируса типа 3 при pH=7,2 обуславливает и разницу в степени извлечения на сорбентах DEAE Sepharose FF и *Capto DEAE*. Сорбент *Capto DEAE* имеет бóльшую ионную силу в сравнении с сорбентом DEAE Sepharose FF, поэтому происходит бóльшая адсорбция полиовируса типа 3 и, как следствие, отмечаются самые низкие показатели степени извлечения. Сорбент DEAE Sepharose FF имеет меньшую ионную силу в сравнении с сорбентом *Capto DEAE*, в следствие чего адсорбция вируса менее выражена, а показатель степени извлечения выше.

Применение предложенных модификаций очистки концентратов штаммов Сэбина вируса полиомиелита типов 1, 2 и 3 с помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии позволяет получать инактивированный вирусный препарат, отвечающий требованиям ВОЗ и Европейской Фармакопеи как по биохимическим показателям (содержание ДНК клеток-продуцентов и содержание балластных белков, в том числе белки клеток-продуцентов), так и по показателю специфической активности (содержание D-антигена). Все биотехнологические подходы при проведении хроматографических очисток, в соответствии с полученными результатами, могут быть использованы для освоения промышленного производства вакцины ПолиовакСин. Существенным вкладом в технологию изготовления вакцины является определение оптимальных параметров ионообменной хроматографии, позволяющее снизить содержание остаточной клеточной ДНК практически до нуля, что делает инактивированную вакцину против полиомиелита наиболее привлекательной для включения ее в состав разных комбинированных вакцин.

На основе разработанных нами методов хроматографических очисток концентратов полиовируса были приготовлены полупромышленные серии вакцины ПолиовакСин (Вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая из аттенуированных штаммов Сэбина) для проведения клинических исследований.

Было проведено двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование переносимости, реактогенности и безопасности препарата ПолиовакСин на 60-ти добровольцах в возрасте 18-60 лет (I фаза) и двойное слепое сравнительное клиническое исследование переносимости, безопасности и иммуногенности препарата ПолиовакСин на 200-та добровольцах в возрасте 18-60 лет (II фаза). В качестве вакцины сравнения использована Имовакс Полио («Санofi Пастер», Франция).

Результаты исследования иммуногенности вакцины ПолиовакСин показали нарастание титров нейтрализующих антител у всех добровольцев: как в группе вакцины ПолиовакСин, так и в группе вакцины Имовакс Полио. Для оценки спектра антительного ответа, индуцированного вакциной против полиомиелита, в реакции нейтрализации использовали дикие штаммы полиовируса (тип 1 - Mahoney, тип 2 – MEF-1, тип 3 - Saukett), а также аттенуированные штаммы полиовируса (штамм Сэбин типа 1, штамм Сэбин типа 2, штамм Сэбин типа 3). Титры против штаммов Сэбина типа 1, Сэбина типа 2 и Mahoney существенно не различались между группами вакцинированных ПолиовакСин и Имовакс Полио. Однако титры против штаммов Сэбина типа 3, MEF-1 и Saukett, как правило, были немного ниже в группе, привитой вакциной ПолиовакСин, чем в группе, получившей дозу Имовакс Полио. Тем не менее, антитела, индуцируемые вакциной ПолиовакСин, могут нейтрализовать не только штаммы Сэбина, но и дикие штаммы полиовируса. Таким образом, профиль иммуногенности вакцины ПолиовакСин можно считать сопоставимым с вакциной Имовакс Полио.

Вакцина ПолиовакСин в клинических исследованиях продемонстрировала хорошую переносимость, низкую реактогенность, высокий профиль безопасности и выраженные иммуногенные свойства. Полученные нами данные согласуются с данными клинических исследований по оценке иммуногенности инактивированных вакцин против полиомиелита на основе штаммов Сэбина, полученных зарубежными исследователями. Показано, что антитела, индуцируемые сИПВ, могут нейтрализовать не только штаммы Сэбина, но и дикие штаммы полиовируса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При изучении процессов очисток различных вирусных суспензий применять биотехнологические приемы, а именно:

- снимать профили элюции на сорбентах с разной матрицей и с разным диапазоном фракционирования для эксклюзионной хроматографии;
- проводить ионообменную хроматографию в градиентном режиме для определения оптимальных режимов хроматографической очистки;
- использовать разработанные критерии оценки эффективности проведения хроматографических очисток вирусных концентратов для более детального анализа полученных результатов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Традиционно в качестве инактиватора вируса полиомиелита применяют раствор формалина. Процесс инактивации вируса формалином длится 13 суток, причем на 6-8 сутки необходимо проводить промежуточную фильтрацию полуфабриката, чтобы удалить образовавшиеся агрегаты полиовируса, в которых, возможно, часть вирусных частиц экранируется и остается недоступной для взаимодействия с формалином. На 9 и 13 сутки инактивации необходимо проводить отбор проб для контроля эффективности инактивации. Данные операции должны проводиться в заразной зоне, что также может представлять опасность контаминации инактивируемого полуфабриката. Длительность процесса инактивации оказывает негативное влияние на сохранность и активность самого целевого вирусного антигена и, как следствие, на протективную активность самой инактивированной полиомиелитной вакцины.

Большую часть приведенных выше недостатков инактивации вируса полиомиелита формалином можно избежать при замене его бета-пропиолактоном. Необходимо отработать технологию инактивации вируса непосредственно в одноразовых культуральных сосудах биореакторов сразу после получения в них вирусных суспензий. Стадии фильтрации, ультрафильтрации, стадии хроматографических очисток будут проводиться уже не с живым, а с инактивированным полиовирусом. Это значительно снизит производственные риски, связанные с соблюдением биобезопасности.

В случае успешной инактивации полиовируса бета-пропиолактоном потребуются также оценить эффективность и надежность применяемых в настоящее время хроматографических очисток концентратов полиовируса.

Новая инактивированная вакцина против полиомиелита должна будет пройти доклинические и клинические исследования для оценки ее безопасности, переносимости, реактогенности и иммуногенности.

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология получения высокоочищенных концентратов полиовирусов (штаммы Сэбина), продуцируемых в культуре клеток Vero, с применением биореакторной технологии. Предложенные процессы проведения хроматографических очисток позволяют получать моновалентные концентраты с высокой степенью извлечения антигена при минимальном содержании технологических примесей.
2. По критериям оценки максимального извлечения целевого антигена при минимальном присутствии технологических примесей выбраны актуальные сорбенты для гель-фильтрации и ионообменной хроматографии концентратов полиовирусов.
3. Максимальная степень извлечения целевого антигена при очистке от технологических примесей препаратов вакцинных штаммов полиовирусов с помощью ионообменной хроматографии обеспечивается при рН элюирующего буферного раствора, близком к изоэлектрической точке вирионов соответствующего штамма.
4. По данным клинических исследований вакцинный препарат, полученный по разработанной технологии, обладает хорошей переносимостью, низкой реактогенностью и высоким профилем безопасности.
5. Антитела, индуцируемые экспериментальной вакциной ПолиовакСин, обладают нейтрализующей активностью по отношению как к вакцинным штаммам полиовируса типов 1, 2, 3 (штаммы Сэбина LSc 2ab, P712 Ch 2ab, Leon 12a₁b), так и диким штаммам полиовируса типов 1, 2, 3 (штаммы Mahoney, MEF-1, Saukett).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Immunogenicity and Safety of Inactivated Sabin-Strain Polio Vaccine “PoliovacSin”: Clinical trials phase I and II / **А. Piniyeva**, G. Ignatyev, L. Kozlovskaya, Y. Ivin, A. Kovpak, A. Ivanov, A. Shishova, L. Antonova, Y. Khapchaev, I. Feldblum, O. Ivanova, A. Siniugina, A. Ishmukhametov // *Vaccines*. – 2021. – Т. 9. – № 6. – С. 1-11. DOI: 10.3390/vaccines9060565.
2. Подбор сорбента для очистки концентрата вакцинного штамма полиовируса методом гель-фильтрации / **А.Н. Пиняева**, А.А. Ковпак, Ю.Ю. Ивин, А.А. Шишова, А.А. Сорокин, М.А. Простова, А.В. Белякова, А.А. Синюгина, А.А. Ишмухаметов, Ю.Х. Хапчаев, А.П. Гмыль // *Биотехнология*. – 2021. – Т. 37. – № 6. – С.84-94. DOI: 10.21519/0234-2758-2021-37-6-84-94.
3. Применение ионообменной хроматографии при разработке технологии получения инактивированной вакцины против полиомиелита / **А.Н. Пиняева**, А.А. Ковпак, Ю.Ю. Ивин, С.Х. Санджиева, А.А. Шишова, И.О. Целых, В.Е. Василенко, К.В. Каа, Ж.Х. Мажед, Ю.Х. Хапчаев, А.А. Синюгина, А.А. Ишмухаметов // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. – 2022. – Т. 21. – № 5. – С. 107-119. DOI: 10.31631/2073-3046-2022-21-5-107-119.
4. Биофармацевтическое производство. Разработка, проектирование и внедрение производственных процессов. Г. Ягшис, Е. Линдског, К. Лаки, П. Галлихер // Пер. с англ. под ред. А. А. Ишмухаметова, Н. В. Пятигорской. Глава 44-1: Процесс производства и масштабирование основных этапов получения полиомиелитных вакцин. А.А. Ишмухаметов, А.А. Синюгина, **А.Н. Пиняева**, Ю.Ю. Ивин, А.А. Ковпак – СПб.: Издательство Профессия, 2020. – Том 2. – С.352-364.