

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»
(Институт полиомиелита)

На правах рукописи

ПИНЯЕВА
Анастасия Николаевна

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

1.5.10. – Вирусология

Диссертация
на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
академик РАН, профессор,
доктор медицинских наук
Ишмухаметов Айдар Айратович

Москва – 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Полиомиелит и полиовирус.....	11
1.2 История создания вакцин против полиомиелита.....	11
1.2.1 Инактивированная вакцина против полиомиелита.....	12
1.2.2 Пероральная (живая) вакцина против полиомиелита.....	13
1.3 Состояние Глобальной инициативы по ликвидации полиомиелита и современная стратегия ВОЗ по иммунопрофилактике.....	15
1.4 Принципы производства инактивированной вакцины против полиомиелита.....	21
1.4.1 Культивирование клеток.....	21
1.4.2 Культивирование вируса полиомиелита.....	24
1.4.3 Фильтрация и ультрафильтрация.....	24
1.4.4 Хроматографическая очистка: гель-фильтрация и ионообменная хроматография.....	25
1.4.5 Инаktivация вируса раствором формалина	27
1.5 Производство инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина в мире.....	27
1.6 Вакцины для профилактики полиомиелита в России.....	29
1.6.1 Национальный календарь профилактических прививок России.....	29
1.6.2 Зарегистрированные в России вакцины против полиомиелита.....	30
1.6.3 Комбинированные вакцины	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	33
2.1 Клетки и вирусы.....	33
2.2 Технология производства инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина.....	33
2.2.1 Нарботка партий культуры-продуцента из пула аттестованного рабочего банка клеток Vero	34
2.2.2 Раздельная наработка вирусных суспензий каждого из трех серотипов полиовируса на культуре-продуценте.....	34
2.2.3 Фильтрация и концентрирование вирусных суспензий.....	34
2.2.4 Хроматографические очистки вирусных концентратов	35
2.2.5 Инаktivация очищенных вирусных концентратов	35
2.2.6 Сведение и розлив трехвалентной инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина	36

2.3 Контроль качества инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина	36
2.3.1 Определение концентрации D-антигена.....	36
2.3.2 Определение концентрации общего белка.....	37
2.3.3 Анализ фракций на наличие вирусной РНК.....	38
2.3.4 Определение титра вируса.....	38
2.3.5 Определение содержания структурного белка VP2 полиовируса.....	38
2.3.6 Определение концентрации остаточной клеточной ДНК.....	39
2.3.7 Определение содержания белков клеток Vero.....	40
2.4 Клинические исследования вакцины ПолиовакСин.....	40
2.4.1 Дизайн исследования	40
2.4.2 Этические аспекты проведения исследования.....	41
2.4.3 Методология исследования.....	42
2.4.4 Критерии оценки переносимости и безопасности.....	44
2.4.5 Реакция нейтрализации.....	46
2.5 Статистический анализ.....	47
ГЛАВА 3. ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ КОНЦЕНТРАТОВ ПОЛИОВИРУСА.....	48
3.1 Оценка эффективности проведения гель-фильтрации концентрата полиовируса типа 2 на сорбентах с разным диапазоном фракционирования.....	48
3.1.1 Условия проведения исследования.....	48
3.1.2 Расчет степени очистки от примесей и степени извлечения целевого антигена при проведении гель-фильтрации	50
3.1.3 Гель-фильтрация на сорбенте Sepharose 6 FF.....	50
3.1.4 Гель-фильтрация на сорбенте Sephacryl S-1000.....	51
3.1.5 Гель-фильтрация на сорбенте Sephacryl S-400 HR.....	52
3.1.6 Гель-фильтрация на сорбенте Sephacryl S-300 HR.....	53
3.1.7 Оценка эффективности очистки на сорбенте Sephacryl S-300 HR концентратов полиовируса типа 2, полученных при культивировании в одноразовых реакторах	54
3.1.8 Сравнение сорбентов с разным диапазоном фракционирования.....	56
3.2 Гель-фильтрация концентрата полиовируса типа 2 на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC	58
3.2.1 Условия проведения исследования.....	58
3.2.2 Результаты гель-фильтрации на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC	59
3.3 Гель-фильтрация концентратов полиовируса трех серотипов на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC	60

ГЛАВА 4. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КОНЦЕНТРАТОВ ПОЛИОВИРУСА	64
4.1 Получение очищенного концентрата полиовируса	64
4.2 Расчет степени очистки от примесей и степени извлечения целевого антигена при проведении ионообменной хроматографии	65
4.3 Градиентная ионообменная хроматография	66
4.4 Ионообменная хроматография на сорбентах DEAE Sepharose FF (Cytiva), DEAE Sepharose FF (Bio-Works) и Capto DEAE (Cytiva)	71
4.4.1 Определение динамической связывающей способности разных сорбентов при очистке концентратов полиовируса от технологических примесей	71
4.4.2 Степень извлечения целевого антигена	75
4.4.3 Степень очистки от остаточной клеточной ДНК	76
4.4.4 Очистка от белков клеток Vero	77
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОЛИОМИЕЛИТА НА ОСНОВЕ ШТАММОВ СЭБИНА	80
5.1 Производство инаktivированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина	80
5.2 Контроль качества на стадиях хроматографических очисток вирусных концентратов	83
5.2.1 Контроль качества на стадии гель-фильтрации	83
5.2.2 Контроль качества на стадии ионообменной хроматографии	83
5.3 Контроль качества фармацевтических субстанций и готовой лекарственной формы	84
5.3.1 Контроль качества фармацевтических субстанций	84
5.3.2 Контроль качества готовой лекарственной формы	85
ГЛАВА 6. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИНЫ ПОЛИОВАКСИН	88
6.1 I фаза клинического исследования	90
6.1.1 Демографические и другие исходные характеристики добровольцев исследования	90
6.1.2 Оценка реактогенности	91
6.1.3 Оценка безопасности	93
6.2 II фаза клинического исследования	95
6.2.1 Демографические и другие исходные характеристики добровольцев исследования	95
6.2.2 Оценка переносимости и безопасности	96
6.2.2.1 Оценка переносимости и безопасности по местным и системным реакциям	96

6.2.2.2	Оценка переносимости и безопасности по данным ЭКГ обследования и по данным физикального и неврологических осмотров	98
6.2.2.3	Результаты оценки безопасности введения вакцины ПолиовакСин по влиянию на лабораторные показатели	99
6.2.3	Оценка иммуногенности	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		105
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....		109
ВЫВОДЫ.....		110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ		111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		113

ВВЕДЕНИЕ

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 12a₁b) 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 [1].

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 [2]. 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) [3].

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 [4]. 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 [5]. 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 инаktivированной 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 инаktivированных противовирусных вакцин, а также аналитических методик оценки качества полученного вакцинного препарата для оптимизации производства отечественной инаktivированной 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 инаktivированной 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. Использованные 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 Полиовакс Син 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. Вакцина ПолиовакСин, в технологический процесс которой внедрены предложенные хроматографические очистки, была зарегистрирована в РФ (Регистрационное удостоверение ЛП-007478, 07.10.2021).

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 [6–13].

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 pH элюирующего буферного раствора на степень извлечения целевого антигена при проведении ионообменной хроматографии. Установлено, что степень извлечения целевого антигена выше при pH элюирующего буферного раствора близком к изоэлектрической точке штамма полиовируса.
3. Доказано, что разработанная технология позволяет получать серии инаktivированной 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.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Полиомиелит и полиовирус

Полиомиелит является неизлечимым и острым инфекционным заболеванием, вызываемым вирусом полиомиелита (род *Enterovirus*, семейство *Picornaviridae*) [1,14]. Заболевание может вызвать острый мышечный паралич, постоянное повреждение центральной нервной системы и даже смерть. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), смерть наступает примерно у 5–10% пациентов, которые становятся постоянно парализованными из-за иммобилизации дыхательных мышц. Желудочно-кишечный тракт человека считается главным резервуаром инфекции; путь передачи – перорально-оральный и/или орально-фекальный [14]. Пациенты считаются высокоинфекционными в течение 7-10 суток до и после первого дня появления симптомов. Однако инфекция продолжает распространяться в течение двух-трех недель через фекалии. Вирус может быть обнаружен в стуле в течение пяти недель или в носоглотке в течение пяти суток после первого появления симптомов. Начальными симптомами могут быть лихорадка, головная боль, тошнота, усталость, рвота, боль и скованность шеи [14].

Вирус полиомиелита представляет собой небольшой безоболочечный вирус диаметром 27-30 нм с икосаэдрическим капсидом, в котором заключен положительный РНК-геном длиной около 7,5 тыс. нуклеотидов. Капсид состоит из 60 копий каждого из четырех капсидных белков (VP1–VP4). Капсидные белки определяют антигенную специфичность полиовирусной частицы. В природе встречаются три серотипа полиовируса (типы 1, 2 и 3). После инфицирования или иммунизации формируется типоспецифический иммунитет. То есть, например, полиовирус типа 1 не может быть нейтрализован антителами, направленными против полиовируса типа 2 [1,15].

Полиомиелит неизлечимое заболевание. Профилактика остается ключевым фактором. Ввиду формирования типоспецифического иммунитета необходимым требованием к вакцинам против полиомиелита является формирование устойчивого иммунитета ко всем трем серотипам полиовируса. Долгие годы профилактика успешно достигается с помощью двух доступных вакцин: инактивированной формалином полиовирусной вакциной Солка, приготовленной из диких штаммов вируса (ИПВ), и пероральной (живой) полиовирусной вакциной (ППВ), приготовленной из аттенуированных штаммов Сэбина [1,14].

1.2 История создания вакцин против полиомиелита

Первые попытки создать вакцину против полиомиелита были предприняты еще в 1935 году Броди, который испытывал инактивированную вакцину, созданную на основе суспензии

вируса, взятого из спинного мозга инфицированной обезьяны и впоследствии инаktivированного раствором формалина. Он испытал вакцину сначала на 20 обезьянах, а затем провел исследования с участием 3000 детей из Калифорнии. Результаты были неутешительными, и дополнительные исследования этой вакцины на людях никогда не проводились. В том же году Коллмер опробовал в качестве вакцины живой аттенуированный вирус, состоящий из 4% -ной суспензии из спинного мозга инфицированной обезьяны, обработанный рицинолеатом натрия. Он опробовал её на обезьянах, а затем на нескольких тысячах детей. Примерно у 1 из 1000 вакцинированных развивался острый паралич, а у некоторых пациентов вакцинация привела к летальному исходу [16].

В 1949 году Д. Эндерсом, Т. Уэллером и Ф. Роббинсом были получены первичные культуры клеток обезьян *in vitro*, чувствительные к полиовирусам. Это открытие позволило получать большие количества вирусосодержащего материала [15].

Возможность размножения полиовируса *in vitro* позволила приступить к разработке вакцин против полиомиелита: ИПВ Джонаса Солка (1953 г.) и ОПВ, приготовленной из аттенуированных штаммов Сэбина (1956 г.) [16].

1.2.1 Инаktivированная вакцина против полиомиелита

Первая ИПВ была произведена Солком с использованием вируса, выращенного на клетках почек макак-резусов и инаktivированного раствором формалина. В 1954 году инаktivированная вакцина была испытана в исследовании, в котором приняли участие более 1,8 миллиона детей в Канаде, Финляндии и США [17]. В апреле 1955 года вакцина Солка была разрешена к применению на всей территории Соединенных Штатов. Заболеваемость паралитическим полиомиелитом в США снизилась с 13,9 случаев на 100 000 в 1954 году до 0,8 случаев на 100 000 в 1961 году [18]. Основными недостатками вакцины Солка были:

- снижение титров циркулирующих антител в течение нескольких лет после вакцинации;
- дальнейшая циркуляция дикого полиовируса и его участие во вспышках заболевания, несмотря на вакцинацию населения;
- необходимость забоя большого числа обезьян для получения достаточного количества партий культур-продуцентов вакцины – 1500 животных для наработки 1 млн доз вакцины.

Штаммами вируса, использованными в вакцине, были Mahoney (тип 1), MEF-1 (тип 2) и Saukett (тип 3) [16]. Вскоре после лицензирования вакцины Солка неполная инаktivация вакцинного вируса привела к 260 случаям полиомиелита, связанным с вирусом типа 1. 10 человек

погибло. Устойчивость вируса к инаktivации формальдегидом исследователи связали с содержанием в вирусной суспензии большого количества балластного белка или с формированием конгломератов вирусных частиц, которые экранировали доступ формальдегида ко всем вирусным частицам. Поэтому в технологический процесс производства был введен дополнительный этап фильтрации для удаления агрегатов, которые могли образоваться во время обработки формальдегидом, был улучшен контроль безопасности готовой вакцины [16].

В 1980х г. в технологическую цепочку производства ИПВ были включены этапы концентрирования и очистки вирусного антигена. Вследствие этого иммуногенность вакцины была повышена [16]. Специфическая активность – это один из основных показателей качества вакцин. При производстве ИПВ для выполнения контроля по этому показателю выполняют иммуноферментный анализ для количественного определения D-антигена. D-антиген определяет способность вакцины вызывать выработку вируснейтрализующих антител. Его выражают в D-антигенных единицах (D-АГ/мл или D-АГ/доза) [19]. Первоначальный вариант ИПВ содержал 20, 2 и 4 D-антигенных единиц полиовируса типов 1, 2 и 3 соответственно. Ван Везель представил новую технологию производства, в которой решил концентрировать и очищать вирус от балластных белков перед обработкой формалином. После введения этих этапов никаких проблем при инаktivации полиовируса более не было зарегистрировано [16].

Следующим нововведением было внедрение новой методики культивирования клеток для размножения полиовируса. Вместо первичных клеток почек обезьян стали использовать перевиваемые клетки Vero на микроносителях в виде псевдосуспензии, культивируемые в больших биореакторах. В итоге была получена вакцина, содержащая 40, 8 и 32 D-антигенных единиц типов 1, 2 и 3 соответственно [20,21]. Испытания улучшенной ИПВ показали более 90% серопозитивности по всем трем типам полиовируса после введения одной дозы и 100% серопозитивности после введения двух доз [22].

1.2.2 Пероральная (живая) вакцина против полиомиелита

Кандидатные штаммы аттенуированного полиовируса, подходящие для использования в качестве вакцины, были разработаны независимо друг от друга Копровски, Коксом и Сэбином [16].

Аттенуированный штамм А.Сэбина типа 1 LSc 2ab

Вирус полиомиелита типа 1 штамм LSc 2ab был получен путем пассирования штамма Mahoney. Был выполнен ряд пассирований вируса:

- 14 церебральных пассажей на обезьянах;
- 2 культуральных пассажа в лаборатории Д. Солка;

- затем учеными Ли и Шеффером был выполнен в монослойной культуре клеток почек обезьян 31 культуральный пассаж;
- 10 попеременных пассажей через кожу живых обезьян и культуру клеток почек обезьян.

Полученный в ходе исследований штамм был назван LSc (Ли и Шеффера, линия с). А.Сэбин исследовал штамм LSc. И было выполнено дополнительное пассирование вируса через кишечник шимпанзе. Очищен вирус был дважды методом бляшек.

Таким образом был получен вакцинный штамм, обозначенный А. Сэбиным как LSc 2ab [23].

Аттенуированный штамм А. Сэбина типа 2 P712 Ch 2ab

В исследования А. Сэбина по получению ослабленного штамма вируса полиомиелита типа 2 штамм P712, выделенный Гельфандом и Фоксом от здорового ребенка, проявил очень низкую исходную спинальную вирулентность на обезьянах. Вирус также хорошо адаптировался и демонстрировал хорошую стабильность при пассажах через человеческий кишечник. Однократно было выполнено пассирование через кишечник шимпанзе. Очистка была произведена методом бляшек. Штамм был обозначен P712 Ch 2ab [23].

Аттенуированный штамм А. Сэбина типа 3 Leon 12a₁b

Аттенуация штамма Leon была выполнена А. Сэбиным и соавторами. Было выполнено 30 пассирований в культуре клеток и три очистки методом конечных разведений. Затем вирус был размножен. Образованные пассированным вирусом популяции 9 бляшек три раза подверглись очистке методом бляшек. Одна из линий была обозначена Leon 12a₁b [23].

В 1960 году Сэбин описал живую перорально вводимую полиовирусную трехвалентной вакцину [24], которой были привиты 26 033 ребенка в Южной Америке. Поскольку штаммы, разработанные Сэбином, обеспечивали хорошие уровни антител и были менее нейротропными для обезьян, они были отобраны и лицензированы между 1961 и 1963 годами в США для широкого применения. Первая общенациональная кампания по вакцинации против полиомиелита была проведена на Кубе в 1962 году [16,25].

В 1956 году Альберт Сэбин представил свои экспериментальные результаты и свои штаммы для вакцины против полиомиелита Михаилу Петровичу Чумакову, который запустил производство вакцины для использования в СССР. Несколько миллионов детей из Эстонии и Литвы получили прививку в 1959 году. Успешное испытание ОПВ в СССР внесло свой вклад в лицензирование трех штаммов, разработанных Сэбином [26]. Сам ученый отмечал, что не малую

роль в этом сыграли представленные М.П. Чумаковым, А.А. Смородинцевым и их сотрудниками доказательства эффективности и безопасности новой вакцины.

Сначала трехвалентная ОПВ содержала три типа полиовируса в равных пропорциях, но были зафиксированы низкие показатели сероконверсии для типов 1 и 3. Изменив состав, который стал содержать 10^6 , 10^5 и $10^{5.5}$ ТЦД₅₀ (50%-ная инфекционная доза для культуры ткани) штаммов Сэбина типов 1, 2 и 3, соответственно, нейтрализующие антитела против всех трех типов вируса были обнаружены почти у всех привитых. Позднее увеличение количества вируса типа 3 в трехвалентной вакцине улучшило иммуногенность [27], и Глобальная консультативная группа по расширенной программе иммунизации рекомендовала состав трехвалентной ОПВ, которая содержала 10^6 , 10^5 , $10^{5.8}$ ТЦД₅₀ штаммов Сэбина типов 1, 2 и 3, соответственно, на дозу [28]. Вакцина ОПВ была проще в применении и имела эффект массовой иммунизации, вызывая длительный защитный системный, гуморальный и клеточный иммунитет также, как и местный мукозальный иммунитет слизистой оболочки к полиовирусной инфекции. В 1972 году Сэбин подарил свои вакцинные штаммы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), увеличив доступность этой вакцины для развивающихся стран [16].

Основными рисками вакцинации против ОПВ являются появление случаев вакцино-ассоциированного паралитического полиомиелита (ВАПП) и циркуляция полиовирусов вакцинного происхождения (ПВВП).

Появление случаев ВАПП связано с возвращением к нейровирулентности вакцинных штаммов. Во время репликации в кишечнике штаммы ОПВ могут подвергаться генетическим изменениям путем точечных мутаций со средней частотой 10^{-4} из-за ошибок РНК-полимеразы или в результате естественной рекомбинации [29].

1.3 Состояние Глобальной инициативы по ликвидации полиомиелита и современная стратегия ВОЗ по иммунопрофилактике

Принятие Глобальной инициативы по ликвидации полиомиелита (ГИЛП) на 41-й сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения в 1988 году позволило снизить число случаев заболевания полиомиелитом более чем на 99% [30]. К сентябрю 2022 г. ВОЗ и Всемирной ассамблеей здравоохранения было принято несколько программ по ликвидации полиомиелита:

- 1) Первая Глобальная программа ликвидации полиомиелита ВОЗ (принятие первого плана ликвидации полиомиелита 1988–2000 гг.) [31];
- 2) Стратегический план действий на 2001-2005 гг. [32];
- 3) Стратегический план действий на 2004-2008 гг. [33];

- 4) Программа работы на 2009 год [34];
- 5) Стратегический план действий на 2010-2012 гг.[35];
- 6) Стратегический план действий на 2013-2018 гг. Ликвидации полиомиелита и «конец игры»[30];
- 7) Стратегия по завершению ликвидации полиомиелита на 2019–2023 гг. Ликвидация, интеграция, сертификация и контейнмент [36];
- 8) Стратегия ликвидации полиомиелита на 2022–2026 гг. Выполнение обещания [3].

Программы по ликвидации полиомиелита позволили добиться прогресса на пути к искоренению этой инфекции. Стратегия ликвидации полиомиелита на 2022–2026 гг. направлена на достижение двух основных целей:

- Цель 1 – навсегда прервать передачу всех полиовирусов в странах, эндемичных по дикому полиовирусу (ДПВ);
- Цель 2 – остановить передачу циркулирующего полиовируса вакцинного происхождения (цПВВП) и предотвратить вспышки в неэндемичных странах [3].

О ликвидации диких полиовирусов типа 2 и типа 3 (ДПВ2 и ДПВ3) было объявлено соответственно в 2015 и 2019 гг.[3]. Количество случаев заболевания диким полиовирусом типа 1 (ДПВ1) также многократно сократилось (Рисунок 1). К сентябрю 2022 года эндемичными странами по дикому полиовирусу (ДПВ) признаны две страны имеющие общую границу – Пакистан и Афганистан. Обе страны сталкиваются с препятствиями на пути искоренения этого заболевания [3].

Пакистан столкнулся с многочисленными проблемами в своей борьбе с полиомиелитом. Отсутствие надлежащего управления, геополитическая нестабильность, отсутствие безопасности, экстремизм, затрудненный доступ в отдаленные районы и, самое главное, многочисленные заблуждения широкой общественности относительно вакцины против полиомиелита - вот лишь некоторые из причин, по которым Пакистану не удалось искоренить полиомиелит. Некоторые мифы о вакцинации были довольно распространены в Пакистане. Например, было время, когда существовало определенное убеждение, что эта вакцинация может стерилизовать детей и что дети могут потерять свою фертильность. Кроме того, по-прежнему распространены мифы о том, что западные страны устанавливают микрочипы в форме вакцинации от полиомиелита. Имели место многочисленные инциденты, в которых бригады работников по борьбе с полиомиелитом погибали из-за неправильного представления людей о вакцине против полиомиелита [37]. В 2021 году в Пакистане был диагностирован один случай

заболевания паралитическим полиомиелитом, к сентябрю 2022 года число случаев возросло до 20. Согласно сообщениям, основными причинами роста числа случаев полиомиелита являются ложная маркировка, взяточничество и отказ широкой общественности сделать прививку своим детям. В Пакистане волонтеры по борьбе с полиомиелитом отмечают большой палец каждого ребенка, которого они вакцинируют, чтобы убедиться, что он получил дозу вакцины. Однако из-за манипуляций со стороны определенных племен непривитые дети получают ложную маркировку, гарантирующую системе здравоохранения в Пакистане, что они достигли своих ежегодных квот на вакцинацию каждого отдельного ребенка [37].

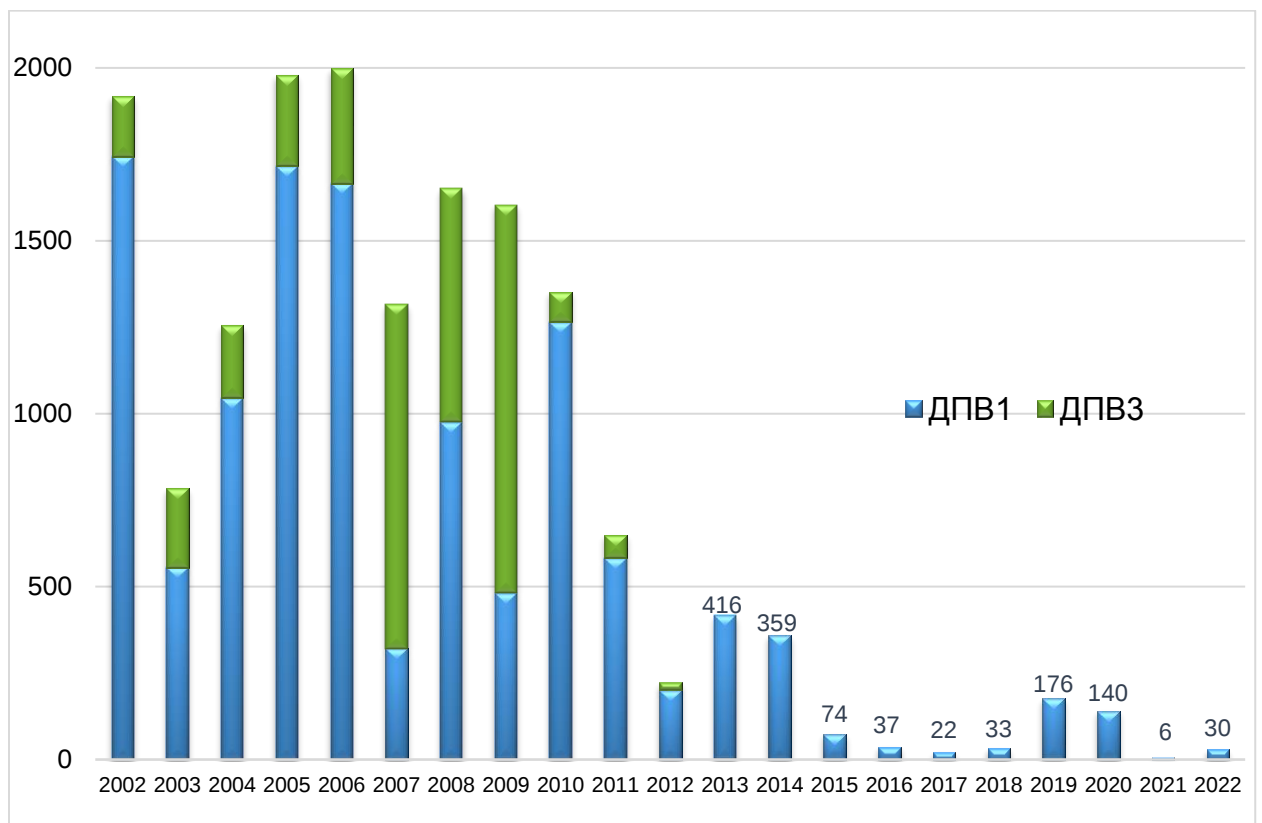


Рисунок 1 – Случаи заболевания диким полиовирусом по всему миру [Электронный ресурс. – Режим доступа: <https://polioeradication.org/polio-today/polio-now/wild-poliovirus-list/>. Дата доступа: 10.01.2023]

На протяжении многих лет Афганистан прилагал огромные усилия для полной ликвидации полиомиелита среди населения. Однако хрупкая система здравоохранения и ранее существовавшие социально-экономические и политические проблемы не позволяли достигнуть желаемого результата [38].

Для искоренения полиомиелита, каждый ребенок (в возрасте до 5 лет) в каждой семье должен быть вакцинирован, но миллионы детей в Афганистане по-прежнему не могут получить вакцину против полиомиелита по нескольким причинам. Введенный Талибами в 2018 году запрет на вакцинацию от полиомиелита "от двери до двери" привел к тому, что примерно 3-4 миллиона детей не были вакцинированы. Пандемия COVID-19 и политическая нестабильность усугубляют

эти проблемы. В течение первых 6 месяцев 2020 года программа вакцинации против полиомиелита была полностью прекращена из-за COVID-19 [38].

По состоянию на 8 ноября 2021 года движение «Талибан» приняло решение возобновить усилия по вакцинации от полиомиелита, включая прививки от полиомиелита по всей стране [38]. В 2020 и 2021 годах в Афганистане были диагностированы 56 и 4 случая заболевания паралитическим полиомиелитом соответственно, к январю 2023 года было зарегистрировано 2 случая. Усилия по налаживанию переговоров с движением "Талибан" привели к относительному прогрессу [38].

В августе 2020 года Африканский регион ВОЗ был сертифицирован в качестве свободного от ДПВ. Однако ДПВ1 был обнаружен в образцах у девочки в возрасте 3,5 лет, живущей в Лилонгве, Малави, у которой паралич начался в ноябре 2021 года. Это был первый случай дикого полиовируса в Африке более чем за пять лет. ДПВ1 был подтвержден в феврале 2022 года. Анализ геномных последовательностей показал, что штамм, обнаруженный в Малави, был генетически связан с полиовирусом, циркулирующим в провинции Синд, Пакистан, в течение 2019–2020 годов. Анализ числа нуклеотидных изменений от ближайшего вируса типа 1 из Пакистана, позволяет сделать вывод, что обнаруженный в Малави штамм вируса циркулировал в неизвестных местах в течение примерно 18 месяцев до его выявления [39,40]. В 2022 году было зарегистрировано 8 случаев ДПВ1. Выявленные штаммы вновь привели к штаммам ДПВ1 из Пакистана [41].

Появление случаев дикого полиовируса в Малави и Мозамбике подчеркивает тот факт, что дикий полиовирус по-прежнему имеет шанс распространиться за пределы афгано-пакистанского региона и что для его полного искоренения требуются постоянные усилия.

ДПВ 2 был ликвидирован в 1999 г. ВОЗ полагала, что с этого момента все случаи полиомиелита, связанные с полиовирусом этого типа, являются результатом применения ОПВ, в состав которой входят все три типа полиовируса. В связи с этим был предложен глобальный переход от трехвалентной пероральной полиомиелитной вакцины (тОПВ) к бивалентной ОПВ (бОПВ), содержащей только типы 1 и 3 [1,42]. В попытке снизить риски отмены ОПВ с 2014 года в странах, где ранее использовалась только ОПВ, в национальные графики иммунизации была включена ИПВ [43]. В 155 странах и территориях, где ранее осуществлялось использование тОПВ был осуществлен переход на применение бОПВ [1].

В период с 2016 по 2017 год передача циркулирующего полиовируса вакцинного происхождения типа 2 (цПВВП2) была ограничена только пятью странами: Демократической Республикой Конго, Нигерией, Пакистаном, Сомали и Сирией. Меры реагирования на вспышки

цПВВП2 были неравномерными. Было применено значительно больше моновалентной пероральной полиовакцины 2-го типа (мОПВ2), чем планировалось. Также наблюдался низкий охват плановой иммунизацией, низкий географический охват, также был отмечен дефицит в поставках вакцин. Все в совокупности привело к значительному учащению чрезвычайных ситуаций, связанных с полиовирусом типа 2 вакцинного происхождения (ПВВП2), и вспышек цПВВП2, по сравнению с прогнозами [3,43]. В 2020 году было выявлено 1082 случая цПВВП2 (Рисунок 2), а к 2023 году география полиомиелита была расширена (Рисунок 3).

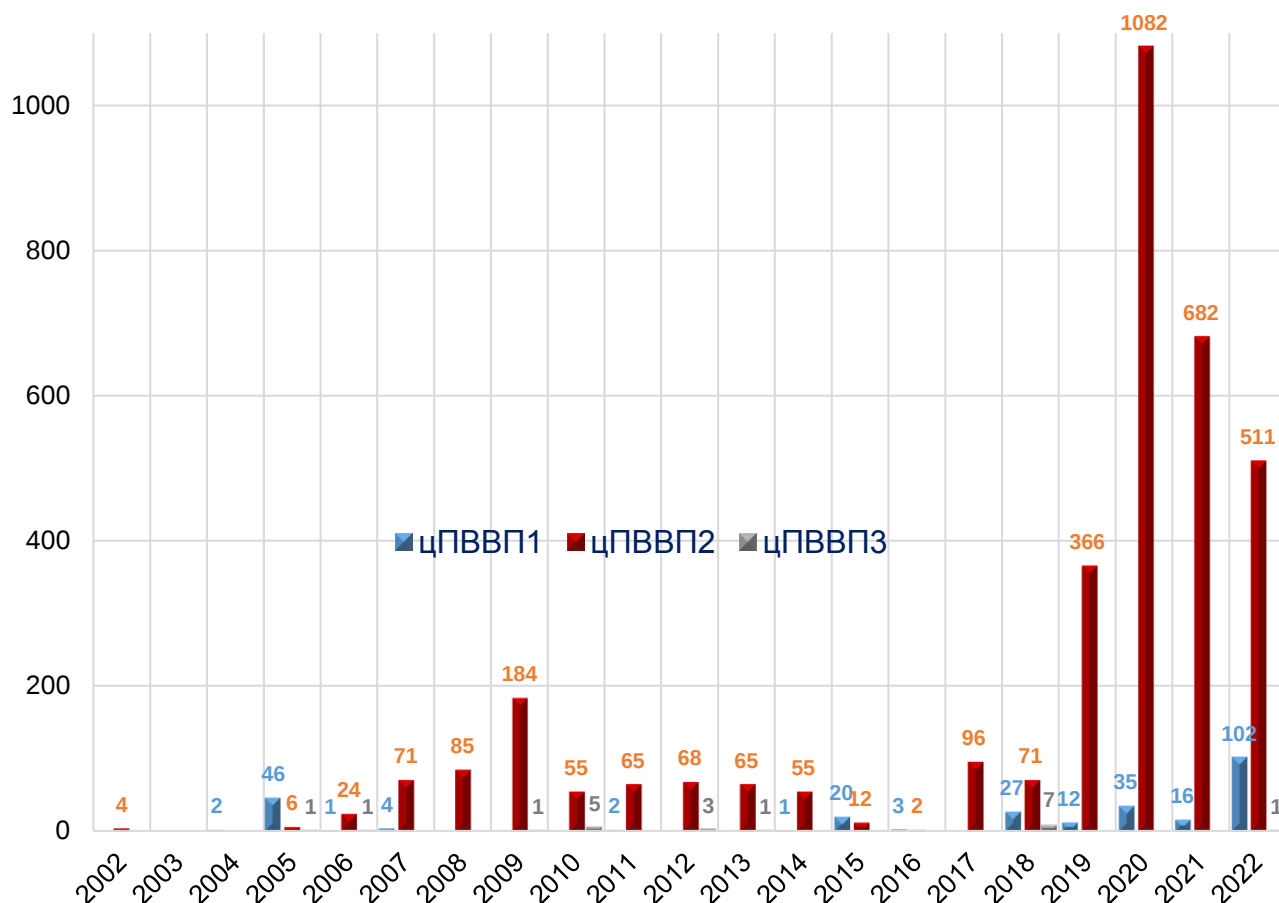


Рисунок 2 – Случаи циркуляции полиовируса вакцинного происхождения о всему миру, 2002–2022 [Электронный ресурс. – Режим доступа: <https://polioeradication.org/polio-today/polio-now/this-week/>. Дата доступа: 10.01.2023]

ГИЛП объявила 29 июля 2022 г. о недавнем обнаружении полиовируса типа 2 (генетически связанного с штаммом Сэбина типа 2) в сточных водах в Иерусалиме, Лондоне и Нью-Йорке. В июле у одного непривитого человека в Нью-Йорке развился полиомиелитный паралич. В штате Нью-Йорк сточные воды в округе Рокленд и Нью-Йорке в июне дали положительный результат на вирус; позже сточные воды округа Ориндж стали положительными, а в августе в сточных водах округа Салливан также был обнаружен вирус, демонстрирующий устойчивую передачу в течение нескольких недель. В Лондоне вакцинный вариант вируса

типа 2 обнаруживался неоднократно и непрерывно с февраля по июль, что также свидетельствует об устойчивой передаче [42].

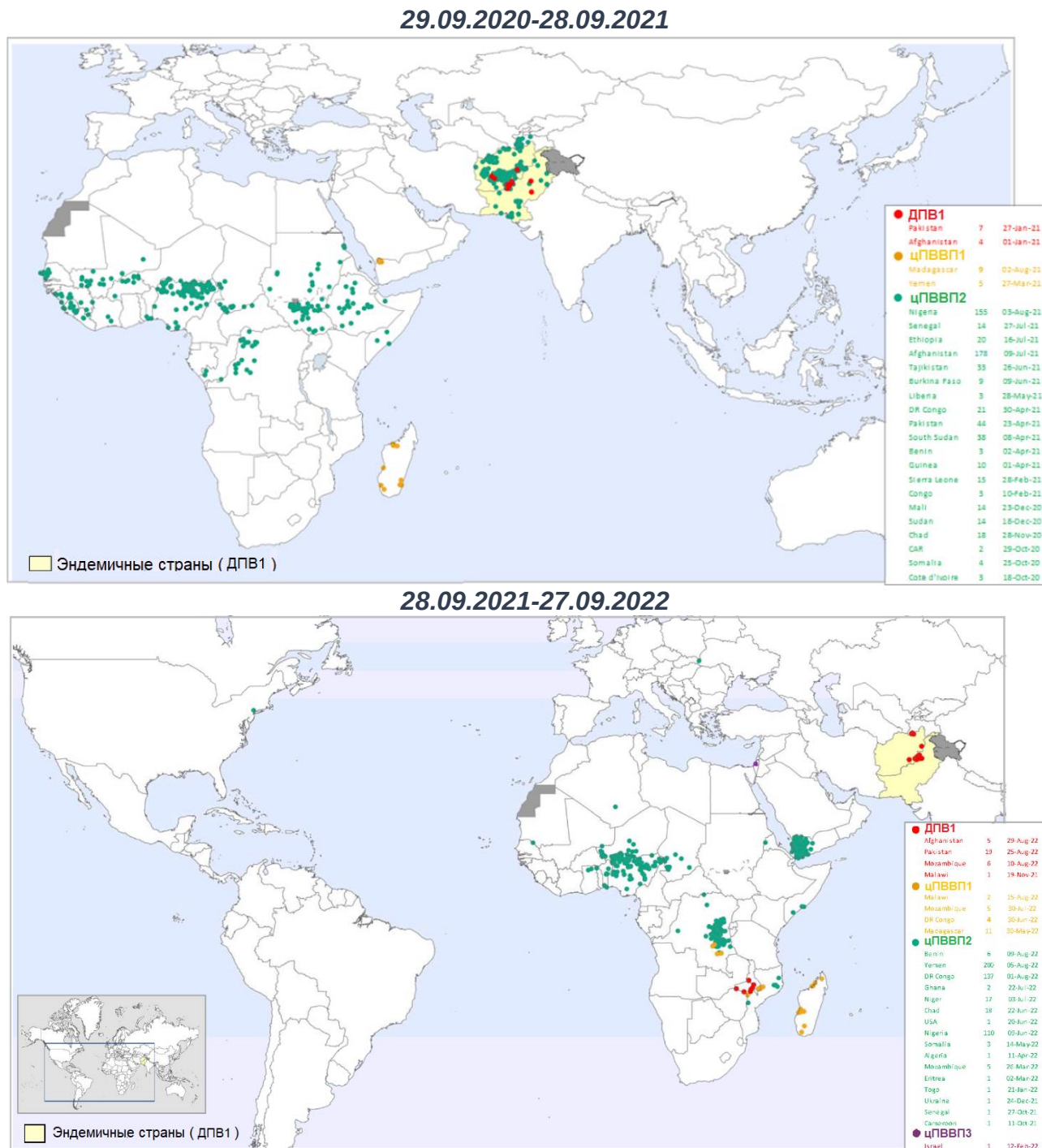


Рисунок 3 – Случаи дикого полиовируса и цПВВП по всему миру за 2020-2022 гг [Электронный ресурс. – Режим доступа: <https://polioeradication.org/polio-today/>. Дата доступа: 28.09.2021 и 27.09.2022]

Поскольку мОПВ2 не применяется в рамках плановой иммунизации в Израиле, Великобритании и США, завоз вируса типа 2 произошел из стран где недавно применялась мОПВ2 [42,44].

Для прекращения цПВВП2 Стратегией ликвидации полиомиелита на 2022–2026 гг. предусмотрено внедрение новой пероральной полиомиелитной вакцины 2-го типа (нОПВ2). Ожидается, что нОПВ1 и нОПВ3 станут доступны для иммунизации соответственно ко второму кварталу 2025 г. и первому кварталу 2026 г. при условии успешных результатов клинических исследований и внедрения в производство.

Однако, для предотвращения случаев ВАПП и ликвидации главной причины возникновения всех трех типов ВППВ потребуется исключение из графика иммунизации ОПВ. Таким образом, роль ИПВ и сИПВ в ликвидации полиомиелита возрастает [3].

1.4 Принципы производства инаktivированной вакцины против полиомиелита

Основы современной технологии производства инаktivированных вакцин против полиомиелита были заложены в 70-80-е года прошлого века [45], с тех пор общее ее описание не изменилось, однако существенные изменения, конечно, были внедрены.

Технологическую цепочку можно описать следующим образом (Рисунок 4):

- 1) Нарботка вирусной суспензии в культуре-продуcente. 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) Инаktivация вируса раствором формалина.
- 6) Формуляция вакцины. Сведение 3-х типов вируса [46–50].

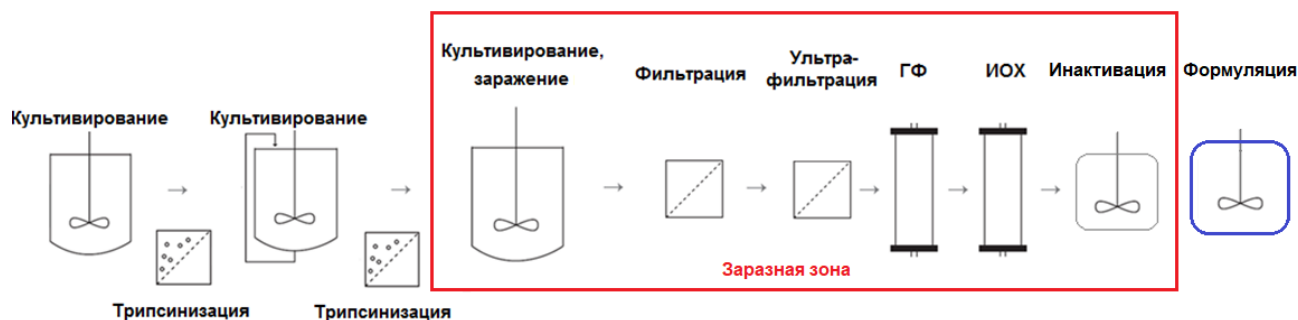


Рисунок 4 – Основные этапы производства инаktivированной вакцины против полиомиелита

1.4.1 Культивирование клеток

Благодаря способности вируса полиомиелита хорошо размножаться в культурах клеток, вызывая их гибель, основной принцип его получения для производства вакцин заключается в наработке культуры-продуцента, ее заражении необходимым штаммом вируса и сборе

вирусодержащей жидкости после гибели клеток.

Первоначально в производстве вакцин, как ОПВ, так и ИПВ, использовали первичную культуру клеток почек обезьян (зеленых мартышек). Однако основной культурой для наработки полиовирусной суспензии [51] является перевиваемая культура Vero – линия клеток, выделенная из эпителия почек зеленой африканской мартышки. Культура клеток Vero является платформой для производства множества противовирусных вакцин. Более 30 лет эта культура применяется для получения инактивированной полиовакцины [52,53]. Первичные культуры клеток обезьян по-прежнему используют для получения рабочих и мастер-банков посевных вирусов полиомиелита штаммов Сэбина ввиду того, что эти аттенуированные штаммы генетически остаются более стабильными после размножения на данной культуре, что критически важно при производстве живой вакцины.

В промышленном масштабе клетки Vero культивируют на микроносителях в биореакторах. Такой способ культивирования называется псевдосуспензионный. Микроносители обычно имеют размер 125 - 250 микрометров, а удельная плотность позволяет поддерживать их в суспензии при медленном перемешивании. Преимущества технологии с использованием микроносителей в вакцинной промышленности в целом заключаются в:

- 1) простоте масштабирования,
- 2) способности точно и постоянно контролировать условия роста клеток в сложных биореакторных системах,
- 3) общем уменьшении площади и объема инкубатора, требуемого для производства партии определенного объема,
- 4) радикальном сокращении ручного труда.

Как правило, перед заражением культуры происходит ее размножение в несколько этапов (2-3) на линейке биореакторов с возрастающим рабочим объемом. Наиболее часто используют биореакторы с рабочими объемами 10, 50, 200 и 1000 литров. Стандартной кратностью пересева является соотношение 1:4 – 1:5, однако, в зависимости от получаемого урожая клеток на «разгонных» биореакторах, кратность может быть увеличена. В большинстве литературных источников клетки Vero выращивают на микроносителе Cytodex 1 в концентрации 3-5 г/л, при посевной концентрации 60-200 тыс. кл/мл в питательной среде ЕМЕМ с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (5-10%) [48,49]. При этом одним из важнейших технологических процессов является пересев клеток с одного биореактора на другой, который осуществляется путем трипсинизации клеток с целью снятия их со старых микроносителей и перенесение суспензии в новый сосуд со свежим микроносителем. Данный процесс может

сопровождаться большими потерями клеточной массы и является технически и технологически довольно сложным ввиду необходимости промывать культуру клеток от остатков сыворотки, подбора оптимальной концентрации диспергентов и времени выдерживания в диспергенте. Наибольшие сложности имеются при осуществлении такой процедуры в больших промышленных масштабах. Существуют попытки исследователей упростить этот этап технологии путем поиска других способов пересева клеток со старых микроносителей на новые [54,55]. Исследователями были получены неплохие результаты на лабораторных объемах, но на практике такой подход не используется.

В последние годы исследователи пытаются усовершенствовать технологию выращивания клеток Vero с целью достижения больших концентраций клеток и, следовательно, большего выхода вирусных частиц. Недавно была описана оптимизация процесса культивирования клеток и вирусов [56]. Несколько методов культивирования клеток, а именно: периодическое, полупериодическое, перфузионное и рециркуляционное были протестированы на их способность увеличивать конечный урожай клеток. Также было оценено влияние процесса культивирования на выход вируса. Кроме того, эти исследования были проведены с использованием бессывороточной среды, свободной от компонентов животного происхождения (ACF - animal component free). Использование среды, свободной от животных компонентов, при стандартном периодическом культивировании может увеличить выход полиовируса приблизительно в 1,5 раза. Так, для штамма Сэбина тип 1 от 120 DU/мл (среда культивирования клеток содержала сыворотку) до 175 DU/мл (среда ACF без сыворотки) [49,56]. Для культивирования клеточных линий при производстве инактивированных вакцин часто используют питательные среды с добавлением сыворотки крови коров. Таким образом, в составе вирусодержащей жидкости, помимо белков клеток-продуцентов, находятся различные белки сывороточного происхождения и производные питательной среды. Всё это приводит к увеличению концентрации общего белка в вирусодержащей жидкости [57]. Использование безсывороточных сред позволило бы снизить содержание общего белка в вирусодержащей жидкости.

Всеобщая тенденция к переходу на биореакторы, работающие по одноразовой технологии, коснулась и вакцин против полиомиелита. Культуру клеток Vero, растущую на микроносителях, успешно выращивают на разнообразных биореакторах с волнообразным перемешиванием и классическим перемешиванием внутри одноразовых мешков [55,58]. Такие системы имеют существенные преимущества с технологической точки зрения: более простое обслуживание, отсутствие необходимости очистки, стандартизация операций, большая безопасность. Однако стоимость продукта при использовании одноразовых биореакторов может вырасти ввиду повышения затрат на расходные материалы.

1.4.2 Культивирование вируса полиомиелита

После выращивания необходимой концентрации клеток их подвергают заражению полиовирусом. При этом проводят смену среды культивирования на поддерживающую, телячью сыворотку при этом не добавляют. Для более полного удаления сыворотки используют также промывку клеток буферным раствором. Промывку используют для приготовления вирусной суспензии при производстве инактивированных вакцин, так как бычий сывороточный альбумин (БСА) и другие белки сыворотки могут существенно осложнить процесс дальнейшей хроматографической очистки продукта. Содержание БСА жестко контролируется и в полученной вакцине его концентрация не может быть выше 30-50 нг в дозе. Кроме того, балластные белки сыворотки могут нарушить процесс инактивации, экранируя вирусные частицы. Атенуированные штаммы Сэбина культивируют при пониженной температуре (32-34 °С) с целью не допустить их реверсию в процессе культивирования к нейровирулентным мутантам, что происходит при 37°C [49]. Температура процесса размножения атенуированного вируса полиомиелита должна жестко контролироваться.

Доза заражения клеток может варьироваться от 0,01 до 0,1 ТЦД₅₀/кл. При больших объемах получения продукта и высоких концентрациях клеток в биореакторах необходим большой запас рабочего банка посевного вируса.

Сбор вирусной суспензии производят после полной дегенерации клеточного монослоя.

Масштабирование культивирования вируса напрямую зависит от масштабирования процесса культивирования клеток Vero. При переходе от меньшего объема к большему инфицирование клеток происходит в концевом биореакторе технологической цепочки.

1.4.3 Фильтрация и ультрафильтрация

Для первого этапа очистки вирусосодержащей жидкости от вышеперечисленных технологических примесей применяют осветляющую фильтрацию. Подбор фильтров осуществляют исходя из концентрации общего белка в вирусосодержащей жидкости, а также с учётом размера вируса.

Одним из этапов производства инактивированной вакцины против полиомиелита является концентрирование вируса полиомиелита при помощи тангенциальной ультрафильтрации. При этом выбор мембран с подходящим отсечением позволяет существенно уменьшить белковую нагрузку на следующих этапах очистки [57].

Процесс ультрафильтрации может быть легко масштабируем от лабораторного до полупромышленного и промышленного производства за счет использования мембран большей площади и автоматизированных установок.

Традиционно, как в условиях лаборатории, так и в условиях промышленного производства для концентрирования вируса полиомиелита используют ультрафильтрационные мембраны с отсечением в 100 кДа [50,59].

1.4.4 Хроматографическая очистка: гель-фильтрация и ионообменная хроматография

В настоящее время при производстве инактивированной вакцины против полиомиелита применяют два этапа хроматографических очисток: ГФ и ИОХ [45,49]. ГФ — разновидность хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При проведении хроматографической очистки первыми элюируются из колонки наиболее крупные молекулы (высокомолекулярные соединения), не проникающие или проникающие в минимальное количество пор неподвижной фазы. Последними элюируются вещества с малыми размерами молекул (низкомолекулярные соединения), свободно проникающие в поры. В ГФ используются химически инертные сорбенты, которые не взаимодействуют с разделяемыми веществами. Таким образом, ГФ на первом этапе хроматографической очистки концентрата вируса полиомиелита позволяет отделить высокомолекулярную фракцию, содержащую цельный вирус полиомиелита от фракции основных загрязнителей – балластных белков и компонентов питательной среды. Основными преимуществами ГФ являются низкая стоимость сорбентов и простота в эксплуатации благодаря изократическому режиму и простой очистке сорбента. При необходимости можно проводить несколько циклов ГФ подряд без проведения очистки сорбента, благодаря тому, что неподвижная фаза инертна. Кроме того, срок эксплуатации сорбента для ГФ существенно больше в сравнении с сорбентами для ИОХ или для аффинной хроматографии [60].

ГФ позволяет существенно сократить содержание балластных белков, но этого не всегда достаточно для обеспечения приемлемого уровня очистки от остаточной клеточной ДНК. Нет однозначных данных об онкогенном потенциале клеточной линии Vero. Результаты одних исследований говорят о потенциальной онкогенной эволюции клеток Vero, проявляемых *in vitro*, начиная уже со 131 пассажа, в то время как другие – об отсутствии онкогенных признаков вплоть до 160 пассажа [61]. ВОЗ допускает использование клеток аттестованных банков культуры Vero до 150 пассажа [62]. Содержание остаточной ДНК клеток-продуцентов не должно превышать 10 нг в разовой дозе, рекомендованной для человека [63]. Такое низкое содержание остаточной клеточной ДНК требует включения специальной стадии очистки вакцинного препарата – ИОХ.

В ИОХ разделение компонентов смеси достигается за счет обратимого взаимодействия ионизирующихся веществ с ионными группами сорбента. Стадия ИОХ позволяет очистить концентрат вируса полиомиелита от бычьего сывороточного альбумина, остаточной клеточной

ДНК, балластных белков, оставшихся после ГФ и от бактериальных эндотоксинов. К недостаткам ИОХ можно отнести высокую стоимость сорбента и необходимость его регенерации после каждой очистки концентрата вируса полиомиелита, что сказывается на сроке эксплуатации сорбента и неизбежности его замены [60].

Хроматографическая очистка требует тщательного подбора неподвижной фазы – сорбента и подвижной фазы – буферного раствора, которые в свою очередь должны обеспечивать сохранение целостности и биологической активности вирионов. С одной стороны, оба этапа хроматографической очистки должны обеспечить требуемую степень чистоты концентрата вируса. С другой стороны, каждый этап технологического процесса производства неизбежно сопровождается потерями. Поэтому степень очистки должна быть сбалансирована с производительностью в целях экономии издержек производства [60].

Хроматографические методы очистки применяются на многих биофармацевтических производствах. Благодаря этому имеется широкий ассортимент хроматографических комплексов и хроматографических колонн различной конфигурации, что в свою очередь позволяет легко масштабировать производство от лабораторного до маломасштабного и затем до полномасштабных производств. Как правило, один и тот же производитель хроматографического оборудования может предложить полностью хроматографические комплексы, предназначенные для разработки и оптимизации лабораторной технологии с использованием небольших лабораторных хроматографических колонок, и хроматографические комплексы, предназначенные для масштабирования процессов очистки с использованием промышленных колонн [60].

За прошедшие 40 лет написано множество публикаций по сИПВ. Несмотря на это, мало проработанными аспектами остаются процессы очистки полуфабрикатов сИПВ. В публикациях Y. Thomassen et.al упоминается, что в качестве сорбента для гель-фильтрации применялся сорбент Sepharose CL-6B (GE Healthcare) [48,49] и в качестве сорбента для ионообменной хроматографии был использован сорбент DEAE-Sephadex A50 (GE Healthcare) [48] или DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) [49]. В качестве элюирующего раствора в обоих случаях применялся фосфатный буферный раствор (pH=7,0) [48,49]. В исследованиях B. Simizu et.al очистку концентрированного вируса проводили с помощью гель-фильтрации на сорбенте DEAE Sepharose CL- 6B (Pharmacia Biotech), в качестве элюирующего раствора применялся 0.1 М фосфатный буферный раствор [46]. Тем не менее, в публикациях не приводятся такие условия проведения хроматографических очисток как 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 и технологичных процессов очистки полуфабрикатов сИПВ по-прежнему актуальная тема исследований.

1.4.5 Инактивация вируса раствором формалина

Очищенные концентраты полиовируса инактивируют раствором формалина (в разведении 1:4000) [46,49]. На этой стадии также к концентрату полиовируса для стабилизации добавляют среду М199. Перед инактивацией устанавливают рН раствора на уровне $7,0 \pm 0,2$ и проводят стерилизующую фильтрацию с использованием фильтров с размером пор 0,22 мкм [49]. Инактивацию проводят 12-13 дней при температуре 37°C [46,49]. В середине инактивации (через 6-8 дней) проводят промежуточную фильтрацию (0,22 мкм), чтобы удалить возможные не полностью инаktivированные агрегаты полиовируса и таким образом обеспечить полную инактивацию. В конце инактивации также проводят стерилизующую фильтрацию. Полученные инаktivированные очищенные концентраты полиовируса хранят при температуре 2-8°C до сведения и розлива готовой лекарственной формы [49].

1.5 Производство инаktivированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина в мире

Одной из стадий производства ИПВ является культивирование диких штаммов вируса полиомиелита в промышленных масштабах [103]. Это влечет за собой риск непреднамеренного или преднамеренного выброса вируса в окружающую среду или человеческую популяцию. Так, например, в 2014 году в результате ошибки сотрудника фармацевтической компании GlaxoSmithKline произошел сброс в канализационную систему 45 литров концентрированной вирусной суспензии живого дикого полиовируса типа 3 (штамм Saukett). После очистных сооружений жидкость попала в реку Ласне [64]. В 2017 году в Нидерландах был инфицирован диким полиовирусом типа 2 (штамм MEF-1) оператор фармацевтического производства [65]. В настоящее время в качестве потенциальных источников распространения диких штаммов полиовирусов в регионах, свободных от их циркуляции, выступают фирмы-производители ИПВ. Помимо применяемой на сегодняшний день ИПВ, изготовленной из высоко вирулентных штаммов Mahoney (тип 1), MEF-1 (тип 2) и Saukett (тип 3), применяется также сИПВ. Использование альтернативных штаммов в производстве ИПВ, например, вакцинных штаммов Сэбина, позволит исключить такую опасность в эпоху ликвидации полиомиелита. Использование аттенуированных штаммов Сэбина обеспечивает дополнительную безопасность при производстве вакцин. Поэтому ВОЗ также поощряет производство сИПВ с учетом вопросов социальной безопасности и поставок ИПВ после ликвидации полиомиелита [45]. Также производство сИПВ позволит в кратчайшие сроки возобновить производство ОПВ, если возникнет в этом необходимость [66].

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 в США [4]. С этого момента начинаются исследования и разработки по совершенствованию технологии производства сИПВ [45,47,67], проводятся клинические исследования сИПВ без адъювантов, с адъювантами и в составе комбинированных вакцин [68–71].

В Японии разработка сИПВ была начата в 1970-х г. в Японском научно-исследовательском институте полиомиелита (the Japan Poliomyelitis Research Institute (JPRI)) [47]. Институт был единственным производителем ОПВ в Японии. Альберт Сэбин лично внес свой вклад в производство ОПВ в Японии, передав один из аттенуированных штаммов в марте 1963 года [72]. В Японии с ноября 2012 года в программу рутинной иммунизации включена первая в мире лицензированная сИПВ [5]. Применение сИПВ на протяжении более 5 лет продемонстрировало ее эффективность [73]. Исследовательский фонд по инфекционным заболеваниям Университета Осака (Бикен, Япония) учредил программу передачи технологий производства сИПВ с Индонезией и Вьетнамом [74].

Институт медицинской биологии Китайской академии медицинских наук является лицензированным производителем сИПВ. При производстве сИПВ была выбрана технология культивирования клеток Vero (P134 10-87, European Collection of Cell Cultures) в 550-литровом биореакторе. Были использованы штаммы Сэбина типа 1 и типа 2 и штамм RSO2 типа 3 (Pfizer) [46,69]. Третья фаза клинических исследований проводилась с 2012 по 2014 года. Исследования по иммунизации с помощью сИПВ среди детей в возрасте 2, 3 и 4 месяцев показали частоту сероконверсии 100% против трех серотипов полиовируса [69].

В 2008 году ВОЗ создала центр передачи технологий производства сИПВ в Intravacc (the Institute for Translational Vaccinology, Билтховен, Нидерланды). Интерес проявили производители из Китая и Кореи [74].

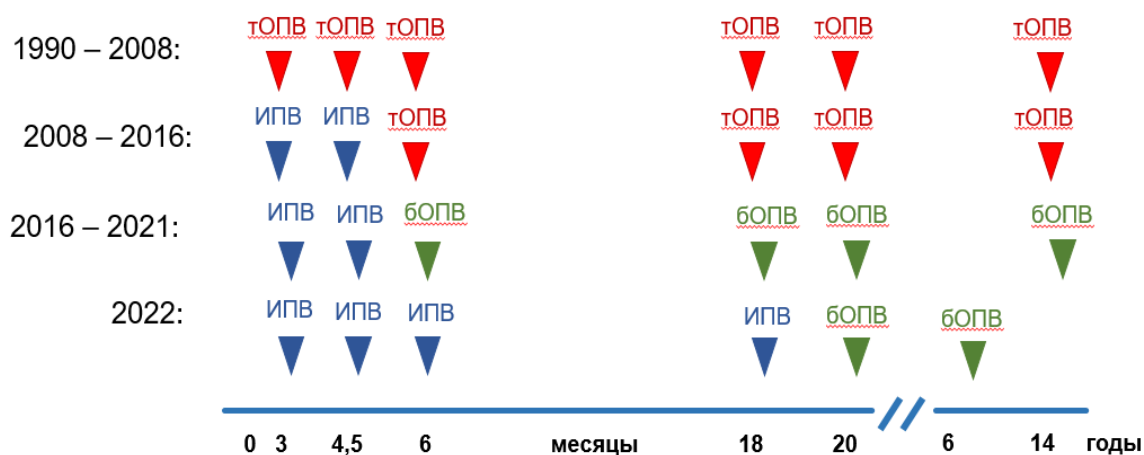
В 2014 г. один из ведущих поставщиков биофармацевтической продукции в Китае Sinovac Biotech объявил о заключении лицензионного соглашения с Intravacc для разработки и коммерциализации сИПВ для распространения в Китае и в других странах. Третья фаза клинических исследований проходила с августа 2017 года по январь 2018 года. Исследования по иммунизации с помощью сИПВ показали частоту сероконверсии 98,0% против полиовируса типа 1, 94,8% против типа 2 и 98,9% против типа 3. Частота сероконверсии была выше в группе сИПВ, чем в группе ИПВ против всех трех типов. Исследования по иммунизации с помощью ИПВ показали частоту сероконверсии 94,1% против типа 1, 84,0% против типа 2 и 97,7% против типа 3 [75].

Компания LG Chem, Ltd (Сеул, Республика Корея) приняла технологию от Intravacc для разработки нового сИПВ (LBVC) в рамках своей программы клинических исследований. Клинические исследования были проведены в нескольких центрах в Таиланде и Филиппинах. Показатели сероконверсии для штаммов Сэбина и диких штаммов трех серотипов составили от 95,8% до 99,2% в группе сИПВ и от 94,8% до 100% в группе ИПВ [76].

В России первые экспериментальные серии сИПВ были получены в 2015 году в ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П.Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) [67]. Использование современных технологий, таких как культивирование на микроносителях в одноразовых биореакторах, позволило повысить выход вирусных частиц, а разработка высокоэффективных процессов очистки полуфабрикатов сИПВ, описанных в данной диссертационной работе, позволила сократить потери на этапах хроматографических очисток, в результате была разработана технология производства российской сИПВ. Вакцина ПолиовакСин (вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая из аттенуированных штаммов Сэбина) была зарегистрирована в 2021 году (Регистрационное удостоверение ЛП-007478, 07.10.2021).

1.6 Вакцины для профилактики полиомиелита в России

1.6.1 Национальный календарь профилактических прививок России



тОПВ – трехвалентная пероральная вакцина против полиомиелита

ИПВ – инактивированная вакцина против полиомиелита

бОПВ – бивалентная пероральная вакцина против полиомиелита

Рисунок 5 – Национальный календарь профилактических прививок России. Вакцинация против полиомиелита

Национальный календарь профилактических прививок России с 2008 года предусматривал иммунизацию против полиомиелита с помощью последовательного введения ИПВ, две аппликации в возрасте 3 и 4,5 месяцев, и тОПВ, четыре аппликации в возрасте 6, 18 и

20 месяцев и в возрасте 14 лет [1]. С 2016 года тОПВ была заменена на бОПВ. В 2022 году в национальный календарь профилактических прививок России вновь были внесены изменения. Возраст введения шестой последней вакцины изменен с 14 лет на 6 лет и первые четыре вакцинации проводятся ИПВ (Рисунок 5) [2]. Таким образом, потребности страны в ИПВ возросли вдвое.

1.6.2 Зарегистрированные в России вакцины против полиомиелита

По состоянию на январь 2023 года в России зарегистрировано несколько вакцин для профилактики полиомиелита.

ОПВ:

- БиВак полио (Вакцина полиомиелитная пероральная, двухвалентная, живая аттенуированная 1, 3 типов);
- МоноВак полио тип 2 (Вакцина полиомиелитная пероральная, моновалентная, живая аттенуированная 2 типа);
- Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2, 3 типов [77]

ИПВ:

- ПОЛИМИЛЕКС вакцина для профилактики полиомиелита инактивированная;
- ПолиовакСин (Вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая из аттенуированных штаммов Сэбина) [77].

Комбинированные вакцины:

- Инфанрикс Гекса (Вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), полиомиелита (инактивированная), гепатита В комбинированная, адсорбированная в комплексе с вакциной для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b конъюгированной, адсорбированной);
- Пентаксим (вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная и инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* тип b, конъюгированная) [77].

В России во ФГАНУ «ФНЦИРИП им.М.П.Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) налажен полный цикл производства ОПВ, бОПВ и мОПВ2. До регистрации инактивированной вакцины против полиомиелита ПолиовакСин в России отсутствовало производство ИПВ полного цикла.

1.6.3 Комбинированные вакцины

Вакцинация по-прежнему остается наиболее эффективной и экономичной мерой профилактики инфекционных заболеваний. Эффективность вакцинации находится в прямой зависимости от качества проведения вакцинации. Требуется достижение необходимого уровня охвата прививками и очень важно соблюдение сроков вакцинации. Формируемый иммунитет зависит от своевременного проведения прививок. В России наблюдается существенная проблема с соблюдением своевременности проведения прививок у детей в возрасте до 12 месяцев [78]. Согласно Национальному календарю профилактических прививок каждый ребенок до 18 месяцев может получить до 20 инъекций моновакцин. Для обеспечения своевременности получения прививок, в таком случае, за один визит врач должен сделать ребенку 4 укола. В действительности, как правило, ребенок получает не более 2 вакцин за визит. Это приводит к нарушению графика вакцинации, увеличивает количество отказов, что, в свою очередь, приводит к снижению коллективного иммунитета [79]. Одним из наиболее эффективных способов решения этой проблемы может стать широкое использование в профилактической медицине комбинированных вакцин. Всемирная организация здравоохранения разделила комбинированные вакцины на два типа:

- 1) вакцины, содержащие разные штаммы или серотипы одного и того же возбудителя, предотвращающие одно инфекционное заболевание [80], например, вакцины против полиомиелита (ПолиовакСин и БиВак);
- 2) вакцины, содержащие антигены нескольких возбудителей в одном препарате и, соответственно, защищающие от вызываемых ими заболеваний [80], например, шестивалентная вакцина Инфанрикс Гекса против дифтерии, коклюша, столбняка, полиомиелита, гемофильной инфекции и гепатита В [81].

Возможность оперативного и одномоментного проведения такими вакцинами профилактических прививок от нескольких инфекционных агентов обеспечивает не только высокий охват населения, но и дает существенный экономический результат [78,80,82,83].

Комбинированные вакцины, одним из компонентов которых является ИПВ, применяются много лет. В проводимых исследованиях был показан высокий уровень серопротекции против полиовируса типов 1, 2 и 3 [79,81]. В Японии комбинированная вакцина для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша с СИПВ была введена в национальную программу иммунизации в ноябре 2012 года [84]. Учеными из Китая в 2022 году была опубликована статья об успешных доклинических испытаниях пятивалентной вакцины против коклюша, дифтерии, столбняка, полиомиелита (СИПВ) и гемофильной палочки типа В [85]. В России производство

комбинированных вакцин, в состав которых входит ИПВ, от субстанции до готовой лекарственной формы не налажено. Однако в 2021 году в России были зарегистрированы три фармацевтические субстанции:

— МоноПолио 1 (Очищенный инактивированный моновалентный концентрат вируса полиомиелита 1 типа), промежуточный продукт для производства препарата «Вакцина для профилактики полиомиелита»;

— МоноПолио 2 (Очищенный инактивированный моновалентный концентрат вируса полиомиелита 2 типа), промежуточный продукт для производства препарата «Вакцина для профилактики полиомиелита»;

— МоноПолио 3 (Очищенный инактивированный моновалентный концентрат вируса полиомиелита 3 типа), промежуточный продукт для производства препарата «Вакцина для профилактики полиомиелита» [77].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Клетки и вирусы

В качестве клеточной системы использовали культуру клеток линии Vero. Партии культуры-продуцента готовили из клеточного пула аттестованного рабочего банка клеток Vero (РБК Vero 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 Нер-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»), с добавлением 5%-ной сыворотки крови эмбрионов коров («Биолот», Россия), стрептомицина (0,1 мг/мл) и пенициллина (100 ед/мл) (PanEco, Москва, 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-продуцента из пула аттестованного рабочего банка клеток, 2) наработка вирусных суспензий каждого из трех серотипов полиовируса на культуре-продуценте, 3) фильтрация и концентрирование полученных вирусных суспензий, 4) хроматографические очистки вирусных концентратов (ГФ и ИОХ), 5) инаktivация формалином, 6) сведение и розлив трехвалентного препарата, 7) контроль качества, включая контроль на специфическую активность и безопасность [45,47–50].

Наработка партий культуры-продуцента из пула аттестованного рабочего банка клеток, наработка вирусных суспензий каждого из трех типов полиовируса на культуре-продуценте, фильтрация и концентрирование полученных вирусных суспензий были выполнены в сотрудничестве со специалистами отдела разработки и внедрения инновационных и полупромышленных технологий под руководством Ивина Юрия Юрьевича и Ковпак Анастасии Александровны.

2.2.1 Нарabотка партий культуры-продуцента 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 Stedim Biotech) 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 нейлоновых 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 Stedim Biotech) через мембраны из полиэфирсульфона с границами отсечения 50 кДа или 100 кДа (Sartorius Stedim Biotech). В случае малого объема вирусосодержащей жидкости финальное концентрирование проводили на кассетах тангенциальной фильтрации (Vivaflow 200, Sartorius Stedim Biotech) с мембранами из полиэфирсульфона с границами отсечения 100 кДа (Sartorius Stedim Biotech).

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. Для оценки эффективности колонок проводили ацетоновый тест: в качестве анализа использовали 1%-ный водный раствор ацетона, в качестве подвижной фазы использовали воду для инъекций. 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. Регенерацию колонок проводили путем обработки 1М раствором гидроксида натрия и 2М раствором натрия хлорида до и после очистки концентрата полиовируса в течение 1 часа каждым реагентом. Стерилизацию колонок проводили 4%-ным раствором формалина. 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 инаktivировали 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). Инаktivацию проводили при 37 ± 1 °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 содержание 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 гидrolитического 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. Определение титра вируса и концентрации D-антигена, содержания остаточной клеточной ДНК, общего белка, вирусной РНК и вирусного структурного белка VP2 были выполнены в сотрудничестве со специалистами отдела разработки и внедрения инновационных и полупромышленных технологий под руководством Шишовой Анны Андреевны.

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) [19]. В состав набора входили антитела IgY к полиовирусам штаммов Сэбина трех серотипов. Куриные антитела IgY к одному из трех серотипов полиовируса штаммов Сэбина, иммобилизовали на поверхность лунок иммунопанелей в 0,01 М карбонат-гидрокарбонатном буферном растворе в концентрации 20 мкг/мл в течение не менее 18 часов при

+4 °С. Промывку планшетов на каждой стадии осуществляли на приборе BioRad (вошер), инкубацию проводили в термостате при +37°С в течение 1 часа. Для блокирования свободных сайтов использовали 0,02 М фосфатный буферный раствор с 1% эмбриональной телячьей сывороткой (производитель – Gibco). Для проведения исследования в лунки вносили трехкратные разведения анализа в ИФА-буфере, содержащем 0,02 М фосфатный буферный раствор, 0,05% полисорбата 20 (Sigma), 1% эмбриональную телячью сыворотку (Gibco). После инкубации и промывки в лунки планшета вносили сыворотку кролика с поликлональными антителами к полиовирусу в ИФА-буфере (производство - ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)). Для детекции использовали кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma). После инкубации и промывки в лунки вносили антитела. После инкубации и промывки в лунки планшета вносили субстрат ТМБ (Sigma) и выдерживали 15 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Реакцию останавливали добавлением 45 мкл 2М серной кислоты и измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм.

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 [86].

Для получения достоверных результатов контроля использовали отраслевой стандартный образец бычьего сывороточного альбумина (ОСО БСА) (ОСО 42-28-323-2017, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) «Для определения содержания белка по Лоури». ОСО БСА использовали для построения калибровочного графика. Готовили последовательные разведения ОСО БСА 5-300 мкг/мл. Испытуемые образцы предварительно разводили при необходимости.

В 96-луночный планшет добавляли по 30,6 мкл калибровочного раствора, испытуемые образцы, положительный и отрицательный контроли. Затем во все лунки с образцами вносили по 154 мкл реактива В (приготовление реактива В выполняли согласно ОФС «Определение белка» (Метод Лоури, Метод А)) и перемешивали в течение 10 минут на шейкере. Во все лунки добавляли по 15,4 мкл 1М реактива Фолина, перемешивали пипетированием 5 раз. Инкубация в течение 30 минут в темноте. Считывали сигнал на спектрофотометре или фотометре при длине волны 750 нм.

Строили калибровочную кривую зависимости концентрации общего белка (5 - 300 мкг/мл) от оптической плотности с учетом фона. По полученному графику зависимости концентрации общего белка (5 - 300 мкг/мл) от оптической плотности рассчитывали концентрацию общего белка в пробах испытуемых образцов.

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.

Для выделения РНК отбирали пробы объемом 250 мкл из полученных в ходе ГФ фракций. К каждой пробе добавляли 750 мкл реагента TRI-Reagent (Sigma), интенсивно перемешивали 15 сек, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и добавляли 200 мкл хлороформа. Смесь интенсивно перемешивали 15 сек и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Смесь центрифугировали (15 мин, 12000 об/мин), отбирали верхнюю водную фракцию, добавляли к ней 500 мкл изопропанола и инкубировали 5 мин при минус 20°C. РНК осаждали центрифугированием (15 мин, 12000 об/мин), осадок промывали 80% этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 20 мкл деионизированной воды.

Выделенную РНК анализировали методом электрофореза в 1 %-ном агарозном геле в буфере TBE (90 мМ Трис-борная кислота pH 8,0, 1 мМ ЭДТА), содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия.

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 [87]).

Титр вируса определяли с помощью ТЦД₅₀-тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток. Готовили серийные (10-ти кратные) разведения вирусной суспензии в питательной среде ДМЕМ. Суспензию клеток Нер-2 (Cincinnati) с содержанием $1-2 \times 10^5$ клеток в 1 мл добавляли во все лунки 96-луночной панели по 100 мкл. К клеткам добавляли по 100 мкл вирусной суспензии рабочего разведения. В лунки, предназначенные для контроля культуры клеток, вместо вирусной суспензии добавляли питательную среду ДМЕМ по 100 мкл. Проводили ежедневное микроскопирование лунок для контроля за появлением и развитием цитопатического эффекта и регистрировали результаты на 5-7 день. Тест считали действительным при образовании в лунках контроля сплошного монослоя нормальных клеток.

2.3.5 Определение содержания структурного белка VP2 полиовируса

Содержание структурного белка VP2 полиовируса определяли методом иммуноблоттинга при помощи специфичных поликлональных кроличьих антител.

К пробе объемом 200 мкл добавляли 200 мкл 2-кратного буфера для образцов (20% глицерина, 100мМ Трис-HCl (pH=6,8), 200 мМ β -мекаптоэтанола, 2% раствор лаурилсульфата натрия, бромфеноловый синий 0,01%), тщательно перемешивали и инкубировали при 95°C 5 минут. Готовые пробы подвергали электрофорезу по методу Лэмли (ОФС.1.2.3.0023.15. Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том I) [88]. Разделённые в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad). Мембрану блокировали в буфере для блокировки (50 мМ Трис-буфер pH=7,6, 150 мМ натрия хлорида, 0,05% твин-20, 5% сухое обезжиренное молоко) в течение 1 часа. Затем в буфер для блокировки добавляли кроличьи поликлональные антитела к капсидному белку VP2 полиовируса, полученные во ФГАНУ «ФНЦИРИП им.М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), в разведении 1:400. После инкубации с первичными антителами мембрану промывали 3 раза по 5 мин в буфере для блокировки без молока и помещали на 1 ч в раствор вторичных антител (anti-Rabbit IgG, Promega) в буфере для блокировки, в разведении 1:2500. Затем мембрану промывали 3 раза по 5 мин в буфере для блокировки без молока и визуализировали с помощью набора реактивов ECL-Plus (Cytiva) согласно рекомендациям производителя. Хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку [89].

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). Для этого готовили реакционную смесь следующего состава: вода - 11,2 мкл; dNTP mix 2,5 мМ - 2,5 мкл; MgCl₂ 25 мМ - 2,5 мкл; 10 × ПЦР буфер 5 мкл; прямой и обратный праймер (Евроген, Москва) 10 пкмоль/мл по 0,5 мкл; зонд Р 10 пкмоль/мл 0,1 мкл; Taq-полимераза 0,2 мкл.

После чего реакционную смесь тщательно перемешивали, сбрасывали капли с помощью короткого центрифугирования и помещали пробирки с реакционной смесью в систему для ПЦР в реальном времени QuantStudio 5 Real-Time. При работе использовали канал детекции флуоресценции для красителя FAM. ПЦР проводили по следующему протоколу: 1) экспозиция 6 мин при 95°C; 2) проведение 40 реакционных циклов: 95°C – 20 сек, 60°C – 40 мин.

По значениям, полученным для стандартного образца (контрольный образец геномной ДНК с концентрацией 1 мкг/мл (1000000 пг/мл)), строили калибровочную кривую зависимости

десятичного логарифма концентрации ДНК от величины порогового цикла. По полученному графику зависимости рассчитывали значения концентрации остаточной клеточной ДНК для исследуемых препаратов.

2.3.7 Определение содержания белков клеток Vero

Содержание белков клеток Vero в вирусных препаратах определяли методом иммуноблоттинга при помощи специфичных антител.

К пробе объемом 200 мкл добавляли 200 мкл 2-кратного буфера для образцов (20% глицерина, 100мМ Трис-НСl (рН 6,8), 200 мМ β - меркаптоэтанол, 2% раствор лаурилсульфата натрия, бромфеноловый синий 0,01%), тщательно перемешивали и инкубировали при 95 °С 5 мин. Готовые пробы подвергали электрофорезу по методу Лэмли (ОФС.1.2.3.0023.15. Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том I) [88]. Разделённые в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США). Свободные сайты на мембране блокировали в буфере с сухим обезжиренным молоком (50 мМ Трис-буфер рН 7,6, 150 мМ натрия хлорида, 0,05% твин-20, 5% сухое обезжиренное молоко) в течение 1 ч. Затем в буфер для блокировки добавляли специфичные антитела к клеткам Vero, полученные во ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), в разведении 1:400. После инкубации с первичными антителами мембрану промывали 3 раза по 5 мин в буфере для блокировки без молока и помещали на 1 ч в раствор вторичных антител (anti-Rabbit IgG, Promega, США) в буфере для блокировки, в разведении 1:2500. Затем мембрану промывали 3 раза по 5 мин в буфере для блокировки без молока и визуализировали с помощью набора реактивов ECL-Plus (Cytiva) согласно рекомендациям производителя. Хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку [89].

2.4 Клинические исследования вакцины ПолиовакСин

2.4.1 Дизайн исследования

1 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). Исследование проводили с января по март 2018 года, включая клиническую и лабораторную части исследования. 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) [90].

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 в 0,5 мл;

Группа 2 – 30 добровольцев, которые были привиты Плацебо однократно в дозе в 0,5 мл [90].

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). Изучение было выполнено с июня по август 2018 года, включая клиническую и лабораторную части исследования [90].

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 в 0,5 мл;

Группа 2 – 100 добровольцев, которые были привиты вакциной Имовакс Полио (эталонный препарат) (SANOFI PASTEUR, S.A., лот P3B636M) однократно в дозе в 0,5 мл [90].

Вакцина Полиоваксин была произведена ФГБНУ «Научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), который выступил спонсором клинических исследований.

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 её последней редакции, принятой на 64-ой Генеральной Ассамблее Всемирной медицинской ассоциации

(World Medical Association - WMA), Форталеза, Бразилия, октябрь 2013 г.)[6], надлежащей клинической практикой ICH GCP [12] и российским нормативным документам [7–11,13].

Протокол исследования, информированное согласие форма 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) [90].

2.4.3 Методология исследования

Рандомизация проводилась методом конвертов. В исследовательские центры были предоставлены непрозрачные запечатанные конверты. Конверты заранее подготавливались на основе рандомизационных таблиц, методом случайных чисел. Распределение по группам осуществлялось с помощью генератора случайных чисел (в программе Microsoft Office Excel, функцией СЛЧИС с последующей сортировкой по возрастанию). Добровольцу, включенному в исследование, присваивался рандомизационный номер по нарастанию (по порядку), состоящий из двух цифр, например, 02, 33, 57.

После включения добровольца в исследование, врач-исследователь передавал конверт вакцинатору, на котором указан рандомизационный номер добровольца. Вакцинатор вскрывал конверт, в котором содержалась отрывная наклейка с указанием рандомизационного номера добровольца и наименования препарата (Полиоваксин, Плацебо или Имовакс Полио), который будет введен добровольцу. Добровольцы не знали какой препарат получают, так как было проведено ослепление вводимых препаратов. В результате был проинформирован о вводимом препарате только вакцинатор, подписавший письменное согласие о неразглашении информации о вводимых добровольцам препаратах другим членам исследовательской команды. Таким образом, другим членам команды была недоступна информация о введенном добровольцу препарате. Врач-исследователь и Главный Исследователь также, были не осведомлены, какой препарат назначен добровольцу.

В день вакцинации врач-исследователь обследовал добровольца, проводил анализ основных функций организма. Если все показатели состояния здоровья добровольца удовлетворяли определенным критериям для участия в исследовании, доброволец направлялся на вакцинацию.

Непосредственно перед вакцинацией проводилась термометрия (за 10 минут до введения препарата), а также через 2 часа после вакцинации. В первой фазе клинических исследований участники наблюдались в больнице в течение 24 часов в день вакцинации. На следующий день после вакцинации, после оценки жизненно-важных функций, проведения физикального осмотра

добровольцы покидали клинику до следующего визита. Во второй фазе клинических исследований после медицинского осмотра участники могли покинуть клинический центр в день вакцинации. В течение шести дней после вакцинации доброволец посещал клинику, где проводились следующие процедуры:

- Физикальное исследование (температура, частота сердечных сокращений (ЧСС), артериальное давление (АД), частота дыхательных движений ЧДД и др.);
- Обследование врачом (терапевт);
- Проведение электрокардиографии (на 3 сутки после вакцинации);
- Взятие крови из вены (5,0 мл) на биохимический, клинический анализы и определение общего IgE (на 3 сутки после вакцинации);
- Взятие мочи на общий анализ (на 3 сутки после вакцинации);
- Оценка неврологического статуса (на 3 сутки после вакцинации);
- Контроль за возможным развитием нежелательных явлений (НЯ) и серьезных нежелательных явлений (СНЯ);
- Заполнение первичной документации и перенос информации в Индивидуальную Регистрационную Карту;
- Выдача добровольцам Дневников самонаблюдения и разъяснение правил его заполнения (на 7 сутки после вакцинации).

Далее доброволец самостоятельно оценивал свое состояние здоровья и ежедневно регистрировал данную информацию в Дневнике самонаблюдения.

Через 14 дней после вакцинации доброволец посещал клинику. На визите проводили следующие процедуры:

- Контроль за возможным развитием НЯ и СНЯ;
- Взятие крови из вены (5,0 мл) на биохимический анализ и определение общего IgE;
- Взятие мочи на общий анализ;
- Анализ Дневников самонаблюдения;
- Заполнение первичной документации и перенос информации в Индивидуальную Регистрационную Карту.

Через 28 дней после вакцинации доброволец в последний раз посещал клинику.

Проводились следующие процедуры:

- Сбор Дневников самонаблюдения добровольцев;
- Контроль за возможным развитием НЯ и СНЯ;
- Физикальное обследование (температура, ЧСС, АД, ЧДД и др.);
- Обследование врачом (терапевт);
- Оценка неврологического статуса;
- Взятие крови из вены (5,0 мл) на клинический, биохимический анализы и определение общего IgE;
- Взятие мочи на общий анализ;
- Заполнение первичной документации и перенос информации в Индивидуальную Регистрационную Карту;
- Завершение исследования.

2.4.4 Критерии оценки переносимости и безопасности

Оценка переносимости и безопасности проводилась по следующим показателям:

- выраженность и связь с вакцинацией наблюдаемых врачом-исследователем местных и системных реакций – в течение 7 сут после вакцинации (в день вакцинации и 6 последующих дней), на 14 и 28 сут после вакцинации (28 сут указаны без учета допустимого интервала визитов);
- выраженность и связь с вакцинацией зафиксированных добровольцами местных и системных реакций (по данным Дневников самонаблюдения) - с 8 по 27 сут (в течение 21-го дня) после вакцинации (дни наблюдения указаны без учета допустимого интервала визитов);
- по результатам измерения физикальных данных зарегистрированных перед проведением иммунизации и при каждом посещении добровольцем клинической базы (с 1 по 7 сут, на 14 и 28 сут);
- анализ результатов лабораторных исследований (клинический и биохимический анализы крови, общий анализ мочи, определение общего IgE);
- по результатам оценки неврологического статуса;
- по результатам изменений ЭКГ на 3-и сутки после вакцинации относительно исходных результатов на визите Скрининга;

— частота возникновения НЯ и СНЯ, связанных с вакцинацией.

Тяжесть нежелательных явлений оценивалась по 4-балльной шкале в соответствии со стандартами, требуемыми российскими нормативными актами:

Степень 0 (нежелательное явление отсутствует):

нежелательное явление отсутствует;

местные реакции — отсутствие симптомов;

системные реакции — отсутствие симптомов;

температура — до 37,0 °C;

Степень 1 (легкое нежелательное явление):

нежелательное явление, легко переносимое добровольцем, причиняющее минимальные неудобства и не препятствующее повседневной деятельности;

местные реакции — слабая, гиперемия диаметром до 50 мм или инфильтрат диаметром до 25 мм;

системные реакции — слабая, наличие слабовыраженных симптомов;

температура — от 37,1 °C до 37,5 °C;

Степень 2 (умеренное нежелательное явление):

нежелательное явление, причиняющее дискомфорт, мешающее повседневной деятельности;

местные реакции — средняя, гиперемия диаметром более 50 мм или инфильтрат диаметром 26-50 мм;

системные реакции — средняя, симптомы, заметно нарушающие нормальную ежедневную деятельность;

температура — от 37,6 °C до 38,5 °C;

Степень 3 (тяжелое нежелательное явление):

нежелательное явление, препятствующее нормальной повседневной деятельности;

местные реакции — сильная, инфильтрат более 50 мм в диаметре;

системные реакции — сильная, симптомы, препятствующие нормальной ежедневной деятельности;

температура — более 38,6 °C.

Во всех случаях появления каких-либо побочных эффектов участники должны были сообщить врачу-исследователю по телефону или при следующем посещении клиники.

2.4.5 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 [91] и методическим указаниям по организации и проведению серологического мониторинга — МУ 3.1.1760-03 [92] 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 Нер-2 (Cincinnati), вакцинных штаммов (тип 1 - штамм Сэбина LSc 2ab, тип 2 - штамм Сэбина Р712 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). В качестве питательной среды использовали среду Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и витаминов (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»), с добавлением 5%-ной сыворотки крови эмбрионов коров («Биолот», Россия), стрептомицина (0,1 мг/мл) и пенициллина (100 ед./мл) (PanEco, Москва, Россия).

Исследуемые сыворотки инактивировали нагреванием при 56°C в течении 30 минут. Разводили с шагом 2 и смешивали 1:1 с вирусом до получения серии конечных разведений сыворотки от 1:8 до 1:1024 в двух параллелях и инкубировали при 36,5°C в течение 3 часов. После инкубирования к смеси сыворотки и вируса в лунки вносили суспензию клеток Нер-2с в объеме 100 мкл (порядка 10^5 кл./лунку). Далее планшеты закрывали и помещали в CO₂-инкубатор и инкубировали при температуре 36,5°C в течение 5 дней. Для проведения контроля клеточной культуры в отдельные лунки вносили по 100 мкл суспензии клеток. Дозу вируса определяли в каждом опыте для контроля попадания в допустимый диапазон концентраций (50-500 ТЦД₅₀ на лунку). А также в каждом опыте проводили титрование контрольной положительной сыворотки.

Учет результатов проводили через 5 суток на инвертированном микроскопе при соблюдении следующих условий:

- культура клеток в контрольных лунках без признаков специфической и неспецифической дегенерации;
- полная специфическая дегенерация культуры клеток в опытных лунках.

Титром антител в сыворотке является ее разведение, защищающее 50% лунок с клетками (тест-объектов) от цитопатического действия (ЦПД) вируса, рассчитываемое по формуле Кербера [91]:

$$\lg (50\% \text{ нейтрализующего титра}) = L - d(S - 0,5), \text{ где}$$

L – $\lg$ начального разведения сыворотки в опыте,

d – разница между $\lg$ последовательных разведений,

S – отношение количество лунок с признаками ЦПД к сумме всех тест-объектов по разведениям.

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).

ГЛАВА 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 [45,47,49,50,93]. 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 [94]. Так, чтобы получить моновакцину типа 2 из штамма Сэбина, сопоставимую по иммуногенности вакцине, приготовленной из дикого штамма вируса MEF-1, необходимо использовать в 10 раз больше исходного полуфабриката [94].

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.

Таблице 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 получения серии №1 клеточную и вирусную биомассу нарабатывали в роллерных бутылках объемом 1 л, серии № 2 и 3 — в 50-литровых одноразовых биореакторах (XDR-50 Xcellerex, Cytiva, Великобритания) на микроносителе Cytodex 3 (Cytiva). Для получения вирусных суспензий культуру-продуцент заражали полиовирусом типа 2 (штамм Сэбина P712

Ch 2ab). Множественность заражения составляла 0,02 ТЦД₅₀/кл. Осветляющую и стерилизующую фильтрацию проводили через каскад нейлоновых фильтров с размерами пор 0,5, 0,45 и 0,22 мкм (Pall Corporation, США). Серии №2 и №3 для очистки от микроносителя предварительно фильтровали через фильтр из нержавеющей стали с размером пор 70 мкм [89].

Вирусосодержащие жидкости концентрировали при помощи модульной настольной тангенциальной ультрафильтрационной системы (Sartoflow Advanced, Sartorius Stedim Biotech, Германия) через мембраны из полиэфирсульфона с границами отсечения 50 кДа (Sartorius Stedim Biotech). Финальное концентрирование проводили на кассетах тангенциальной фильтрации (Vivaflow 200, Sartorius Stedim Biotech) с мембранами из полиэфирсульфона с границами отсечения 100 кДа (Sartorius Stedim Biotech).

Вирусосодержащую жидкость серии №1 сконцентрировали в 200 раз. Полученный концентрат имел титр $10,3 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, концентрацию D-антигена более $1000 \pm 100 \text{ D-АГ}/\text{мл}$, концентрация общего белка $4811 \text{ мкг}/\text{мл}$. Вирусосодержащие жидкости серий №2 и №3 сконцентрировали в 330 раз. Полученные концентраты имели: титр $10,7 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ и $10,8 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, концентрацию D-антигена - более $2700 \pm 100 \text{ D-АГ}/\text{мл}$ и $5700 \pm 100 \text{ D-АГ}/\text{мл}$, концентрацию общего белка - $26840 \pm 50 \text{ мкг}/\text{мл}$ и $15425 \pm 50 \text{ мкг}/\text{мл}$ соответственно.

Для проведения ГФ использовали хроматографы АКТА pure 150M (Cytiva), оснащенных 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 $31 \pm 2 \text{ см}$. Диапазон фракционирования молекул (глобулярных белков) и средний размер частиц сорбента представлены в табл. 1. Для оценки эффективности колонок проводили ацетоновый тест: в качестве анализа использовали 1%-ный водный раствор ацетона, в качестве подвижной фазы использовали воду для инъекций при скорости потока 20 см/час. Для каждой колонки приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке, составила менее 3 и коэффициент асимметрии $1,2 \pm 0,2$ [95]. Регенерацию колонок проводили путем обработки в течение 1 часа 1М раствором гидроксида натрия для сорбента Sepharose 6 FF, 0,1М раствором гидроксида натрия для сорбента Sephacryl S-1000 и 0,5М раствором гидроксида натрия для сорбентов Sephacryl S-400 HR и Sephacryl S-300 HR до и после очистки концентрата полиовируса. Стерилизацию колонок проводили 4%-ным раствором формалина. 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 [96–98].

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:

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

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

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

3.1.3 Гель-фильтрация на сорбенте Sepharose 6 FF

На Рисунке 6 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 6А). В этих фракциях также наблюдали высокий титр вируса (более 8,5 lg ТЦД 50/мл) (Рисунок 6В) и обнаружен структурный белок VP2 (во фракциях со 2 по 6, Рисунок 6С). Несмотря на высокий титр вируса в целевых фракциях, вирусную РНК из них выделить не удалось, что косвенно может свидетельствовать об

инактивации вирусных частиц (Рисунок 6D). 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%).

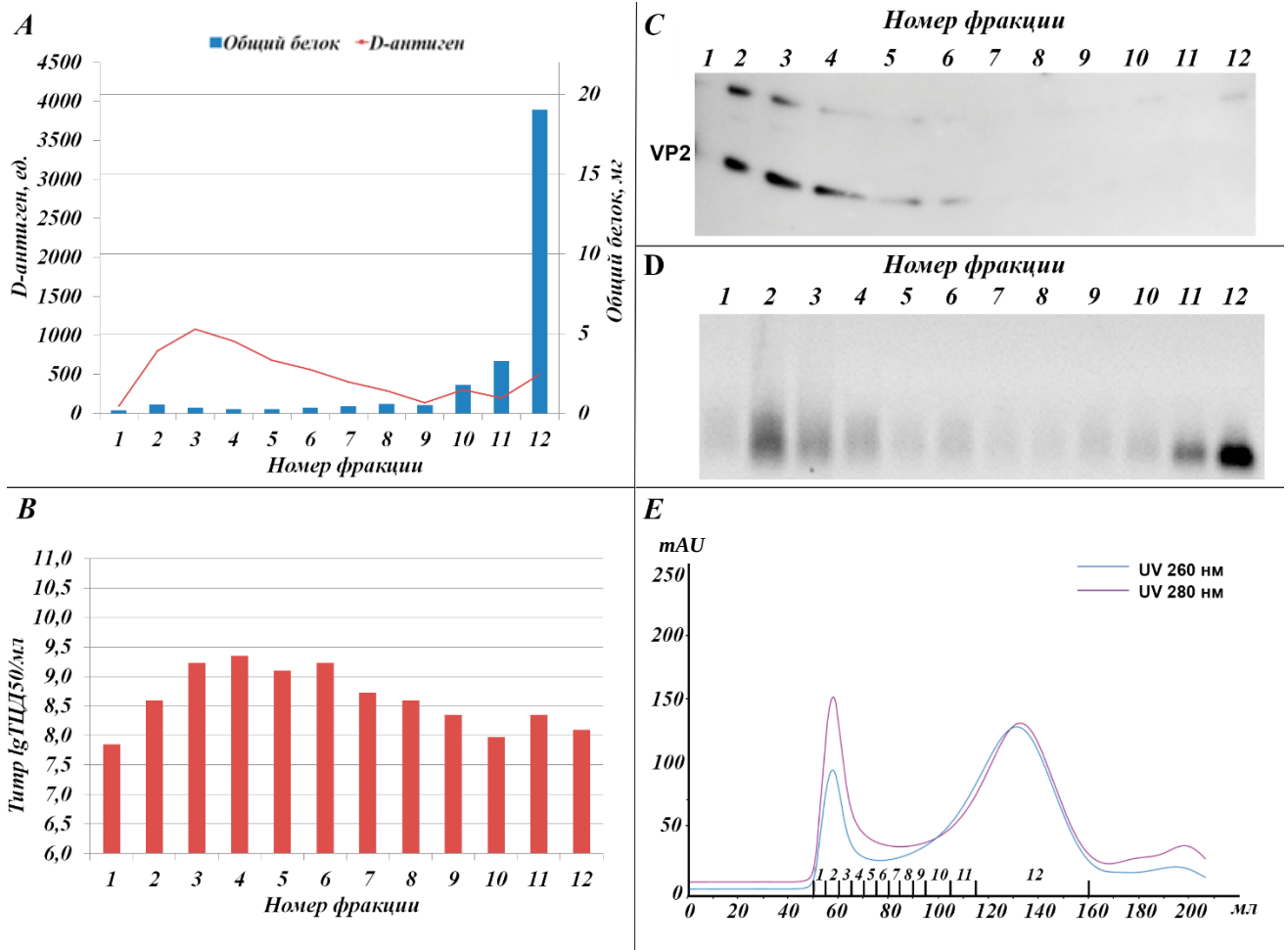


Рисунок 6 – Результат хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sepharose 6 FF: А – содержание D-антигена (красная линия) и общего белка во фракциях (диаграмма синего цвета); В – титр вируса во фракциях; С – содержание структурного белка VP2; Д – содержание вирусной РНК; Е – профиль элюции [89]

3.1.4 Гель-фильтрация на сорбенте Sephacryl S-1000

На Рисунке 7 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 TCID₅₀/мл; Рисунок 7В), значительным содержанием структурного белка VP2 и вирусной РНК (Рисунок 7С и Рисунок 7Д соответственно). 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 7А).

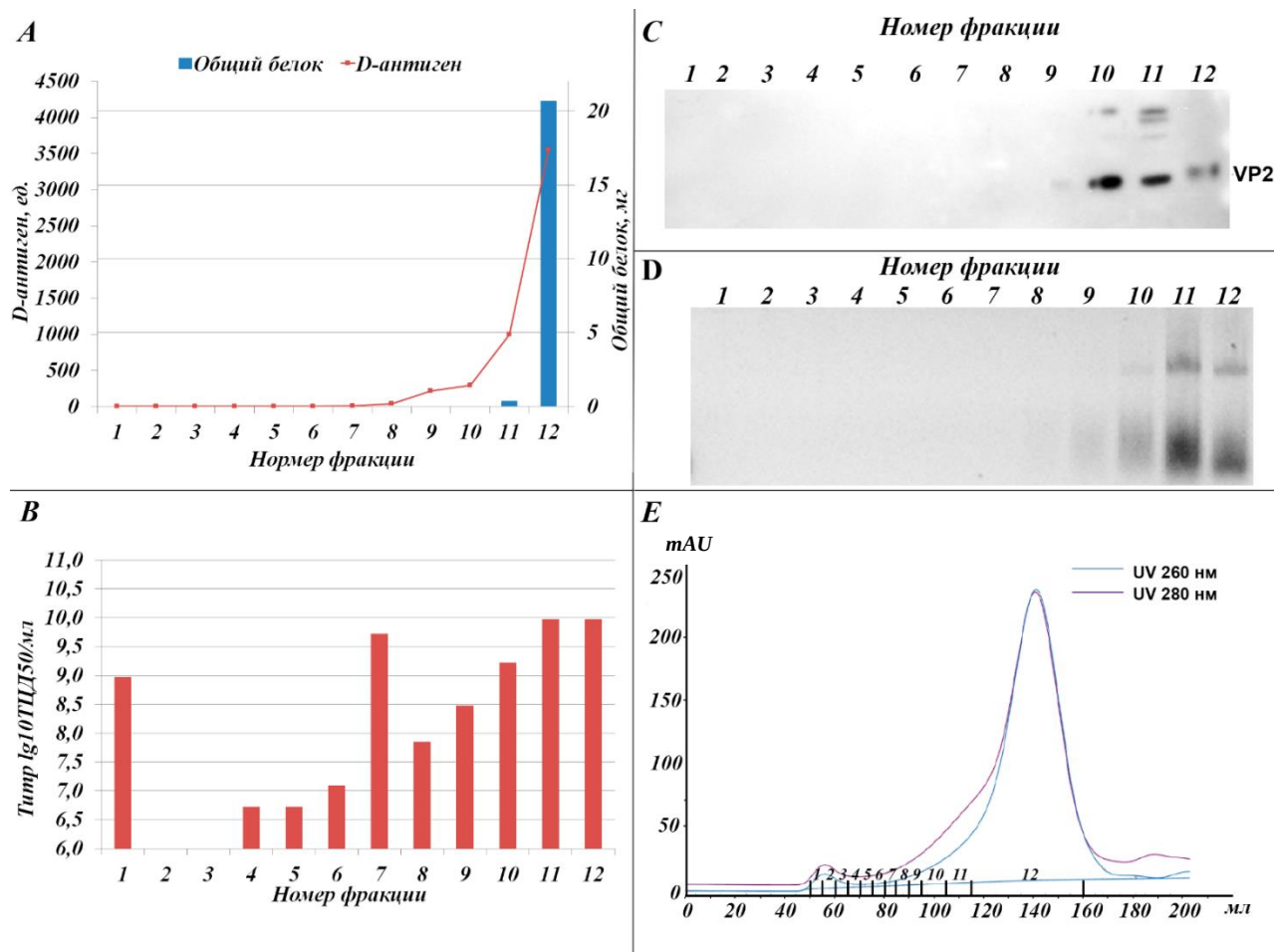


Рисунок 7 – Результат хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sephacryl S-1000: А – содержание D-антигена (красная линия) и общего белка во фракциях (диаграмма синего цвета); В – титр вируса во фракциях; С – содержание структурного белка VP2; Д – содержание вирусной РНК; Е – профиль элюции [89]

3.1.5 Гель-фильтрация на сорбенте Sephacryl S-400 HR

На Рисунке 8 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 Д-АГ/мл. Пик элюции D-антигена совпадает со вторым пиком на хроматограмме (Рисунок 8А). В этих же фракциях отмечен наибольший титр вируса (более 9,0 лг ТЦД₅₀/мл во фракциях с 5 по 10; Рисунок 8В), обнаружен структурный белок VP2 и вирусная РНК (фракции 5-10, рис 3С и фракции 4–9, Рисунок 8Д соответственно). При этом балластные белки элюируются позже во фракциях 11–12 (Рисунок 8Е), что обеспечивает достаточно высокую степень очистки вирусных частиц – 94%. Однако очистка на этом сорбенте сопровождается существенными потерями антигена – степень извлечение составляет 57%.

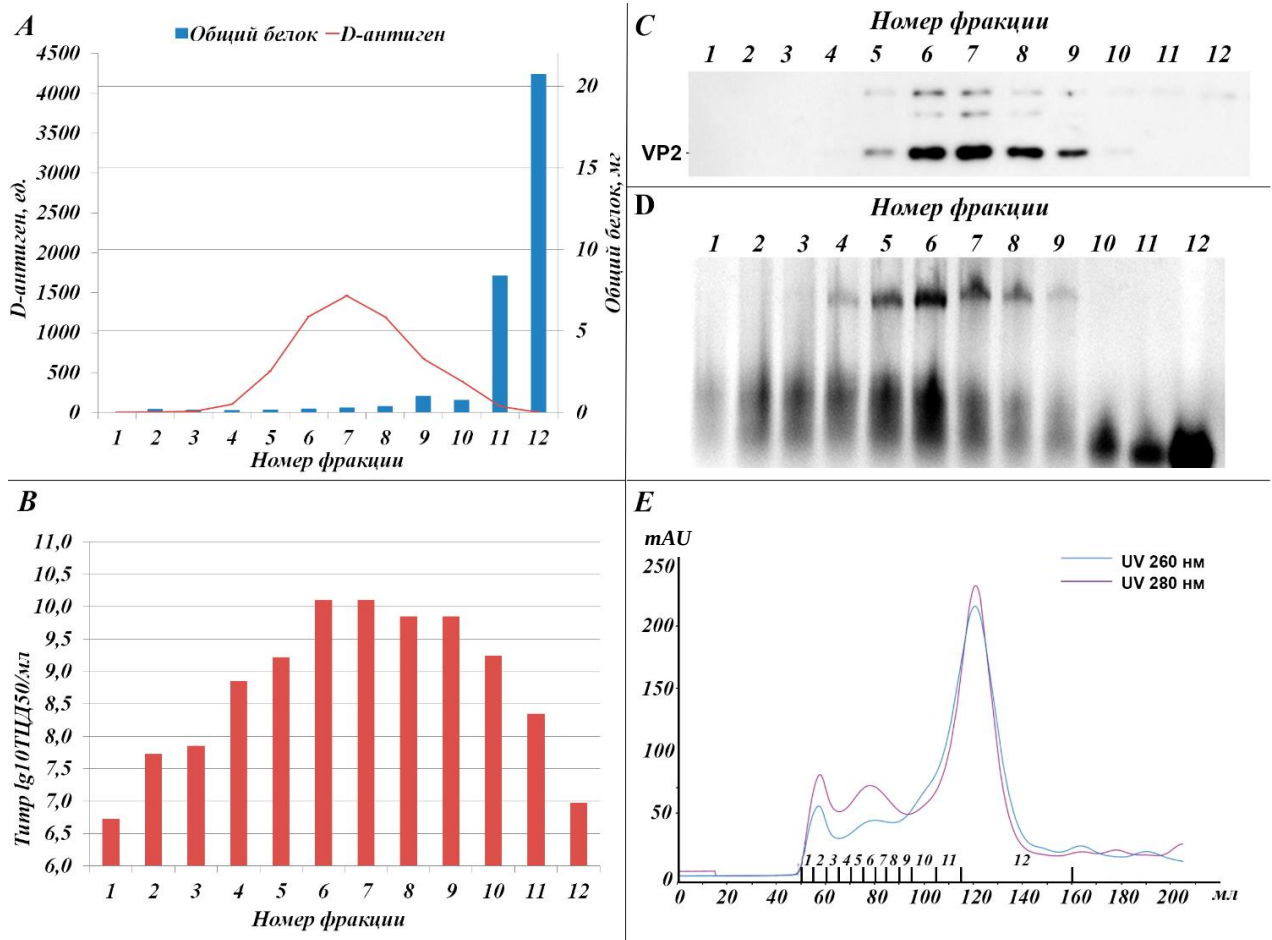


Рисунок 8 – Результат хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sephacryl S-400 HR: А – содержание D-антигена (красная линия) и общего белка во фракциях (диаграмма синего цвета); В – титр вируса во фракциях; С – содержание структурного белка VP2; Д – содержание вирусной РНК; Е – профиль элюции [89]

3.1.6 Гель-фильтрация на сорбенте Sephacryl S-300 HR

На Рисунке 9 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 Д-АГ/мл. Пик элюции D-антигена совпадает с первым пиком на хроматограмме (Рисунок 9А). Эти же фракции характеризуются высоким титром вируса (более 9,0 lg TCID₅₀/мл, Рисунок 9В), содержанием структурного белка VP2 и вирусной РНК (Рисунок 9С и 9Д соответственно). Избыток вирусной РНК во фракциях 1 и 2, по-видимому, препятствует ее вхождению в лунки (Рисунок 9Д). 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%.

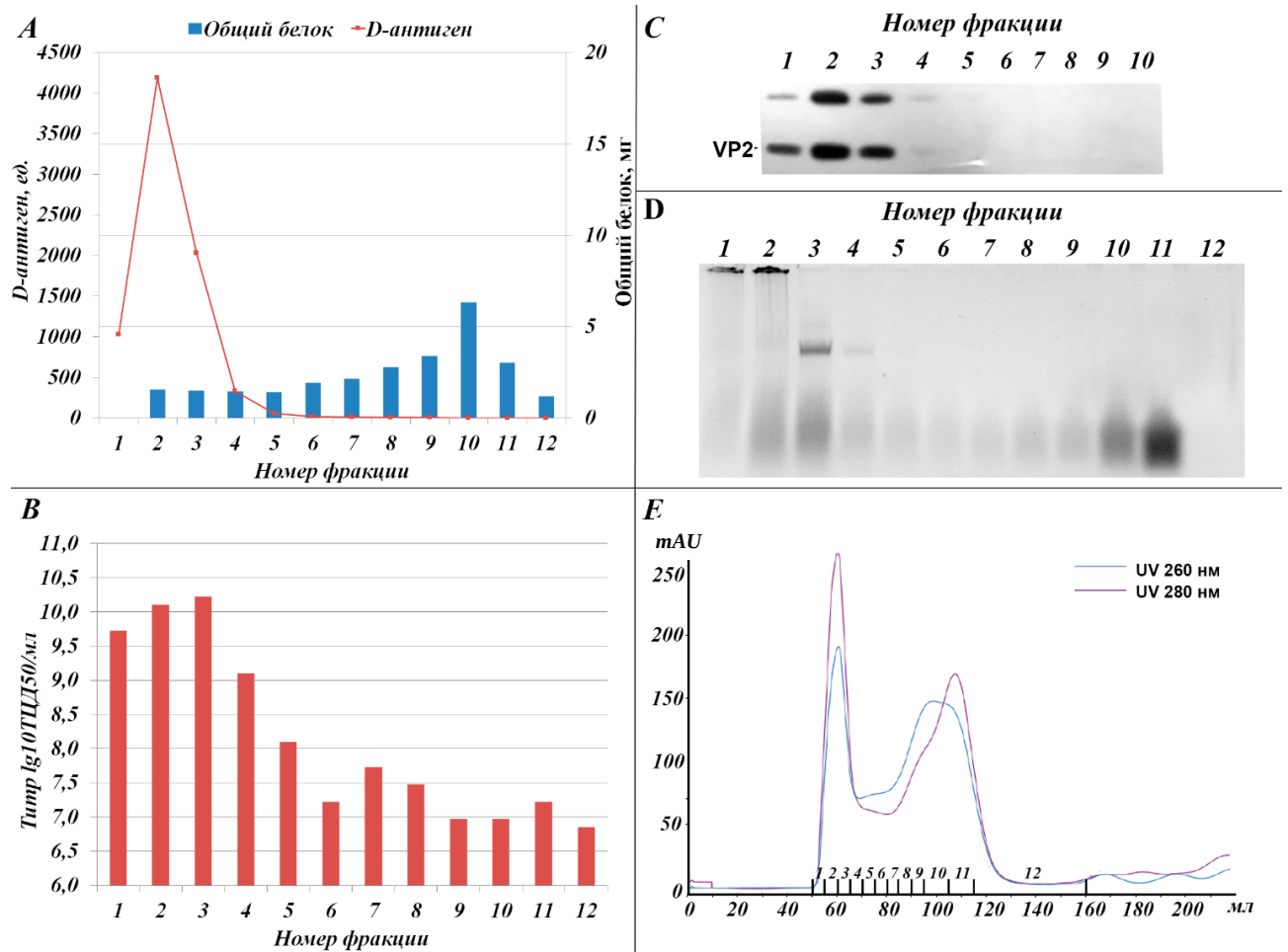


Рисунок 9 – Результат хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте Sephacryl S-300 HR: А – содержание D-антигена (красная линия) и общего белка во фракциях (диаграмма синего цвета); В – титр вируса во фракциях; С – содержание структурного белка VP2; Д – содержание вирусной РНК; Е – профиль элюции [89]

3.1.7 Оценка эффективности очистки на сорбенте Sephacryl S-300 HR концентратов полиовируса типа 2, полученных при культивировании в одноразовых реакторах

Для накопления клеточной и вирусной биомассы в промышленных объемах при получении разных иммунобиологических препаратов, в том числе и вакцин против полиомиелита, все чаще используют одноразовые биореакторы. Эти аппараты имеют ряд преимуществ перед стационарными реакторами, культуральные сосуды которых изготовлены из стекла или стали. При использовании одноразовых биореакторов отпадает необходимость предварительной подготовки, стерилизации, очистки самого мешка-инкубатора, датчиков рН, датчиков для измерения растворенного кислорода, температуры, а также перемешивающего устройства, различных коннекторов для подачи питательных сред, реагентов, сбора клеточного и вирусного урожая. Все вышеперечисленное позволяет существенно повысить технологичность самого производственного процесса, снизить риск контаминации продукта, проводить масштабирование процесса и его валидацию с минимальными затратами.

Были наработаны клеточная и вирусная биомассы в одноразовых биореакторах при размножении полиовируса типа 2 в культуре клеток линии Vero. Из полученных вирусосодержащих жидкостей были приготовлены концентраты, обозначенные как серия №2 и серия №3 (см. 3.1.2).

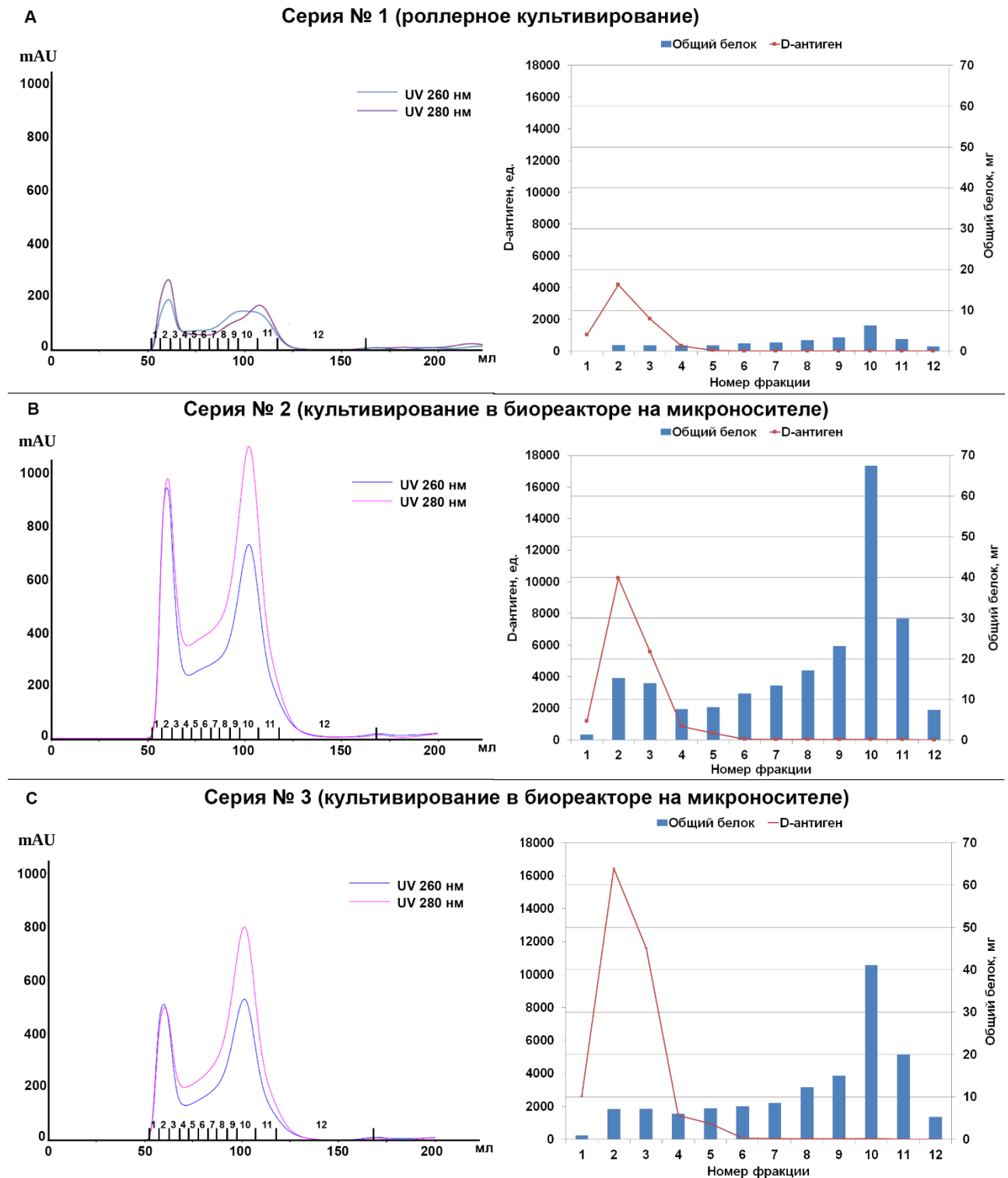


Рисунок 10 – Профиль элюции очистки концентратов полиовируса на сорбенте Sephacryl S-300 HR с выделенной зоной целевого пула фракций и содержание D-антигена (красная линия) и общего белка во фракциях (диаграмма синего цвета): А – серия №1; В – серия №2; С – серия №3 [89]

Была проведена хроматографическая очистка концентратов серий №2 и №3 на сорбенте Sephacryl S-300 HR. В качестве контроля использовали концентрат №1, полученный на роллерных культурах. На Рисунке 10 представлены данные по очистке концентратов серий №2 и №3 (В и С соответственно) в сравнении с очисткой концентрата серии №1 (А). Для серий №2 и №3 пик элюции D-антигена совпадает с первым пиком на хроматограмме (Рисунок 10В и Рисунок 10С). К целевому пулу фракций можно было отнести 3 фракции (с 1 по 3 включительно) общим объемом 15 мл. В результате хроматографии концентратов серии №2 и серии №3, степень очистки составила 86 и 88% и степень извлечения D-антигена 76 и 66% соответственно. В случае концентрата серии №1 степень очистки составила 91% и степень извлечения D-антигена 73%. Степень очистки концентратов серий №2 и №3 оказалась ниже, чем степень очистки концентрата серии №1. По-видимому, это связано с тем, что вирусы полиомиелита, в частности полиовирус типа 2, являются цитоцидными, а концентрация клеток в культурах-продуцентах, полученных в биореакторах, выше концентрации клеток в роллерных культурах в 3-4 раза. При размножении вируса происходит практически полное разрушение клеток и накопление в вирусодержащей жидкости как клеточного детрита, так и внутриклеточных белков. Это приводит к увеличению белковой нагрузки при проведении хроматографической очистки вирусного материала и незначительному снижению показателя степени очистки препарата на стадии ГФ.

3.1.8 Сравнение сорбентов с разным диапазоном фракционирования

Согласно данным, полученным при проведении ГФ на сорбентах с разным диапазоном фракционирования, были получены сопоставимые результаты 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 (Таблица 2). Таким образом, только сорбент Sephacryl S-300 HR имеет оптимальный диапазон фракционирования, который составляет 10 – 1500 кДа и позволяет эффективно отделить вирус от балластных белков, одновременно избегая размывания целевого пика и инактивации вирусных частиц.

Проведенные исследования показали, что сорбент Sephacryl S-300 HR обеспечивает степень извлечения D-антигена не ниже 65% и степень очистки более 85% на стадии ГФ концентратов полиовируса типа 2, приготовленных из вирусодержащих жидкостей, наработанных в биореакторах и роллерных бутылках.

Таблица 2 – Оценка качества очистки целевого пула фракций

№ п/ п	Сорбент			Номера фракций	Объем фракций, мл	Концентрация D-антигена, D-АГ/мл	Степень извлечения, %	Степень очистки от балластных белков, %
	Наименование	Диапазон фракционирования молекул (глобулярных белков), кДа	Средний размер частиц сорбента, мкм					
1	Sepharose 6 FF	10 – 4 000	90	2-7	30	150±20	45	94
2	Sephacryl S-1000	500 – 1 000 000	70	11	10	100±20	11	99
3	Sephacryl S-400 HR	20 – 8 000	50	5-9	25	200±20	57	93
4	Sephacryl S-300 HR	10 – 1500	50	1-3	15	485±25	73	91

И хотя сорбент Sephacryl S-300 HR показал положительные результаты по степени очистки от балластных белков и степени извлечения целевого антигена, данный сорбент имеет ряд существенных недостатков в использовании:

1) Сорбент Sephacryl S-300 HR представляют 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 [99]. Это, в свою очередь, необходимо учитывать при выборе буферного раствора для ИОХ;

2) Сравнительно низкие скорости потока. Рекомендуемая производителем скорость потока 15 см/час [98]. При проведении хроматографической очистки на сорбенте Sephacryl S-300HR скорость потока была 1,5 мл/мин, а давление на колонке составляло 0,36±0,02 МПа. Для сравнения: на сорбенте Sepharose 6 FF при скорости потока 5,5 мл/мин давление на колонке не превышало 0,31±0,02 МПа. Упаковка промышленных колонн с сорбентом Sephacryl S-300HR окажется трудоемким процессом, а их отмывка от консервирующего раствора и последующее уравнивание займет более 12-14 часов. Кроме того, сама элюция будет длиться не менее 4 часов. Таким образом, наладка и проведение данного процесса в промышленных условиях является достаточно сложной задачей.

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 [100].

3.2.1 Условия проведения исследования

Для получения концентрата полиовируса типа 2 клеточную и вирусную биомассу нарабатывали в 50-литровых одноразовых биореакторах (XDR-50 Xcellerex, Cytiva, Великобритания) на микроносителе Cytodex 3 (Cytiva). Для получения вирусных суспензий культуру-продуцент заражали полиовирусом типа 2 (штамм Сэбина P712 Ch 2ab). Множественность заражения составляла 0,02 ТЦД₅₀/клетка. Осветляющую и стерилизующую фильтрацию проводили через каскад нейлоновых фильтров с размерами пор 0,5, 0,45 и 0,22 мкм (Pall Corporation, США). Для очистки от микроносителя предварительно фильтровали через фильтр из нержавеющей стали с размером пор 70 мкм [89].

Вирусодержащие жидкости концентрировали при помощи модульной настольной тангенциальной ультрафильтрационной системы (Sartoflow Advanced, Sartorius Stedim Biotech, Германия) через мембраны из полиэфирсульфона с границами отсечения 50 кДа (Sartorius Stedim Biotech). Финальное концентрирование проводили на кассетах тангенциальной фильтрации (Vivaflow 200, Sartorius Stedim Biotech) с мембранами из полиэфирсульфона с границами отсечения 100 кДа (Sartorius Stedim Biotech). Вирусодержащую жидкость серии сконцентрировали в 600 раз. Полученный концентрат имел титр $10,9 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, концентрацию D-антигена $4900 \pm 100 \text{ D-АГ}/\text{мл}$, концентрация общего белка $42100 \pm 150 \text{ мкг}/\text{мл}$.

Для проведения ГФ использовали хроматографы АКТА pure 150M (Cytiva), оснащенные УФ-детектором. Хроматографическая колонка HiScale 26/40 (Cytiva) была упакована сорбентом WorkBeads 40/1000 SEC (Bio-Works) с высотой столба сорбента 31 ± 2 см. Приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке, составила менее 3 и коэффициент асимметрии $1,2 \pm 0,2$ [95]. Регенерацию колонок проводили путем обработки в течение 1 часа 1М раствором

гидроксида натрия (до и после очистки концентрата полиовируса. Стерилизацию колонок проводили 4%-ным раствором формалина. 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 [100]. 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 11 представлены результаты хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC (Bio-Works). Как и 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 11А). Эти же фракции характеризуются высоким титром вируса (более 9,5 lg ТЦД₅₀/мл, Рисунок 11В), содержанием вирусной РНК (Рисунок 11С). 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%.

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%.

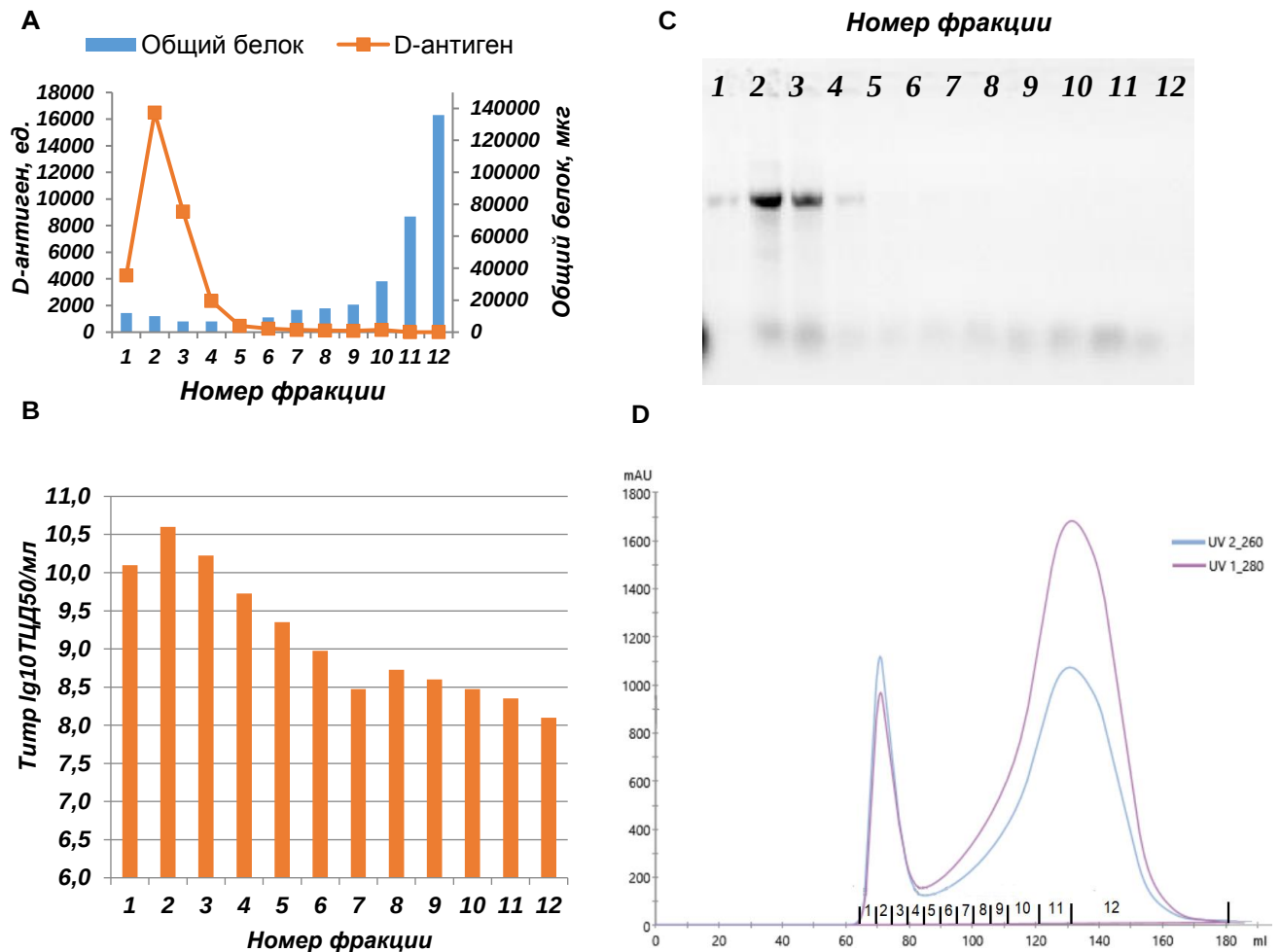


Рисунок 11 – Результат хроматографической очистки концентрата полиовируса на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC: А – содержание D-антигена (красная линия) и общего белка во фракциях (диаграмма синего цвета); В – титр вируса во фракциях; С – содержание вирусной РНК; Д – профиль элюции

Таким образом, можно сделать вывод, что сорбент WorkBeads 40/1000 SEC на основе агарозы с диапазоном фракционирования 10-1200 кДа и средним размером частиц сорбента 45 мкм является наиболее предпочтительным для очистки концентратов полиовируса в промышленных объемах.

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

При производстве инактивированной вакцины против полиомиелита на первом этапе хроматографических очисток проводится ГФ прежде всего для очистки от большей части балластных белков, что позволит также сократить нагрузку на сорбент при проведении ИОХ. При проведении ГФ биомолекулы разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. На Рисунке 12 схематично показан данный процесс.

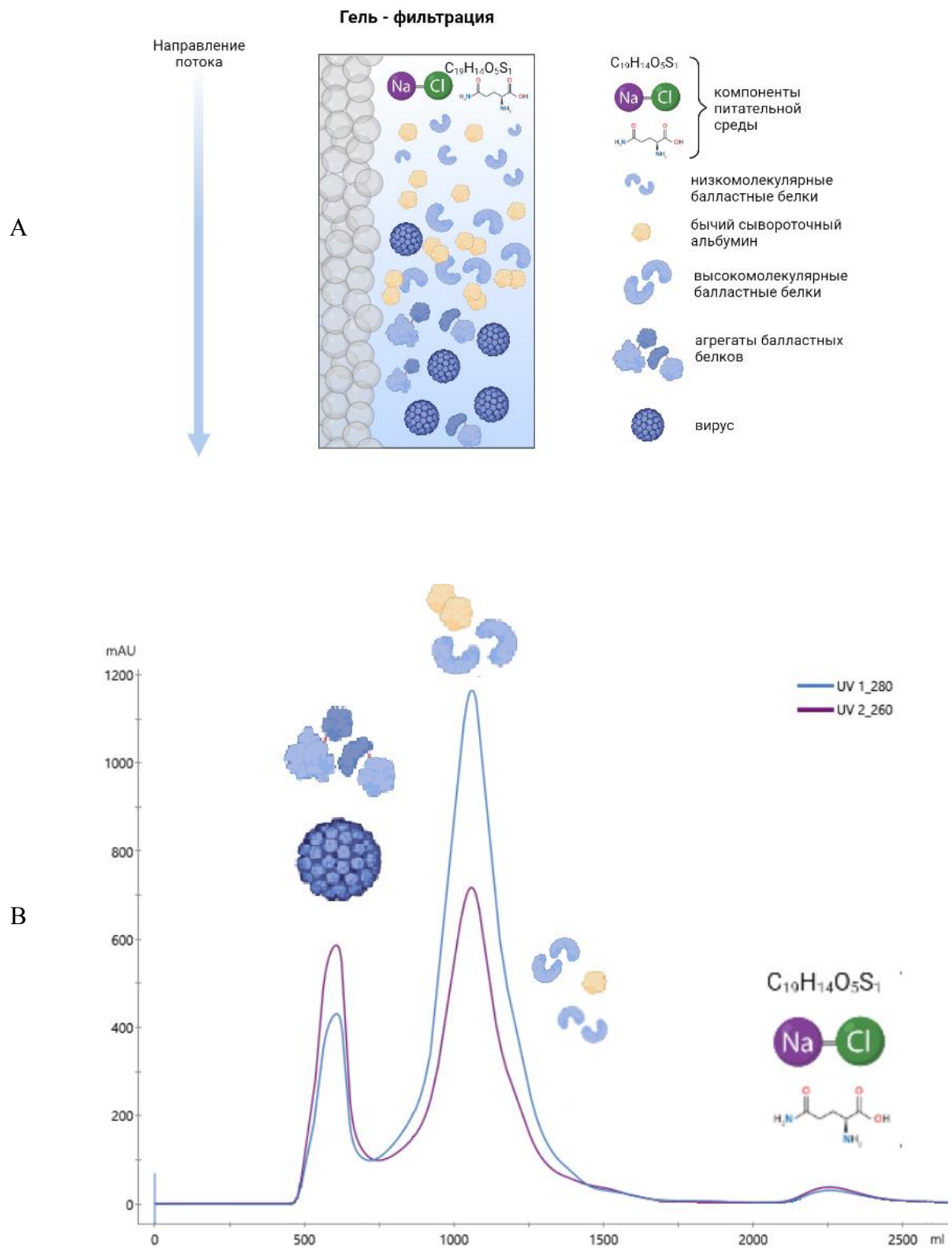


Рисунок 12 – Гель-фильтрация концентрата полиовируса на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC: А – разделение многокомпонентного концентрата полиовируса внутри хроматографической колонны; В – типичная хроматограмма геля-фильтрации (рисунок сделан с помощью biorender.com)

При проведении ГФ концентратов полиовирусов трех серотипов на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC первыми элюируются наиболее крупные молекулы. Первый пик на хроматограмме образован полиовирусом, а также агрегатами балластных высокомолекулярных белков, которые составляют менее 10% от общей массы балластных белков. Самый большой пик на хроматограмме – это оставшиеся балластные белки. На левое плечо хроматограммы приходятся высокомолекулярные балластные белки и агрегаты бычьего сывороточного альбумина, а правое плечо хроматограммы составляют низкомолекулярные белки и бычий сывороточный альбумин. Последний небольшой пик на хроматограмме образован компонентами питательной среды, которые свободно протикают в поры за счет меньшего размера и, как следствие, элюируются позже. На этот же пик приходится рост электропроводности, так концентрат полиовируса после стадии ультрафильтрации находится в растворе с концентрацией натрия хлорида 1 М.

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 упаковывали 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 3 и на Рисунке 13. 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 3 – 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 $\pm$ SD, %
Тип 1	7	72,92 (64,48 ; 90,25)	96,61 $\pm$ 1,76
Тип 2	31	77,33 (72,23 ; 81,45)	96,68 $\pm$ 1,80
Тип 3	24	69,73 (66,34 ; 78,79)	95,76 $\pm$ 3,59

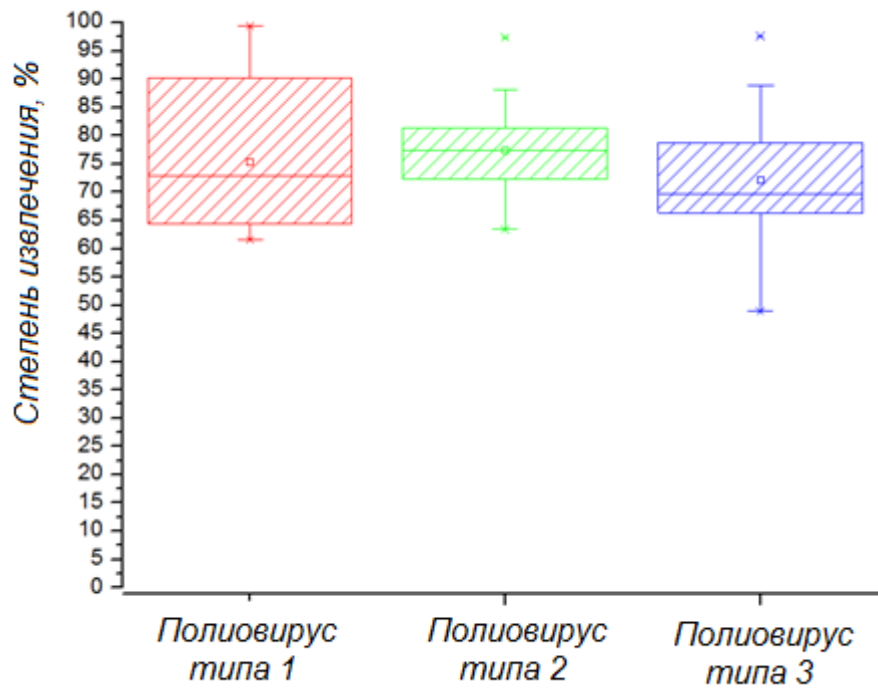


Рисунок 13 – Результаты гель-фильтрации концентратов полиовируса типа 1, типа 2 и типа 3 на сорбенте WorkBeads 40/1000 SEC по показателю степени извлечения, представленные в виде медианы (Median) и интерквартильного размаха (Q1-Q3)

Статистически значимого отличия не обнаружено между степенью извлечения целевого антигена трех серотипов полиовируса, также нет статистически значимого отличия и 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 чем 90%.

ГЛАВА 4. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КОНЦЕНТРАТОВ ПОЛИОВИРУСА

4.1 Получение очищенного концентрата полиовируса

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

Для получения серий вакцинного препарата клеточную и вирусную биомассу нарабатывали в роллерных бутылках объемом 1 л, а также в биореакторах BIOFLO 510 (New Brunswick Scientific), XDR-50 Xcellerex (Cytiva), BIOSTAT STR 200 (Sartorius Stedim Biotech) на микроносителях 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 2 (штамм Сэбина Leon 12a₁b). Множественность заражения составляла $0,02 \pm 0,01$ ТЦД₅₀/клетка.

Фильтрация и концентрирование вирусных суспензий

Осветляющую и стерилизующую фильтрацию вирусосодержащих жидкостей проводили через каскад нейлоновых фильтров с размерами пор 0,45 и 0,22 мкм (Pall Corporation) после предварительной очистки от частиц микроносителя с помощью фильтра из нержавеющей стали (размер пор 70 мкм) [101].

Вирусосодержащие жидкости концентрировали при помощи модульной настольной тангенциальной ультрафильтрационной системы (Sartoflow Advanced, Sartorius Stedim Biotech) через мембраны из полиэфирсульфона с границами отсечения 50 кДа или 100 кДа (Sartorius Stedim Biotech).

Хроматография: гель-фильтрация

Для проведения ГФ использовали хроматограф АКТА pure 150M (Cytiva). Хроматографические колонки HiScale 26/40 (Cytiva) и XK 50/100 (Cytiva) были упакованы сорбентом для эксклюзионной хроматографии WorkBeads 40/1000 SEC (Bio-Works). Нагрузка составляла 5% от объема колонки. Оптическую плотность фракций определяли при двух длинах волн – 260 и 280 нм. В качестве элюента для получения очищенного концентрата вируса в буферном растворе без натрия хлорида применяли 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, pH $7,2 \pm 0,1$ (Раствор 1), для получения очищенного концентрата в буферном растворе с натрием хлорида применяли – 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, pH $7,2 \pm 0,1$, содержащий 0,1М натрия хлорида (Раствор 2). Скорость потока и условия регенерации были выбраны согласно рекомендациям производителя сорбента [100].

4.2 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:

$$CO_{BB_ИОХ} = 100 - \frac{C_{OB_ИОХ} \times V_{ИОХ}}{C_{OB_ГФ} \times V_{ГФ}} \times 100, (3)$$

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

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

- где $CO_{BB_ИОХ}$ – степень очистки от балластных белков при проведении ИОХ, %;
- $C_{OB_ИОХ}$ – концентрация общего белка в очищенном концентрате полиовируса после ИОХ, мкг/мл;
- $V_{ИОХ}$ – объем очищенного концентрата полиовируса после ИОХ, мл;
- $C_{OB_ГФ}$ – концентрация общего белка в очищенном концентрате полиовируса после ГФ, мкг/мл;
- $V_{ГФ}$ – объем очищенного концентрата полиовируса после ГФ, мл;
- $CO_{ДНК}$ – степень очистки от остаточной клеточной ДНК при проведении ИОХ, %;
- $C_{ДНК_ИОХ}$ – концентрация остаточной клеточной ДНК в очищенном концентрате полиовируса после ИОХ, мкг/мл;
- $C_{ДНК_ГФ}$ – концентрация остаточной клеточной ДНК в концентрате полиовируса после ГФ, мкг/мл;
- $CI_{ИОХ}$ – степень извлечения целевого антигена при проведении ИОХ, %;
- $C_{D-AG_ИОХ}$ – концентрация D-антигена очищенного концентрата полиовируса после ИОХ, D-АГ/мл;
- $C_{D-AG_ГФ}$ – концентрация D-антигена очищенного концентрата полиовируса после ГФ, D-АГ/мл.

4.3 Градиентная ионообменная хроматография

Для проведения градиентной ИОХ использовали хроматографы АКТА pure 150M (Cytiva) и предупакованные хроматографические колонки HiPrep Q FF 16/10 и HiPrep DEAE FF 16/10 (Cytiva). Для градиента на линии A1 был установлен 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, pH 7,2±0,1 (Раствор 1) и на линии B1 был установлен – 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, pH 7,2±0,1, содержащий 1М натрия хлорида (Раствор 3). Градиентная хроматография была выполнена дважды на разных сериях концентратов (серия №1 и №2) полиовируса типа 2, которые были получены с помощью Раствора 1 на стадии ГФ. Затем при подобранном с помощью градиентной хроматографии буферном растворе (Раствор 2) была проведена ИОХ трех серий концентратов полиовируса типа 2, полученных с помощью Раствора 2 на стадии ГФ. ИОХ была выполнена 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. Характеристики сорбентов представлены в Таблице 4. Ввод концентрата полиовируса выполняли через петлю объемом 10 мл (Cytiva). Хроматографические очистки проводились при скорости потока 2 мл/мин. Оптическую плотность фракций определяли при двух длинах волн – 260 и 280 нм. Скорость потока и условия регенерации были выбраны согласно рекомендациям производителя сорбента [102,103].

Таблица 4 – Характеристика сорбентов для ионообменной хроматографии

Сорбент	Тип ионо-обменника	Ионная емкость, ммоль Cl⁻/мл сорбента	Средний размер частиц сорбента, мкм
DEAE Sepharose FF (Cytiva)	Слабый	0,11-0,16	90
Q Sepharose FF (Cytiva)	Сильный	0,18-0,25	90
Capto DEAE (Cytiva)	Слабый	0,29-0,35	90

На Рисунке 14А и на Рисунке 14Б представлены хроматограммы градиентной хроматографии на сорбенте DEAE Sepharose FF серии №1 и серии №2 соответственно. Результаты хроматографических очисток представлены в Таблице 5 и в Таблице 6.

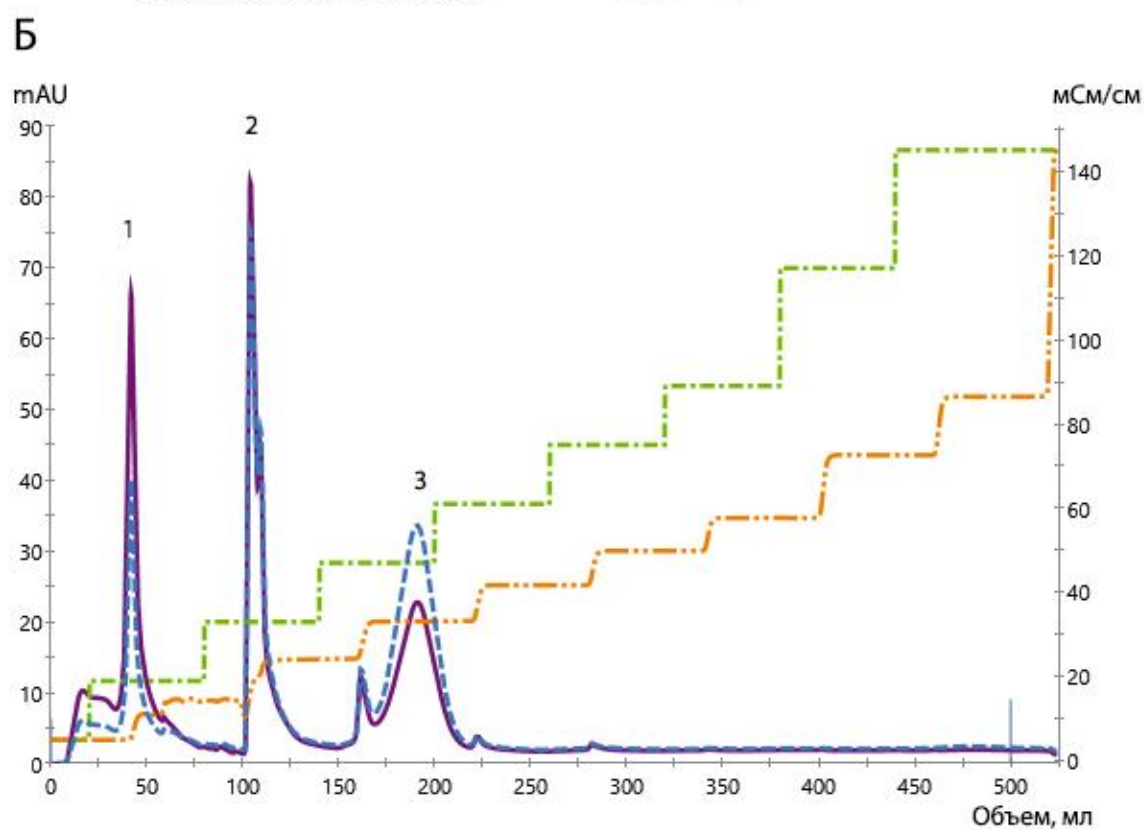
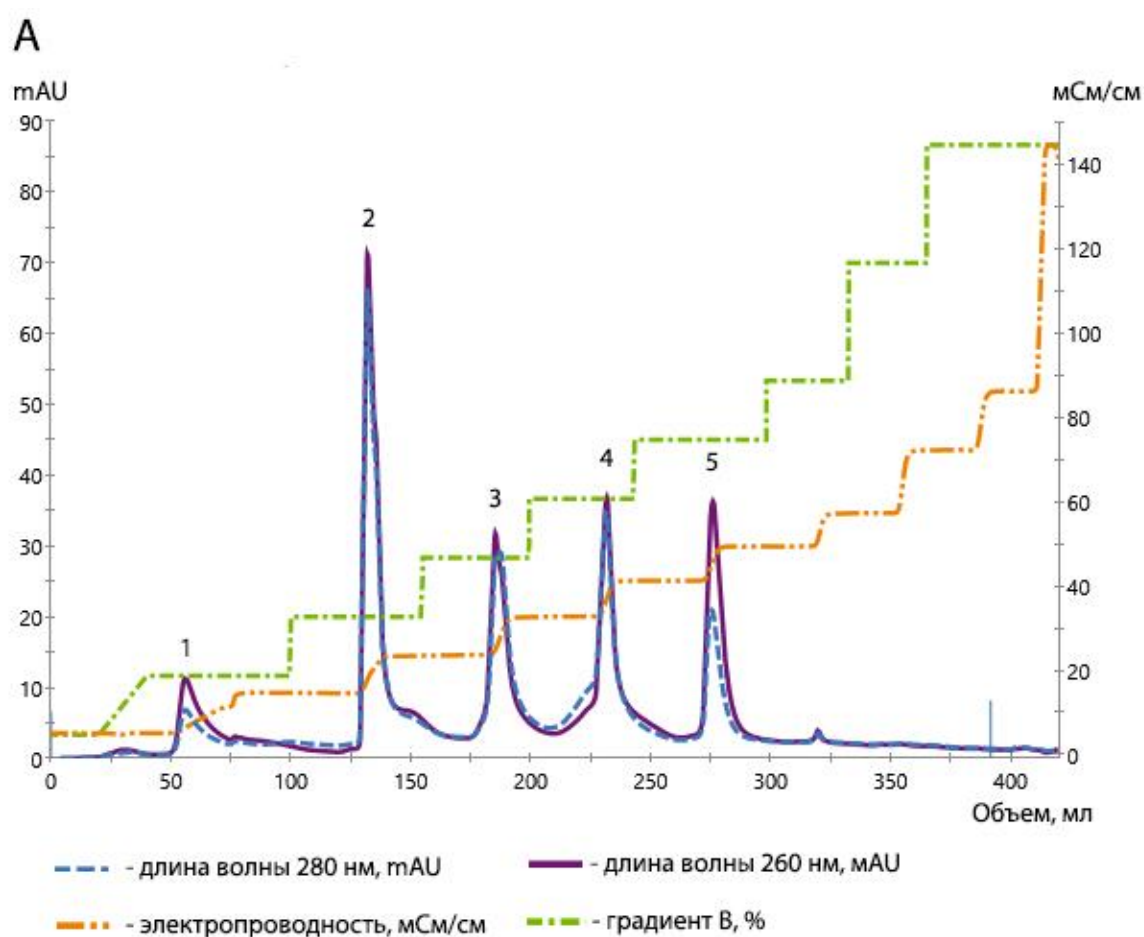


Рисунок 14 – Градиентная ионообменная хроматография на сорбенте DEAE Sepharose FF концентрата полиовируса типа 2 серии №1 (А) и №2 (Б) [101]

Таблица 5 – Результаты градиентной ионообменной хроматографии на сорбенте DEAE Sepharose FF концентрата полиовируса типа 2 серии №1

Номер пика	Концентрация натрия хлорида при элюировании пика	Степень извлечения, %	Степень очистки от балластных белков, %	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, %
1	100 мМ	14,4	95,2	100,0
2	200 мМ	2,2	84,0	100,0
3	300мМ	1,3	81,0	100,0
4	400 мМ	0,9	94,4	99,3
5	500 мМ	0,6	99,2	92,1

Таблица 6 – Результаты градиентной ионообменной хроматографии на сорбенте DEAE Sepharose FF концентрата полиовируса типа 2 серии №2

Номер пика	Концентрация натрия хлорида при элюировании пика	Степень извлечения, %	Степень очистки от балластных белков, %	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, %
1	100 мМ	20,7	95,7	100,0
2	200 мМ	1,3	81,2	92,7
3	300мМ	0,0	86,7	87,7

На Рисунке 15А и на Рисунке 15Б представлены хроматограммы градиентной хроматографии на сорбенте Q Sepharose FF серии №1 и серии №2, соответственно. Результаты хроматографических очисток представлены в Таблице 7 и в Таблице 8.

При нанесении концентратов, полученных с помощью Раствора 1 на стадии ГФ, на уравновешенные также Раствором 1 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. Данные, представленные в Таблицах 5, 6, 7 и 8, показывают, что 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.

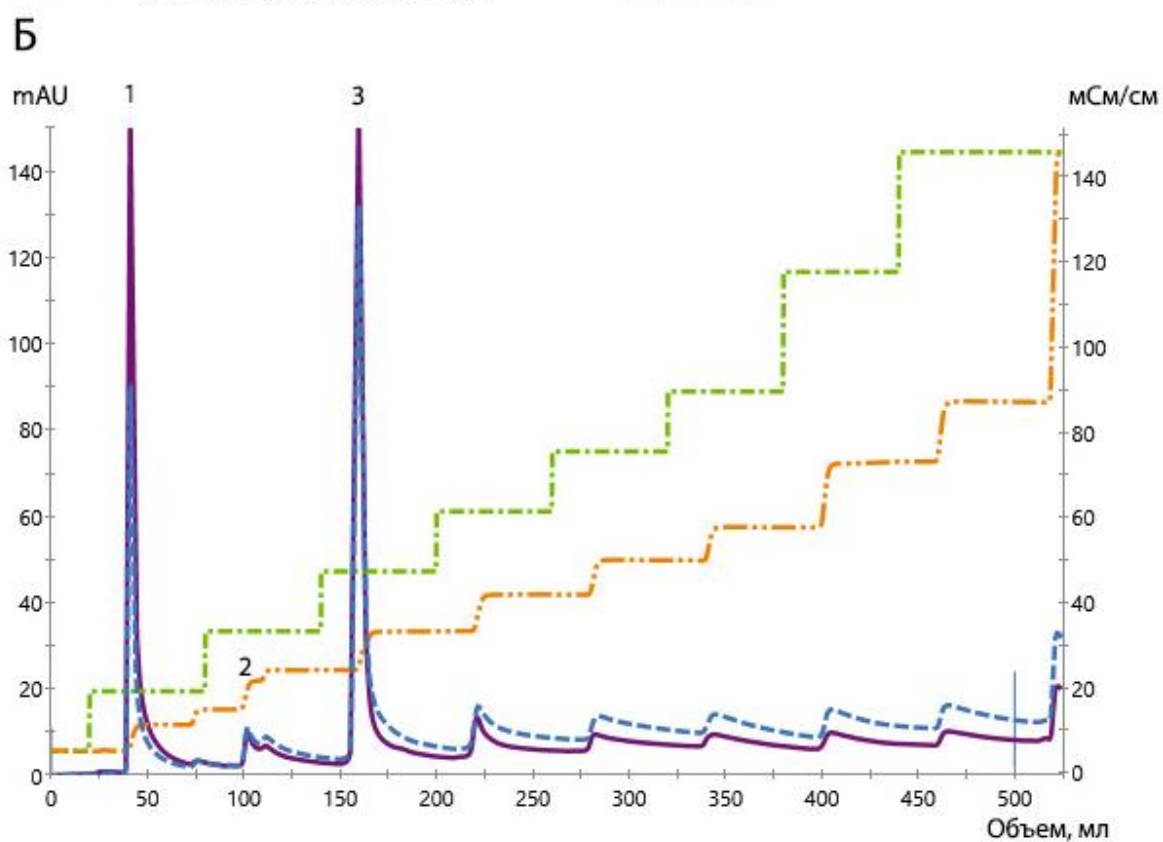
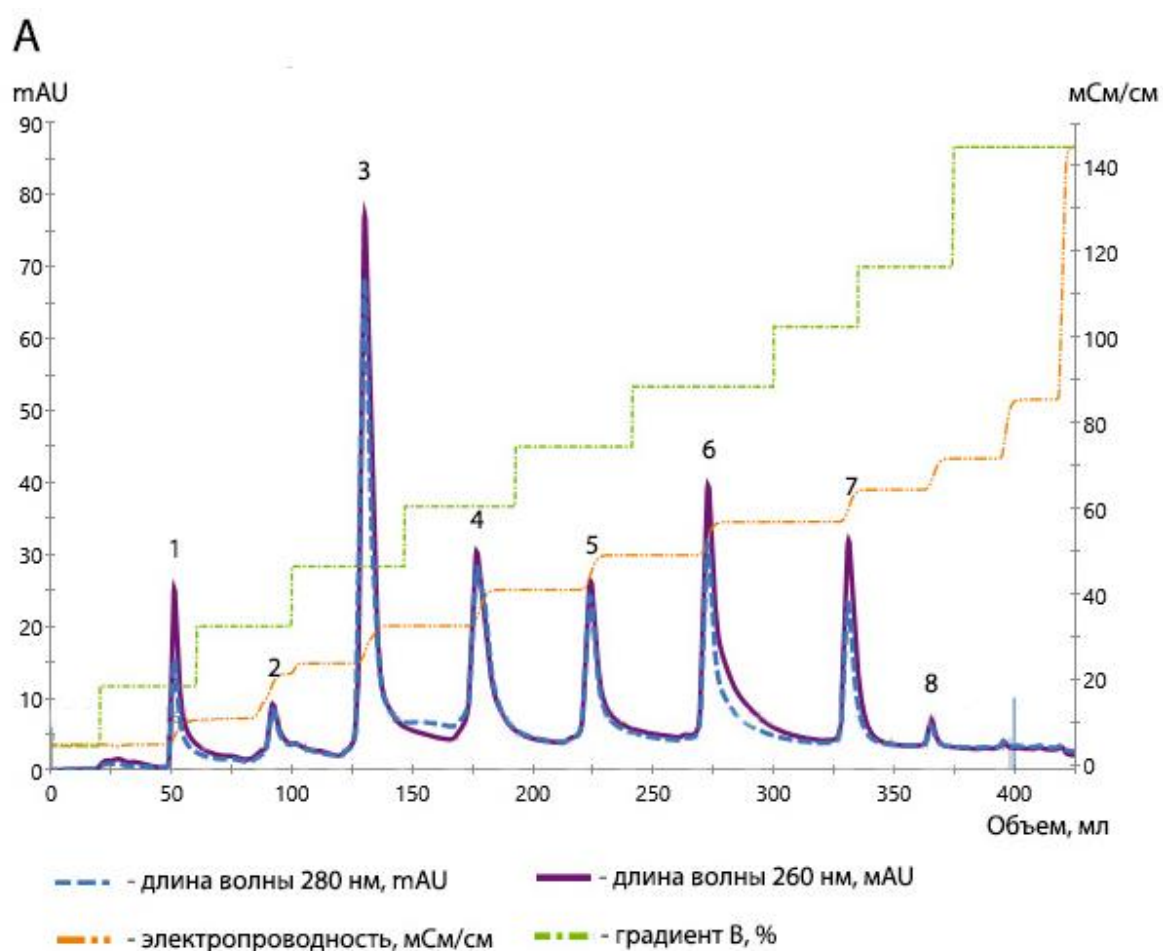


Рисунок 15 – Градиентная ионообменная хроматография на сорбенте Q Sepharose FF концентрата полиовируса типа 2 серии №1 (А) и №2 (Б) [101]

Таблица 7 – Результаты градиентной ионообменной хроматографии на сорбенте Q Sepharose FF концентрата полиовируса типа 2 серии №1

Номер пика	Концентрация натрия хлорида при элюировании пика	Степень извлечения, %	Степень очистки от балластных белков, %	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, %
1	100 мМ	8,4	96,4	100,0
2	200 мМ	5,1	95,3	100,0
3	300мМ	3,8	85,5	100,0
4	400 мМ	1,9	88,4	100,0
5	500 мМ	0,7	91,6	100,0
6	600 мМ	0,7	94,1	99,6
7	700 мМ	0,6	96,2	97,1
8	800 мМ	0,0	99,1	100,0

Таблица 8 – Результаты градиентной ионообменной хроматографии на сорбенте Q Sepharose FF концентрата полиовируса типа 2 серии №2

Номер пика	Концентрация натрия хлорида при элюировании пика	Степень извлечения, %	Степень очистки от балластных белков, %	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, %
1	100 мМ	30,7	92,5	100,0
2	200 мМ	2,7	88,3	100,0
3	300мМ	0,7	70,1	85,5

Увеличение концентрации натрия хлорида в буферном растворе приводит к увеличению содержания балластных белков и остаточной клеточной ДНК во фракциях. Дальнейшие эксперименты проводили с применением Раствора 2 в качестве элюирующего буферного раствора.

Результаты очистки трех серий концентратов полиовируса (Таблица 9), 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 9 – 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	

4.4 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.

4.4.1 Определение динамической связывающей способности разных сорбентов при очистке концентратов полиовируса от технологических примесей

Анализ полученных данных показал, что для эффективной очистки помимо концентрации соли в элюирующем растворе необходимо правильно рассчитывать также нагрузку на сорбент. Производители сорбентов указывают различную динамическую связывающую способность для различных белков, например, для тиреоглобулина (669 кДа), бычьего сывороточного альбумина (69 кДа), человеческого сывороточного альбумина (68 кДа),

овальбумина (45 кДа) [102–104]. В виду того, что разные производители указывают динамическую связывающую способность на разных белках с разной молекулярной массой и при разных условиях, ориентироваться на представленные данные для расчета нагрузки на сорбент не представляется возможным. Кроме того, от серии к серии концентраты полиовируса характеризуются разным содержанием общего белка и разной концентрацией остаточной клеточной ДНК. Определить оптимальную нагрузку на конкретный сорбент можно только экспериментальным путем.

При проведении ИОХ полиовируса типа 2 на сорбенте DEAE Sepharose FF (Cytiva) ИОХ сопровождалась значительными потерями при нагрузке более 1400 мг общего белка на 1 мл сорбента (Рисунок 16). На хроматограмме видно, что вначале элюирования (с 60 мл по 120 мл) происходило связывание технологических примесей, в частности балластных белков с сорбентом, т.е. происходило связывание отрицательно заряженных балластных белков с положительно заряженным сорбентом. Но когда все положительно заряженные частицы сорбента были связаны с технологическими примесями, балластные белки стали элюироваться вместе с полиовирусом (с 120 мл по 160 мл).

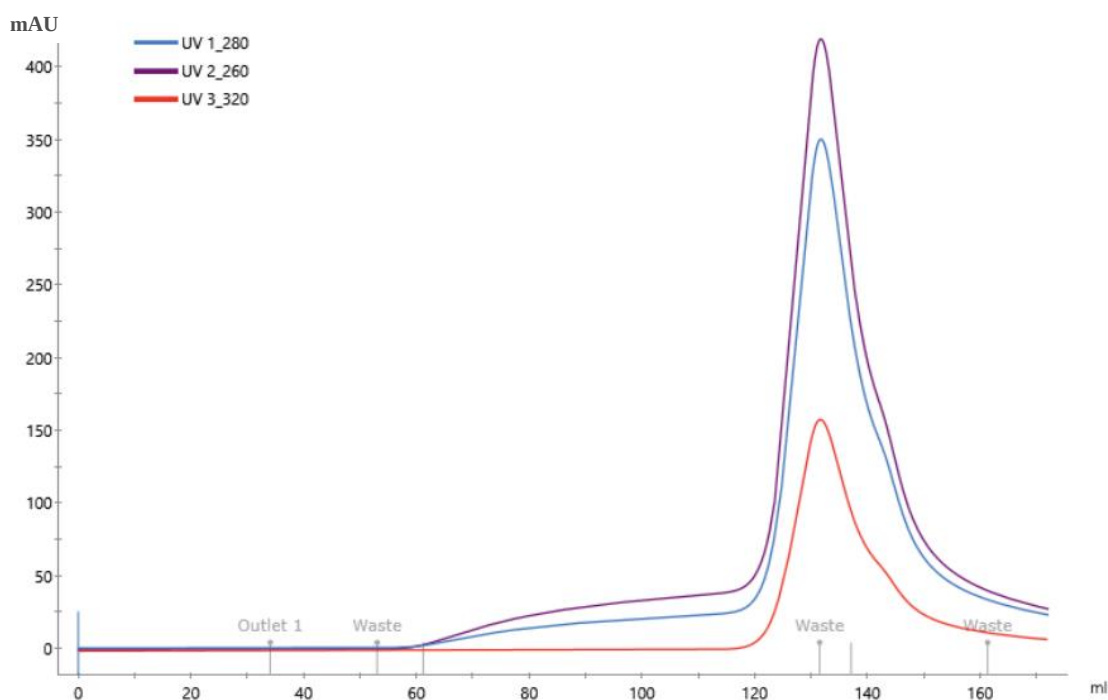


Рисунок 16 – Ионообменная хроматография концентрата полиовируса на сорбенте DEAE Sepharose FF (Cytiva) с нагрузкой 1400 мг общего белка на 1 мл сорбента

При снижении нагрузки до 1100 мг общего белка на 1 мл сорбента ИОХ была выполнена успешно со степенью извлечения более 70% и степенью очистки от балластных белков более 98%. Однако оптическая плотность постоянно нарастала в ходе элюирования (Рисунок 17). Можно предположить, что нагрузка не более 1100 мг общего белка на 1 мл сорбента при данных условиях является оптимальной для сорбента DEAE Sepharose FF (Cytiva).

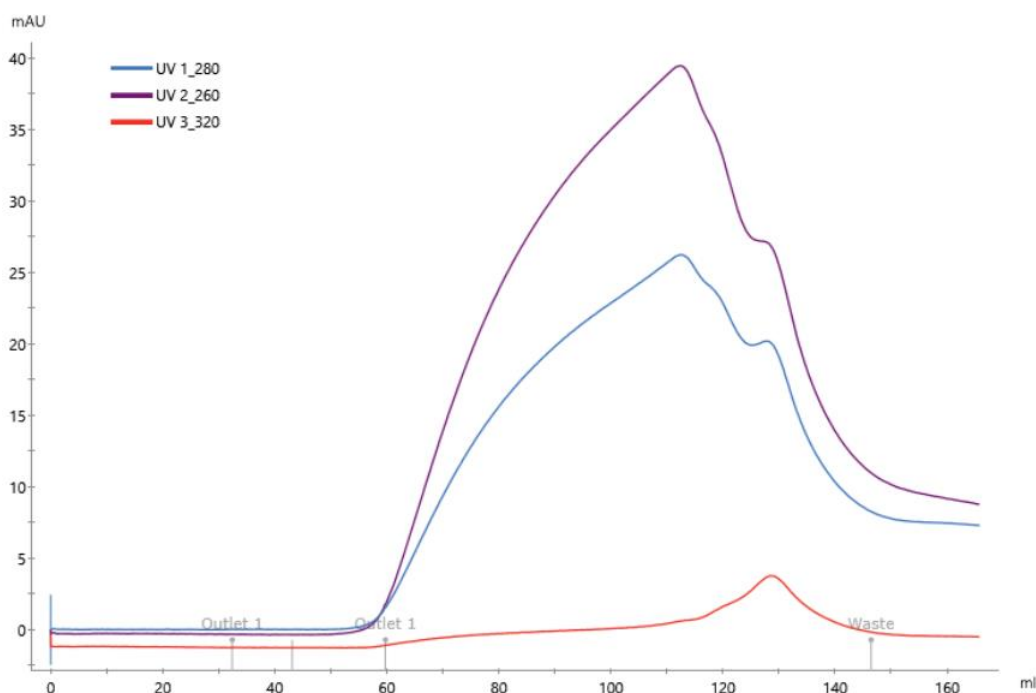


Рисунок 17 – Ионообменная хроматография концентрата полиовируса на сорбенте DEAE Sepharose FF (Cytiva) с нагрузкой 1100 мг общего белка на 1 мл сорбента

Сорбенты DEAE Sepharose FF (Cytiva) и DEAE Sepharose FF (Bio-Works) обладают одинаковой ионной емкостью. Производители указывают схожие характеристики для сорбентов. Однако в ходе экспериментов нагрузка неоднократно превышала 1100 мг общего белка на 1 мл сорбента DEAE Sepharose FF (Bio-Works). При проведении ИОХ концентрата полиовируса типа 2 при нагрузке 1500 мг на 1 мл сорбента ИОХ была выполнена успешно со степенью извлечения более 70% и степенью очистки от остаточной клеточной ДНК более 99,9%. Однако степень очистки от балластных белков составила 90,2%. Оптическая плотность постоянно нарастала в ходе элюирования и критично стала нарастать в конце элюирования на 110-120 мл (Рисунок 18). Можно допустить, что нагрузка не более 1500 мг общего белка на 1 мл сорбента при данных условиях является оптимальной для сорбента DEAE Sepharose FF (Bio-Works).

В ходе экспериментов было показано, что сорбент Capto DEAE (Cytiva) обладает большей динамической связывающей способностью в сравнении с сорбентами DEAE Sepharose FF (Cytiva) и DEAE Sepharose FF (Bio-Works). Только при нагрузке более 2000 мг общего белка на 1 мл сорбента ИОХ полиовируса типа 3 сопровождается значительными потерями (Рисунок 19). На хроматограмме видно, что вначале элюирования (с 60 мл по 100 мл) происходило связывание технологических примесей, но с 100 мл по 120 мл балластные белки стали элюироваться вместе с полиовирусом. При нагрузке 1870 мг ИОХ была выполнена с высокими показателями по степени извлечения и степени очистки от технологических примесей. Полученные результаты позволяют сделать предположение, что нагрузка более 1900 мг общего белка на 1 мл сорбента при данных условиях является критичной для сорбента Capto DEAE (Cytiva).

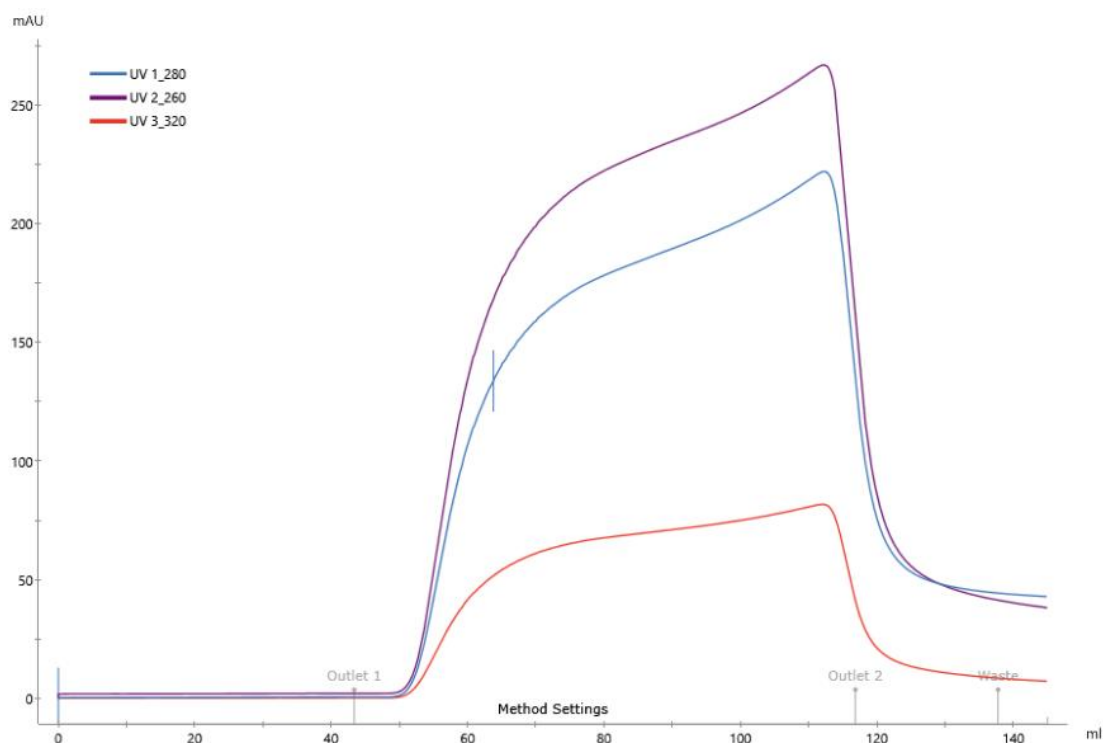


Рисунок 18 – Ионообменная хроматография концентрата полиовируса на сорбенте DEAE Sepharose FF (Bio-Works) с нагрузкой 1100 мг общего белка на 1 мл сорбента

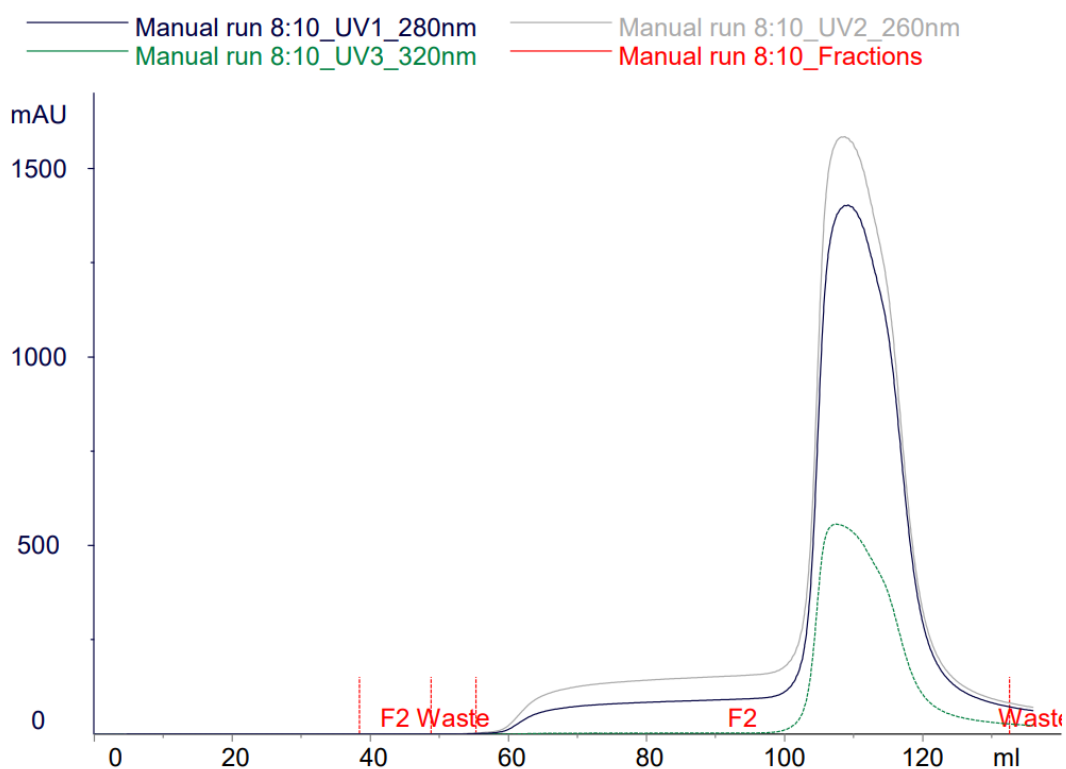


Рисунок 19 – Ионообменная хроматография концентрата полиовируса на сорбенте Carto DEAE (Cytiva) с нагрузкой более 2000 мг общего белка на 1 мл сорбента

4.4.2 Степень извлечения целевого антигена

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 20 и в Таблице 10.

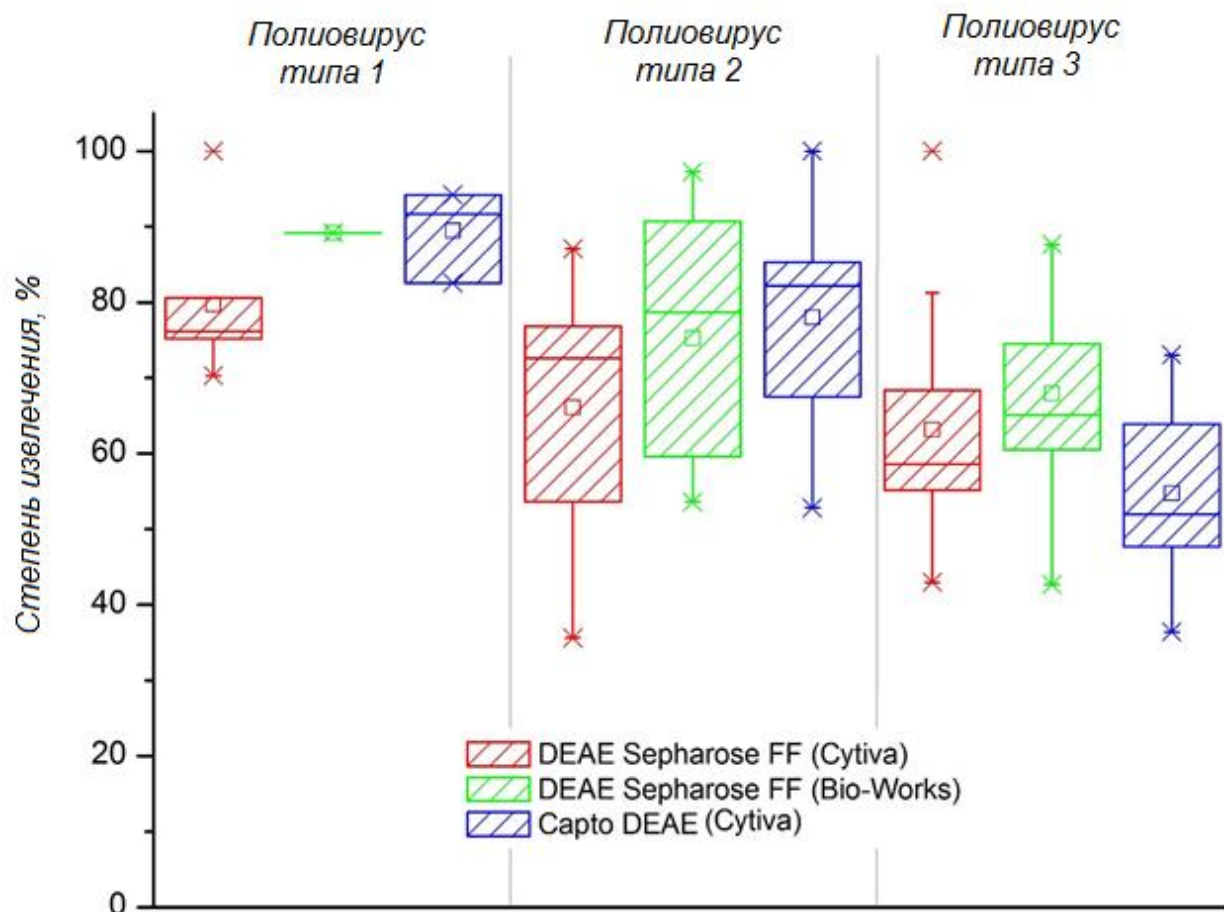


Рисунок 20 – Результаты ионообменной хроматографии концентратов полиовируса типа 1, типа 2 и типа 3 на трех сорбентах по показателю степени извлечения, представленные в виде медианы (Median) и интерквартильного размаха (Q1-Q3) [101]

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 ($p < 0.05$).

Таблица 10 – 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)

4.4.3 Степень очистки от остаточной клеточной ДНК

Показатели степени очистки от остаточной клеточной ДНК представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения в Таблице 11. Эксперименты по очистке концентратов полиовируса с помощью ИОХ в градиентном режиме с использованием фосфатного буфера, содержащего 100 мМ натрия хлорида, показали:

- степень очистки от остаточной клеточной ДНК составляет около 99%;
- концентрация клеточной ДНК не превышает 20 нг/мл.

Согласно требованиям Европейской Фармакопеи для инъекционных вакцин, полученных на основе клеточных культур, содержание остаточной клеточной ДНК в одной дозе не должно превышать 10 нг [63]. Таким образом, использование ИОХ позволяет гарантировать очистку вакцинного препарата от остаточной клеточной ДНК до допустимых пределов. Результаты проведения ИОХ в градиентном режиме (см. п.4.2.) 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. Данные таблицы 11 показывают, что 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 ($p > 0.05$).

Таблица 11 – Степень очистки от остаточной клеточной ДНК 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 очистки от остаточной клеточной ДНК, %	Количество опытов	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, %	Количество опытов	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, %
DEAE Sepharose FF (Cytiva)	2	99,99±0,00	11	99,91±0,17	19	99,94±0,11
DEAE Sepharose FF (Bio-Works)	1	100,00	3	100,00±0,00	7	99,81±0,16
Capto DEAE (Cytiva)	1	100,00	4	99,00±1,99	4	99,99±0,01

4.4.4 Очистка от белков клеток Vero

При контроле качества очищенных концентратов полиовирусов типа 1, типа 2 и типа 3 помимо анализа на общий белок проводили анализ на наличие белков клеток Vero. Результаты представлены на Рисунке 21.

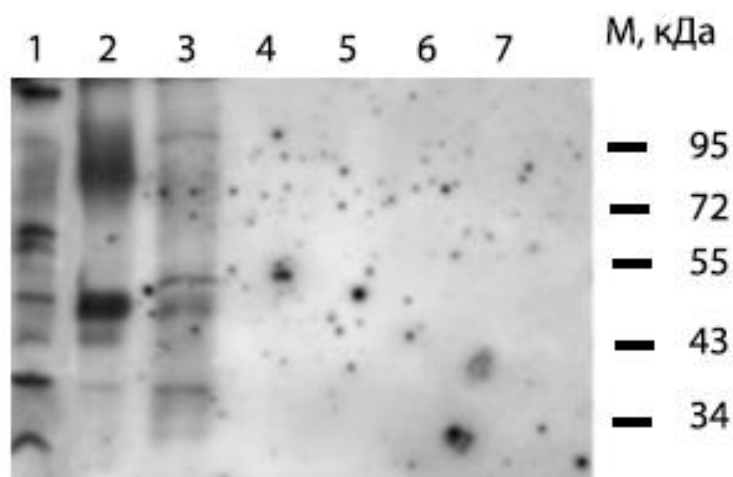


Рисунок 21 – Детекция белков клеток Vero методом иммуноблотинга в образцах: 1 – концентрат полиовируса типа 2 после ГФ; 2 – концентрат полиовируса типа 1 после ГФ; 3 – концентрат полиовируса типа 3 после ГФ; 4 – очищенный концентрат полиовируса типа 1 после ИОХ; 5 – очищенный концентрат полиовируса типа 2 после ИОХ; 6 – очищенный концентрат полиовируса типа 3 после ИОХ; 7 – инактивированная вакцина против полиомиелита [101]

Использовали образцы концентратов полиовирусов типов 1, 2 и 3 после ГФ, очищенных концентратов всех трех типов полиовируса после стадии ИОХ, а также образец серии инактивированной трехвалентной вакцины против полиомиелита. Образцы анализировали в денатурирующих условиях в иммуноблоте с использованием специфической поликлональной сыворотки к белкам клеток Vero. Как видно на Рисунке 21, в образцах концентрата полиовируса типа 2 после ГФ выявляются клеточные белки. А в образцах очищенного концентрата полиовируса после ИОХ клеточные белки не выявлены.

При проведении обменной хроматографии на сорбентах DEAE Sepharose FF и Capto DEAE сорбент имеет положительный заряд. Остаточная клеточная ДНК и балластные белки имеют отрицательный заряд, за счет чего происходит адсорбция технологических примесей (Рисунок 22).

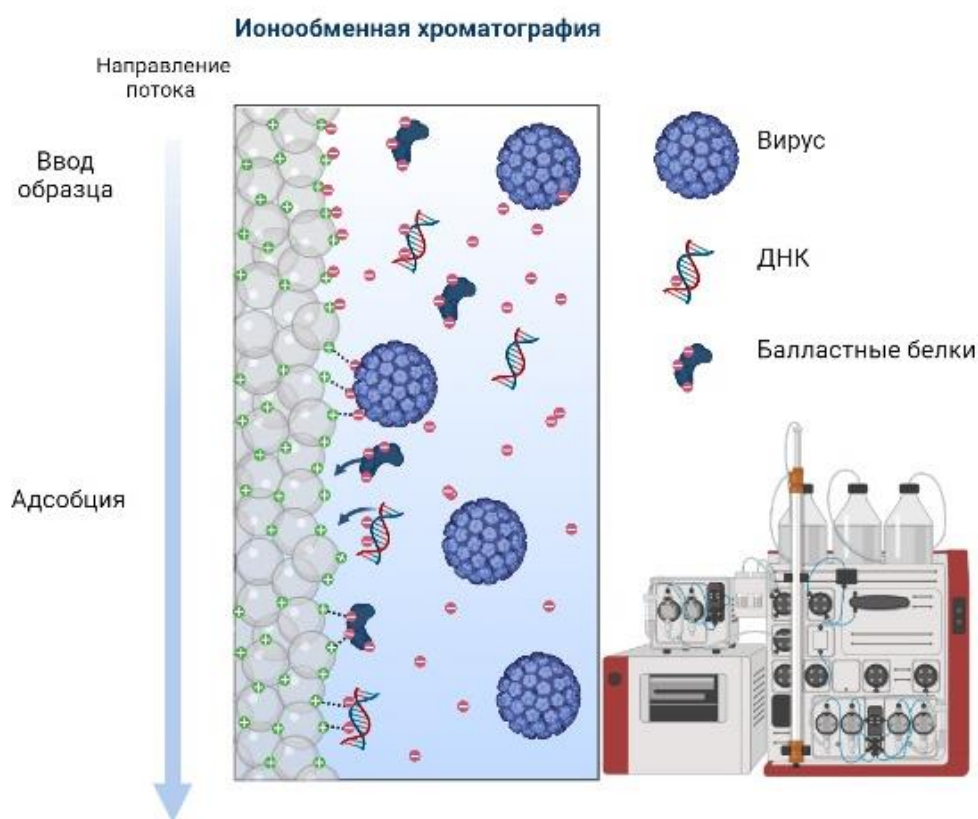


Рисунок 22 – Ионообменная хроматография полиовируса (рисунок сделан с помощью biorender.com) [101]

Анализ результатов градиентной ИОХ на разных сорбентах концентратов полиовируса типа 2 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 (Таблицы 5, 6, 7 и 8). На основании этих данных можно предположить, 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 было показано, что при использовании в качестве сорбента Carbo DEAE при очистке концентратов полиовирусов типа 1 и типа 2 показатели степени извлечения для обоих вирусных препаратов были высокими, т.е. содержание в них D-антигена были относительно высокими. В случае очистки концентратов полиовируса типа 3 оба показателя были значительно ниже показателей для вируса типа 1 и типа 2.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОЛИОМИЕЛИТА НА ОСНОВЕ ШТАММОВ СЭБИНА

5.1 Производство инаktivированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина

Основные этапы и биологическая схема производства разработанной нами инаktivированной вакцины против полиомиелита из аттенуированных штаммов Сэбина ПолиовакСин представлены на Рисунках 23 и 24. Производство вакцины включает несколько этапов:

1) наработка партий культуры-продуцента из пула аттестованного рабочего банка клеток с применением технологии культивирования клеток Vero на микроносителях в одноразовых биореакторах. Используется линейка биореакторов, которая начинается с биореактора волнового типа с рабочим объемом 10 литров и продолжается биореакторами с вертикальным типом перемешивания и с рабочими объемами 50, 200 и 1000 литров;

2) раздельная наработка вирусных суспензий каждого из трех серотипов полиовируса на культуре-продуценте. Для заражения в культуральный сосуд биореактора вносят вирус полиомиелита (один из трех штаммов Сэбина);

3) фильтрация и концентрирование полученных вирусных суспензий. Осветляющую и стерилизующую фильтрацию проводят через каскад нейлоновых фильтров с размерами пор 0,45 и 0,22 мкм после предварительной очистки от частиц микроносителя с помощью фильтра из нержавеющей стали (размер пор 70 мкм). Затем проводят концентрирование при помощи тангенциальных ультрафильтрационных систем через мембраны из полиэфирсульфона;

4) хроматографическая очистка вирусных концентратов на колонках с сорбентом WorkBeads 40/1000 SEC (ГФ);

5) хроматографическая очистка вирусных концентратов на колонках с анионообменным сорбентом DEAE Sepharose (ИОХ);

6) инаktivация очищенных вирусных концентратов формалином и стерилизующая фильтрация. Инаktivация проводится при температуре 37 °С в течение 12 суток при постоянном перемешивании. На 13-й день инаktivации проводится нейтрализация формалина. После нейтрализации очищенный инаktivированный моновалентный концентрат фильтруют через полиэфирсульфовую мембрану с диаметром пор 0,2 мкм;

7) карантинное хранение и контроль качества очищенного инаktivированного моновалентного концентрата вируса полиомиелита типа 1 / типа 2 / типа 3, включая контроль на специфическую безопасность;

8) сведение и розлив трехвалентного препарата;

9) контроль качества готового препарата, включая контроль на специфическую активность.



Рисунок 23 – Основные этапы производства вакцины ПолиовакСин



Рисунок 24 – Биологическая схема производства вакцины ПолиовакСин

5.2 Контроль качества на стадиях хромаографических очисток вирусных концентратов

Культивирование клеток на микроносителях позволяет достичь высокой концентрации клеток, что в свою очередь приводит к увеличению концентраций балластных белков и ДНК клеток-продуцентов. Кроме того, для культивирования клеток линии Vero при производстве вакцины ПолиовакСин используют питательную среду с добавлением сыворотки эмбрионов коров. Таким образом, в составе вируссодержащей жидкости, помимо белков клеток-продуцентов находятся различные белки сывороточного происхождения и производные питательных сред. И хотя содержание данных технологических примесей снижается после фильтрации и концентрирования, концентрация балластных белков, бычьего сывороточного альбумина и ДНК клеток-продуцентов остается недопустимо высокой.

5.2.1 Контроль качества на стадии гель-фильтрации

ГФ при производстве вакцины ПолиовакСин предназначена прежде всего для снижения концентрации балластных белков на более чем 85%. В связи с этим на данной стадии мы рекомендуем контроль качества по показателям:

- Общий белок;
- Содержание D-антигена.

Данные показатели позволят рассчитывать степень извлечения целевого антигена от серии к серии и предпринять меры при ухудшении разрешения между пиком целевого антигена и пиком балластных белков, например, переупаковать колонну для ГФ или заменить деформированный сорбент на новую партию сорбента. Кроме того, информация о концентрации общего белка позволит рассчитать нагрузку на сорбент для следующей стадии технологического процесса – ИОХ.

5.2.2 Контроль качества на стадии ионообменной хроматографии

Применение ИОХ позволяет снизить до регламентированных значений содержание общего белка (не более 300 мкг/мл), а содержание остаточной клеточной ДНК понизить до следовых количеств. Кроме того, после проведения ИОХ при разработанных условиях не обнаруживается бычий сывороточный альбумин. Для контроля степени извлечения целевого антигена рекомендуется определять содержание D-антигена.

Для препаратов, предназначенных для внутримышечного введения, таких как и вакцина Полиоваксин, в спецификацию конечного продукта должен быть включен показатель *Бактериальные эндотоксины* [105]. Эндотоксин является основным компонентом внешней клеточной стенки грамотрицательных бактерий и обладает высокой токсичностью. Эндотоксины

представляют собой липополисахариды (ЛПС). ЛПС является сильным стимулятором воспалительных реакций, действует в очень низких концентрациях и участвует в патогенезе сепсиса, септического шока и эндотоксемии. Эндотоксины вызывают воспалительную реакцию у человека при попадании в кровь в концентрации 1 нг эндотоксинов на 1 кг массы тела в течение одного часа [106]. ИОХ – это не конечная стадия производства, однако это заключительная стадия очистки при производстве вакцины ПолиовакСин. В связи с этим на данной стадии рекомендуется проводить контроль содержания бактериальных эндотоксинов. В соответствии требованиями общей фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины» (ОФС 1.2.4.0006.15) оценку данного показателя выполняют с помощью реактива, представляющего собой лизат клеток крови (амебоцитов) мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реактив). Принцип действия ЛАЛ-теста заключается в способности ЛАЛ-реактива специфически реагировать с эндотоксинами. В результате ферментативной реакции в реакционной смеси наблюдаются изменения, пропорциональные концентрации эндотоксинов [105]. ЛАЛ-тест позволяет проводить контроль в течение нескольких часов. Ввиду быстроты выполнения данного анализа, данный тест часто используют для постадийного контроля инъекционных препаратов.

Контроль качества по перечисленным показателям позволит не только получать на конечной стадии продукт соответствующий спецификации, но предотвратить излишние потери. Так, например, увеличение содержания остаточной клеточной ДНК и общего белка и/или снижение степени извлечения после ИОХ может свидетельствовать о необходимости замены сорбента. Содержание эндотоксинов более 30 ЕЭ/мл может свидетельствовать о нарушении режимов регенерации колонны и всей хроматографической системы.

Таким образом, на стадии проведения ИОХ мы рекомендуем проводить контроль по следующим показателям:

- Бактериальные эндотоксины;
- Остаточная клеточная ДНК;
- Бычий сывороточный альбумин;
- Общий белок;
- Содержание D-антигена.

5.3 Контроль качества фармацевтических субстанций и готовой лекарственной формы

5.3.1 Контроль качества фармацевтической субстанции

Для приготовления инактивированной вакцины против полиомиелита необходимо получить три фармацевтические субстанции:

- Очищенный инактивированный моновалентный концентрат вируса полиомиелита типа 1;
- Очищенный инактивированный моновалентный концентрат вируса полиомиелита типа 2;
- Очищенный инактивированный моновалентный концентрат вируса полиомиелита типа 3.

Согласно ОФС.1.1.0006.15 «Фармацевтические субстанции» необходим контроль качества по следующим показателям:

- Описание;
- Прозрачность;
- Цветность;
- pH;
- Стерильность;
- Бактериальные эндотоксины [107].

Для установления подлинности субстанции и количественного определения D-антигена необходимо проведение контроля с помощью иммуноферментного анализа.

При производстве инактивированных вакцин обязательным контролем на стадии получения фармацевтической субстанции является контроль по показателю «Эффективность инаktivации». Проведение контроля качества по этому показателю гарантирует отсутствие живого вируса в готовой вакцине.

Качество готового препарата напрямую зависит от качества фармацевтической субстанции. В связи с этим фармацевтические субстанции рекомендовано контролировать по таким показателям, как «Формальдегид», «Общий белок» и «Остаточная клеточная ДНК». Разработанная нами технология позволяет достичь высокой степени очистки от остаточной клеточной ДНК. Поэтому для контроля качества фармацевтической субстанции по показателю «Остаточная клеточная ДНК» рекомендовано задать критерий «не более 20 нг/мл». Это позволяет гарантировать содержание остаточной клеточной ДНК в готовой лекарственной форме (не более 10 нг/доза) и дает возможность исключить контроль по данному показателю при выпускающем контроле готовой лекарственной формы.

5.3.2 Контроль качества готовой лекарственной формы

Разработанная нами вакцина ПолиовакСин (Вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая из аттенуированных штаммов Сэбина) представляет собой раствор для внутримышечного введения 0,5 мл (1 доза). Состав вакцины описан в Таблице 12.

Таблица 12 – Состав вакцины ПолиовакСин на 1 дозу (0,5 мл)

Наименование компонента	Количество
Действующие вещества ¹ :	
Вирус полиомиелита тип 1, аттенуированный штамм Сэбина, инаktivированный	не менее 15 единиц D-антигена
Вирус полиомиелита тип 2, аттенуированный штамм Сэбина, инаktivированный	не менее 15 единиц D-антигена
Вирус полиомиелита тип 3, аттенуированный штамм Сэбина, инаktivированный	не менее 50 единиц D-антигена
Вспомогательные вещества:	
Полисорбат 80	Не более 500 мкг
Формальдегид	Не более 25 мкг
Среда 199 ² (10-кратный концентрат)	0,05 мл
Буферный раствор ³ (динатрия фосфат дигидрат, натрия дигидрофосфата дигидрат, натрия хлорид, вода для инъекций)	до 0,5 мл

Примечания:

1 - Культивированные на клетках Vero.

2 - Среда 199 представляет собой сложную смесь аминокислот, минералов, витаминов и других компонентов, разведенную в воде для инъекций: натрия хлорид, калия хлорид, кальция хлорид, магния сульфат, натрия фосфат двузамещенный, калия фосфат однозамещенный, железа (III) нитрат, глюкоза, натрия ацетат, L-аланин, L-аргинин моногидрохлорид, L-аспарагиновая кислота, L-цистеин гидрохлорид, L-цистин, L-глутаминовая кислота, L-глутамин, L-гистидин моногидрохлорид, гидрокси-L-пролин, глицин, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизин монохлорид, L-метионин, L-фенилаланин, L-пролин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин, L-валин, аскорбиновая кислота, D-биотин, кальциферол, холина хлорид, фолиевая кислота, менадион, мио-инозитол, амид никотиновой кислоты, никотиновая кислота, 4-аминобензойная кислота, кальция пантотенат, пиридоксаль гидрохлорид, пиридоксина гидрохлорид, ретинола ацетат, рибофлавин, DL-альфа-токоферол фосфат натриевая соль, тиамина гидрохлорид, аденин сульфат, аденозин трифосфат натриевая соль, холестерол, дезоксирибоза, глутатион, гуанина гидрохлорид, гипоксантин, твин 80, рибоза, тимин, урацил, ксантин, адениловая кислота.

3 - Состав на 0,5 мл буферного раствора:

динатрия фосфат дигидрат - 2,43 мг,

натрия дигидрофосфата дигидрат - 0,99 мг,

натрия хлорид - 2,92 мг,

вода для инъекций - до 0,5 мл.

Согласно ОФС.1.4.1.0007.15 «Лекарственные формы для парентерального применения» [108], ОФС.1.4.1.0004.15 «Вакцины и анатоксины» [109] и ОФС.1.7.1.0018.18 «Иммунологические лекарственные препараты» [110] выполняется ряд обязательных контролей по следующим показателям:

- Описание;
- Прозрачность;
- Цветность;
- Извлекаемый объем;
- Механические включения;
- pH;
- Стерильность;
- Бактериальные эндотоксины;
- Аномальная токсичность;
- Упаковка;
- Маркировка.

Для контроля качества действующего вещества нами введено два показателя качества:

- Подлинность;
- Специфическая активность (Количественное определение D-антигенов полиовирусов типов 1, 2 и 3 и иммуногенная активность на животных).

Для контроля качества вспомогательных веществ нами рекомендовано проводить контроль по показателям «Формальдегид» и «Полиосорбат 80». Это позволит контролировать содержание вспомогательных веществ в готовой лекарственной форме. Для обеспечения безопасности применения готового препарата обязателен контроль по показателю «Общий белок».

ГЛАВА 6. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИНЫ ПОЛИОВАКСИН

Для получения разрешения на проведение клинического исследования в Министерство здравоохранения Российской Федерации был предоставлен отчет о доклинических исследованиях, которые проводились на лабораторных базах ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П.Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Доклинические исследования были проведены в сравнении с вакциной Имовакс Полио. В результате проведенных иммунологических исследований отмечено, что однократное введение вакцины Полиовакс Син лабораторным животным вызывает формирование гуморального иммунитета, что позволило предположить о выраженных защитных свойствах исследуемого препарата по отношению к диким вирусам полиомиелита типов 1, 2 и 3. В отчете о доклинических исследованиях приведены данные, доказывающие что вакцина Полиовакс Син не токсична, не обладает аллегризирующим и иммунотоксическим действием, не проявляет эмбриотоксическое действие, а также не проявляет негативного влияния на репродуктивную функцию организма лабораторных животных. Исследуемая вакцина безопасна как для половозрелых, так и для неполовозрелых животных. Таким образом, в результате доклинических исследований было показано, что препарат обладает хорошей переносимостью и безопасностью. Это позволило рекомендовать проведение клинических исследований I фазы на здоровых добровольцах 18-60 лет с последующим проведением исследований на расширенном контингенте взрослых.

Для проведения клических исследований была получена серия вакцины Полиоваксин №IPV-04-09.17, произведенная по разработанной нами технологии. Контроль вакцины был выполнен в отделе контроля качества ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П.Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). В частности, был выполнен контроль по показателю «Специфическая активность» по общепринятой методике (European Pharmacopeia, 9th Edition). Основные показатели качества вакцины Полиоваксин № IPV-04-09.17 представлены в Таблице 13. Они полностью соответствовали требованиям спецификации на готовый продукт.

Таблица 13 – 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	Соответствует

№ п/п	Наименование показателя	Требования	Результаты контроля
		иммунизации экспериментальных животных. Индекс иммуногенности ЭД50 должен быть не менее 2 lg	
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

6.1 I фаза клинического исследования

6.1.1 Демографические и другие исходные характеристики добровольцев исследования

В первой фазе клинического исследования было отбрано 99 добровольцев в возрасте от 18 до 60 лет. 36 добровольцев после подписания Информированного согласия отказались от участия в исследовании без объяснения причин. Никаких процедур и обследований, в соответствии с Протоколом, на визите Скрининга добровольцам не проводилось. 3 добровольца не соответствовали критериям включения/невключения. 60 добровольцев были рандомизированы методом конвертов на 2 группы: 30 добровольцев были привиты вакциной ПолиовакСин однократно в дозе в 0,5 мл и 30 добровольцев были привиты Плацебо однократно в дозе в 0,5 мл (Рисунок 25) [90].



Рисунок 25 – Схема участия добровольцев в I фазе клинического исследования [90]

Статистическое сравнение демографических показателей с помощью двустороннего критерия Стьюдента не выявило значимых отличий между группами (при $p=0,05$) по демографическим и антропометрическим показателям, что говорит об однородности популяций добровольцев (Таблица 14) [90].

Таблица 14 – Средние демографические и антропометрические показатели всех добровольцев, участвующих в процедуре скрининга и соответствующих критериям включения в исследование

Показатели	Группа 1. Вакцина ПолиовакСин	Группа 2. Плацебо
Добровольцы	30	30
Женщины / Мужчины	16 / 14	11 / 19
Возраст, год среднее значение ± стандартное отклонение	37,4±11,4	32,5±11,4
Рост, метр среднее значение ± стандартное отклонение	1,72±0,09	1,75±0,11
Вес, кг среднее значение ± стандартное отклонение	74,6±10,7	77,4±9,5

6.1.2 Оценка реактогенности

Вакцинированные добровольцы находились под тщательным клиническим наблюдением в течение суток в условиях стационара.

Местные и системные реакции врач-исследователь регистрировал в течение первых 7 суток после вакцинации на основании ежедневного осмотра.

Всего врачами было зарегистрировано 3 реакции, из них 2 местных реакции и 1 – системная. Все нежелательные явления, о которых поступили сообщения, регистрировались вне зависимости от предполагаемой связи с проведенной вакцинацией. Данные по степени тяжести местных и системных реакций, отмеченных у добровольцев в течение первых семи дней после иммунизации вакциной ПолиовакСин или Плацебо представлены в Таблице 15 [90].

Таблица 15 – Оценка степени тяжести местных и системных реакций у добровольцев после вакцинации (первые семь дней после введения препаратов)

Группа наблюдения	Количество добровольцев	Количество зарегистрированных реакций с 1-го по 7-й день после вакцинации											
		Местные реакции						Системные реакции					
		Слабые		Средние		Сильные		Слабые		Средние		Сильные	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Группа 1. Вакцина ПолиовакСин	30	2	6,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Группа 2. Плацебо	30	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3,33	-	-
Всего	60	2	3,33	-	-	-	-	-	-	1	1,67	-	-

Как видно из таблицы, после вакцинации отмечалось 2 местных (3,33 %) реакции, и 1 системная (1,67 %) реакция.

В группе №1 (ПолиовакСин) отмечалось 2 местных (6,67 %) реакции у 2 добровольцев, системных реакций не отмечали. Через 20 минут после вакцинации у одного из добровольцев отмечалась болезненность в месте инъекции слабой степени выраженности (1 балл), которая прошла через 2 часа. На следующем визите (на вторые сутки после вакцинации) местные и системные реакции не отмечались. Еще у одного из добровольцев через 6 часов после вакцинации наблюдалась гиперемия в месте инъекции (1 см), слабой степени выраженности (1 балл). На вторые сутки после вакцинации реакция сохранялась (бледная гиперемия 1 см), выраженность реакции – 1 балл. На следующий день (третьи сутки после вакцинации) местные и системные реакции не отмечались.

В группе №2 (Плацебо) отмечалась 1 системная (3,33 %) реакция у 1 добровольца, местных реакций не отмечали. У одного добровольца через 40 минут после вакцинации отмечался подъем температуры до 37,8 °С (реакция средней степени выраженности, 2 балла). Через 20 минут температура тела нормализовалась (36,3 °С). На вторые сутки после вакцинации повышения температуры, а также местных реакций не отмечали.

Ни одна из выявленных местных или системных реакций не требовала назначения медикаментозной корректирующей терапии. Таким образом, во всех группах наблюдения у подавляющего большинства вакцинированных добровольцев реакций на введение исследуемых препаратов не зарегистрировано. Статистически значимых различий в количестве реакций между группами не обнаружено, $p > 0,999$ для точного теста Фишера.

На седьмые сутки после вакцинации добровольцам выдавался Дневник самонаблюдения, в которых ежедневно добровольцы отмечали состояние здоровья и фиксировали местные и системные реакции. Информация, отмеченная в Дневниках самонаблюдения, использовалась при оценке переносимости и безопасности исследуемых препаратов. Добровольцы ежедневно с 8 по 27 сутки после вакцинации должны были отмечать местные и системные реакции в Дневнике самонаблюдения. Ни у одного добровольца в период с 8 по 27 сутки после вакцинации местных и системных реакций зарегистрировано не было [90].

Физикальный осмотр привитых добровольцев, проведенный перед вакцинацией и при каждом посещении добровольцем клинической базы (с 1 по 7 сут после вакцинации, на 14 и 28 сутки после вакцинации), не выявил отклонений в состоянии здоровья привитых. Осмотр неврологом привитых добровольцев, проведенный на визите Скрининга, на первые и третьи сутки после вакцинации и в заключительный день исследования не выявил отклонений в

состоянии здоровья ни у одного из добровольцев. Стандартная ЭКГ в 12 отведениях проводилась во время визита Скрининга и на третий день после вакцинации не выявила отклонений в показателях ЭКГ ни у одного добровольца. Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии влияния внутримышечного введения вакцины ПолиовакСин и Плацебо на физикальные данные, на неврологический статус и на работу сердечной мышцы добровольцев.

6.1.3 Оценка безопасности

Оценка безопасности исследуемой вакцины основывалась на мониторинге за показателями клинического анализа крови, общего анализа мочи, биохимического анализа крови и IgE перед вакцинацией, на третий и 14 день после вакцинаций и в заключительный день исследования.

Большинство средних показателей биохимического анализа крови добровольцев в обеих группах наблюдения в процессе исследования изменялись незначительно и оставались в пределах нормы. Детальное изучение колебаний показателей биохимического анализа крови у добровольцев выявил незначительные индивидуальные изменения в динамике, не имеющие клинических проявлений [90].

Аллергизирующие свойства у вакцины «ПолиовакСин» не выявлены – показатели сывороточного IgE находились в пределах нормальных значений (до 100 МЕ/мл). В таблице 16 показатели IgE представлены описательные характеристики в виде медианы и межквартильного размаха, так как не соответствуют нормальному закону распределения. Анализ показателя IgE в динамике не выявил статистически значимых изменений как в группе 1 (ПолиовакСин), так и группе 2 (Плацебо).

Таблица 16 – Динамика IgE

Точка отбора крови	IgE, МЕ/мл
Норма	0-100
Группа 1. Вакцина ПолиовакСин	
Скрининг (N=30)	2 (1 ; 6,25)
На 3 сутки после вакцинации (N=30)	3 (2 ; 8,25)
На 14 сутки после вакцинации (N=30)	3 (1 ; 9,25)
Через 28 суток после вакцинации (N=30)	2 (1 ; 9,25)
Группа 2. Плацебо	
Скрининг (N=30)	3 (1 ; 16,75)
На 3 сутки после вакцинации (N=30)	4 (2 ; 25,25)
На 14 сутки после вакцинации (N=30)	5 (2 ; 17,25)
Через 28 суток после вакцинации (N=30)	2,5 (1 ; 14,25)

Результаты проведенных лабораторных исследований у добровольцев в возрасте 18-60 лет, подтвердили, 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 достоверные различия в показателях крови и мочи до вакцинации и на различные сроки 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 [90].

Было проведено двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование переносимости, реактогенности и безопасности препарата ПолиовакСин (Вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая из аттенуированных штаммов Сэбина) на добровольцах в возрасте 18-60 лет [90]. 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 [90].

2. Субъективно (на основании Дневников самонаблюдения) местных и системных реакций не было выявлено ни у одного добровольца [90].

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 [90].

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 явлениях не поступали, в процессе мониторинга исследования НЯ / СНЯ монитором не выявлено.

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, что позволяет продолжить регистрационные мероприятия, направленные на внедрение в клиническую практику отечественной вакцины, способствующей профилактике полиомиелита, и дальнейшее ее использование в рамках Национального календаря профилактических прививок.

6.2 II фаза клинического исследования

6.2.1 Демографические и другие исходные характеристики добровольцев исследования

В второй фазе клинического исследования было отбрано 213 добровольцев в возрасте 18-60 лет. Из них, на основании осмотра врача, лабораторных и инструментальных обследований в исследование было включено 200 добровольцев. Все добровольцы, прошедшие скрининг и включенные в исследование, были рандомизированы методом конвертов на 2 группы (Рисунок 26) [90]:



Рисунок 26 – Схема участия добровольцев в II фазе клинического исследования [90]

Группа 1. Вакцина ПолиовакСин – 100 добровольцев, которые были привиты вакциной ПолиовакСин однократно в дозе в 0,5 мл;

Группа 2. Вакцина Имовакс Полио – 100 добровольцев, которые были привиты вакциной Имовакс Полио однократно в дозе в 0,5 мл [90].

Статистическое сравнение демографических показателей с помощью двустороннего критерия Стьюдента не выявило значимых отличий между группами (при $p=0,05$) по демографическим и антропометрическим показателям, что говорит об однородности популяций добровольцев (Таблица 17) [90].

Таблица 17 – Средние демографические и антропометрические показатели всех добровольцев, участвующих в процедуре скрининга и соответствующих критериям включения в исследование

Показатели	Группа 1. Вакцина ПолиовакСин	Группа 2 Вакцина Имовакс Полио
Добровольцы	100	100
Женщины / Мужчины	59 / 41	61 / 39
Возраст, год среднее значение $\pm$ стандартное отклонение	32,1 $\pm$ 9,3	31,7 $\pm$ 9,1
Рост, метр среднее значение $\pm$ стандартное отклонение	1,71 $\pm$ 0,08	1,69 $\pm$ 0,08
Вес, кг среднее значение $\pm$ стандартное отклонение	73,4 $\pm$ 13,8	69,0 $\pm$ 12,1

6.2.2 Оценка переносимости и безопасности

6.2.2.1 Оценка переносимости и безопасности по местным и системным реакциям

Вакцинированные добровольцы находились под тщательным клиническим наблюдением в течение 2 часов в условиях стационара. Местные и системные реакции врач-исследователь регистрировал в течение первых 7 суток после вакцинации на основании ежедневного осмотра. Всего врачами было зарегистрировано 26 реакций, из них 13 местных (6,5 %) реакций, и 13 системных (6,5 %) реакций.

Данные по степени тяжести местных и системных реакций, отмеченных у добровольцев в течение первых семи дней после иммунизации вакциной ПолиовакСин или Имовакс Полио представлены в Таблице 18 [90].

Таблица 18 – Оценка степени тяжести местных и системных реакций у добровольцев после вакцинации (первые семь дней после введения препаратов)

Группа наблюдения	Количество добровольцев	Количество зарегистрированных реакций с 1-го по 7-й день после вакцинации											
		Местные реакции						Системные реакции					
		Слабые		Средние		Сильные		Слабые		Средние		Сильные	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Группа 1. Вакцина ПолиовакСин	100	7	7,0	1	1,0	-	-	7	7,0	1	1,0	-	-
Группа 2. Вакцина Имовакс Полио	100	5	5,0	-	-	-	-	5	5,0	-	-	-	-
Всего	200	12	6,0	1	0,5	-	-	12	6,0	1	0,5	-	-

В группе №1 (ПолиовакСин) отмечалось 16 реакций у 14 добровольцев, из них 8 местных (8,0 % от общего числа добровольцев в группе) реакций и 8 системных (8,0 % от общего числа добровольцев в группе) реакций, при этом, у двух добровольцев были и местные и системные реакции:

— У троих добровольцев после вакцинации отмечалась миалгия легкой степени выраженности (1 балл);

— У двух добровольцев после вакцинации отмечалась миалгия средней степени выраженности (2 балла);

— У пятерых добровольцев после вакцинации у добровольца отмечалась боль в месте инъекции при пальпации легкой степени выраженности (1 балл);

— У одного добровольца после вакцинации отмечались миалгия легкой степени выраженности (1 балл) и боль в месте инъекции при пальпации легкой степени выраженности (1 балл);

— У двоих добровольцев в момент вакцинации отмечалось предобморочное состояние (резкая слабость и головокружение) слабой степени выраженности (1 балл). Через 5 минут общее состояние добровольцев нормализовалось;

— У одного добровольца в момент вакцинации отмечалось предобморочное состояние (резкая слабость и головокружение) слабой степени выраженности (1 балл) и боль в месте инъекции слабой степени выраженности (1 балл). Через 3 минуты общее состояние добровольца нормализовалось.

На вторые сутки после вакцинации местные и системные реакции не отмечались ни у одного добровольца.

В группе №2 (Имовакс Полио) отмечалась 10 реакций у 10 добровольцев, из них 5 местных (5,0 % от общего числа добровольцев в группе) реакций и 5 системных (5,0 % от общего числа добровольцев в группе) реакций:

— У троих добровольцев после вакцинации отмечалась боль в месте инъекции при пальпации легкой степени выраженности (1 балл). На вторые сутки после вакцинации местные реакции не отмечались;

— У троих добровольцев после вакцинации отмечалась миалгия легкой степени выраженности (1 балл). На вторые сутки после вакцинации местные реакции не отмечались;

— У двоих добровольцев после вакцинации отмечалась миалгия легкой степени выраженности (1 балл). На третьи сутки после вакцинации местные реакции не отмечались;

— У одного добровольца в момент вакцинации отмечалась гиперемия в месте инъекции слабой степени выраженности (1 балл). На вторые сутки после вакцинации местные реакции не отмечались;

— У одного добровольца в момент вакцинации отмечалась гиперемия в месте инъекции слабой степени выраженности (1 балл). На третьи сутки после вакцинации местные реакции не отмечались.

Ни одна из выявленных местных или системных реакций не требовала назначения медикаментозной корректирующей терапии.

Таким образом, во всех группах наблюдения у подавляющего большинства вакцинированных добровольцев реакций на введение исследуемых препаратов не зарегистрировано. Статистически значимых различий в количестве добровольцев с отмеченными реакциями между группами не обнаружено. Уровень значимости для критерия Хи-квадрат составляет 0,514.

6.2.2.2 Оценка переносимости и безопасности по данным ЭКГ обследования и по данным физикального и неврологических осмотров

Физикальный осмотр привитых добровольцев, проведенный перед вакцинацией и при каждом посещении добровольцем клинической базы (с 1 по 7 сутки после вакцинации, на 14 и 28 сутки после вакцинации), не выявил отклонений в состоянии здоровья привитых.

Осмотр неврологом привитых добровольцев, проведенный перед вакцинацией, сразу после вакцинации, на третьи сутки после вакцинации и в последний день исследований не выявил отклонений в состоянии здоровья ни у одного из добровольцев.

Стандартная ЭКГ в 12 отведениях проводилась перед вакцинацией и на третьи сутки после вакцинации не выявила отклонений в показателях ЭКГ ни у одного добровольца.

Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии влияния внутримышечного введения вакцины ПолиовакСин и Имовакс Полио на физикальные данные добровольцев, на неврологический статус и на работу сердечной мышцы привитых.

6.2.2.3 Результаты оценки безопасности введения вакцины ПолиовакСин по влиянию на лабораторные показатели

Оценка безопасности вакцины ПолиовакСин основывалась на мониторинге за показателями клинического анализа крови, общего анализа мочи, биохимического анализа крови и IgE перед вакцинацией, на третий и 14 день после вакцинаций и в заключительный день исследования.

Большинство средних показателей общего анализа крови добровольцев в обеих группах наблюдения в процессе исследования изменялись незначительно и оставались в пределах нормы.

Статистически значимые различия по показателям клинического анализа крови между двумя группами наблюдались в единичных случаях и не повторялись на протяжении визитов. При анализе динамики показателей тенденции не прослеживались, средние показатели колебались в пределах нормы, обе группы имели сопоставимый статистический результат по анализу динамики для большинства показателей. Детальное изучение колебаний показателей клинического анализа крови у добровольцев выявил незначительные индивидуальные изменения в динамике, не имеющие клинических проявлений.

Большинство средних показателей биохимического анализа крови добровольцев в обеих группах наблюдения в процессе исследования изменялись незначительно и оставались в пределах нормы.

Аллергизирующие свойства у вакцины ПолиовакСин не были выявлены. Показатели сывороточного IgE находились в пределах нормальных значений (до 100 МЕ/мл) на протяжении всего исследования. В Таблице 19 показатели IgE представлены описательные характеристики в виде медианы и межквартильного размаха, так как не соответствуют нормальному закону распределения. Анализ показателя IgE в динамике не выявил статистически значимых изменений как в группе 1 (ПолиовакСин), так и группе 2 (Имовакс Полио).

Таблица 19 – Динамика IgE

Точка отбора крови	IgE, МЕ/мл
Норма	0-100
Группа 1. Вакцина ПолиоваксСин	
Клинический центр №1	
Скрининг (N=69)	8,84 (11 ; 76)
На 3 сутки после вакцинации (N=69)	9,22 (15 ; 28)
На 14 сутки после вакцинации (N=69)	11,3 (20 ; 81)
Через 28 суток после вакцинации (N=69)	11,59 (18 ; 89)
Клинический центр №2	
Скрининг (N=31)	15,55 (18 ; 92)
На 3 сутки после вакцинации (N=31)	22,88 (33 ; 14)
На 14 сутки после вакцинации (N=31)	20,41 (26 ; 44)
Через 28 суток после вакцинации (N=31)	23,27 (33 ; 19)
Группа 2. Вакцина Имовакс Полио	
Клинический центр №1	
Скрининг (N=71)	8,8 (13 ; 82)
На 3 сутки после вакцинации (N=71)	8,56 (13 ; 97)
На 14 сутки после вакцинации (N=71)	9,44 (15 ; 73)
Через 28 суток после вакцинации (N=71)	13,17 (29 ; 59)
Клинический центр №2	
Скрининг (N=29)	29,49 (43 ; 52)
На 3 сутки после вакцинации (N=29)	25,78 (33 ; 03)
На 14 сутки после вакцинации (N=29)	24,78 (35 ; 98)
Через 28 суток после вакцинации (N=29)	26,82 (40 ; 55)

Статистически значимые различия по показателям общего анализа мочи между двумя группами наблюдаются в единичных случаях, не повторяются на протяжении визитов. При анализе динамики показателей тенденции не прослеживаются, средние показатели колеблются в пределах нормы, обе группы имеют сопоставимый статистический результат по анализу динамики для большинства показателей.

Результаты проведенных лабораторных исследований у добровольцев в возрасте 18-60 лет, подтвердили, 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 в показателях крови и мочи до вакцинации и на различные сроки 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 [90].

6.2.3 Оценка иммуногенности

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 [92], 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 20 и 21 и на Рисунке 27.

Таблица 20 – 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 21 – Средние титры нейтрализующих антител против штаммов дикого полиовируса Mahoney, MEF-1 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 ПолиовакСин	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

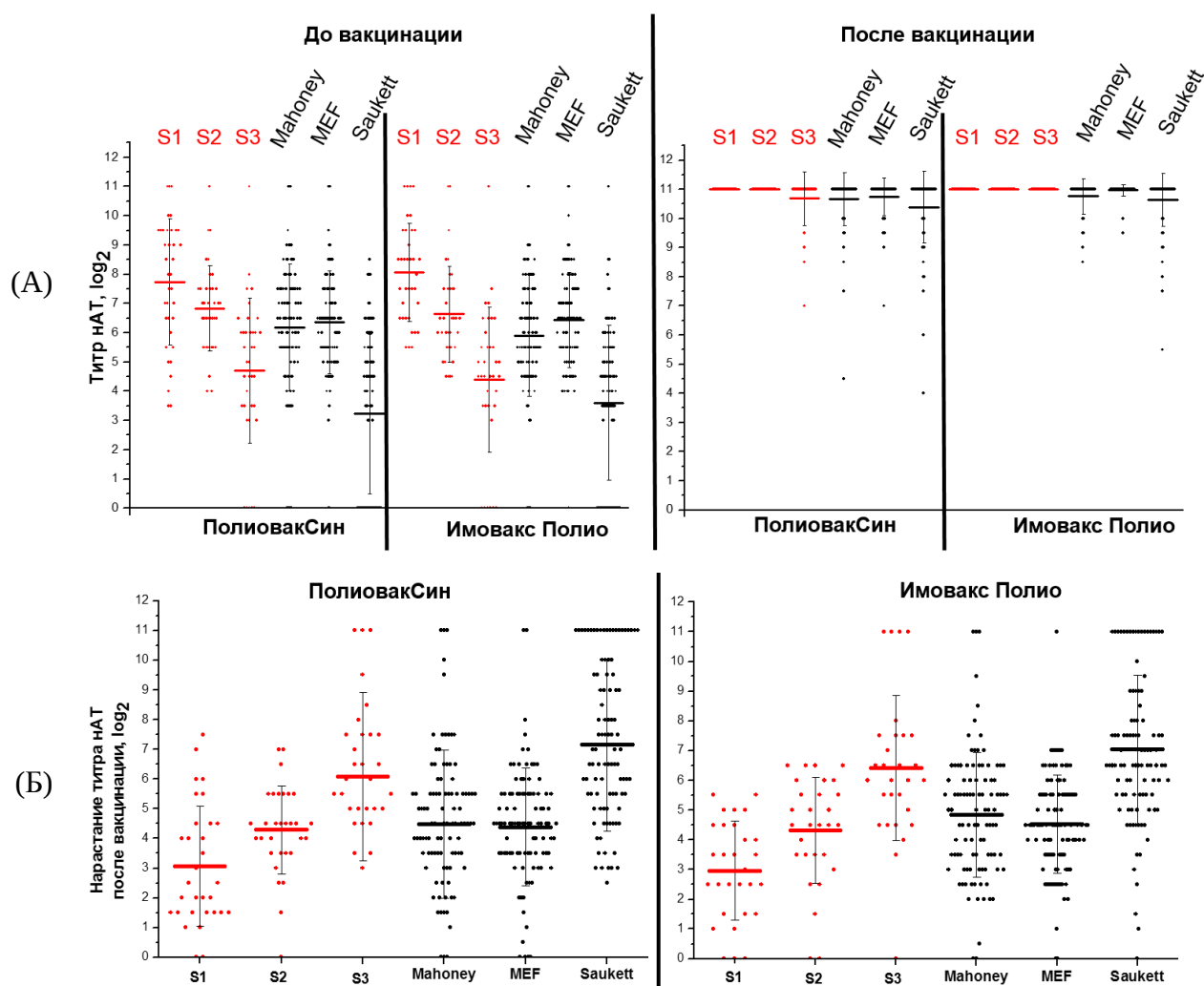


Рисунок 27 – Титры нейтрализующих антител против вакцинных штаммов полиовируса трех серотипов (S1, S2 и S3) и штаммов дикого полиовируса Mahoney, MEF-1 и Saukett, обнаруженных до и после вакцинации: (А) абсолютные значения (Б) Нарастание титра нейтрализующих антител после вакцинации. При расчетах титр менее 1:8 принимали за 0, титр более 1:1024 за титр 1:2048. Различия в нарастании титра нейтрализующих антител, индуцированных вакцинами ПолиовакСин и Имовакс Полио, статистически незначимы (критерий Манна–Уитни, $p < 0,05$) [90]

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. С 1957 года в СССР стала применяться ИПВ на основе диких штаммов вируса полиомиелита, а с 1958 – 1959 годов для массовой иммунизации начали применять ОПВ, приготовленную из аттенуированных штаммов Сэбина в виде трехвалентной вакцины, или моновалентных, или бивалентных препаратов. Поскольку, согласно Национальному календарю прививок России, ИПВ

используется для плановой иммунизации только с 2008 года [111], все добровольцы клинического исследования, проводимого в 2018 году, скорее всего, были вакцинированы трехвалентной ОПВ.

После вакцинации у всех участников были нейтрализующие антитела против всех протестированных полиовирусов, вакцинных и диких, в очень высоких титрах: 68 в группе ПолиовакСин 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 ПолиовакСин ($p < 0,05$). Однако различия между титрами нейтрализующих антител, индуцированными ПолиовакСин и Имовакс Полио до и после вакцинации, достоверно не различались ($p < 0,05$) [90].

Результаты исследования сывороток крови добровольцев, полученных на 28 сутки после вакцинации, в реакции микронеитролизации свидетельствуют об интенсивной активации гуморального звена иммунной системы добровольцев 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 [90]. 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 [90].

2. Субъективно (на основании Дневников самонаблюдения) было выявлено 3 нежелательных явления в виде системных реакций у двух добровольцев, привитых вакциной ПолиовакСин [90].

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 в показателях крови и мочи до вакцинации и на различные сроки 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 [90].

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 [90].

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 [90].

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, что позволяет продолжить регистрационные мероприятия, направленные на внедрение в клиническую практику отечественной вакцины, способствующей профилактике полиомиелита, и дальнейшее ее использование в рамках Национального календаря профилактических прививок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производства ИПВ являются потенциальными источниками диких штаммов полиовирусов в регионах, свободных от их циркуляции. Использование вакцинных штаммов Сэбина обеспечит дополнительную безопасность при производстве вакцин.

Несмотря на то, что разработка технологии производства сИПВ ведется с 1980-х г., промышленное производство сИПВ налажено только в Японии и Китае. В этих странах сИПВ применяется в программе рутинной иммунизации. Разработка технологии производства отечественной сИПВ обеспечит эпидемиологическое благополучие населения России.

Целью исследования явились два последовательных направления:

- изучение процессов очистки концентратов полиовируса при разработке технологии производства вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина, а также разработка критериев оценки эффективности проводимых хроматографических очисток;
- проведение клинических исследований для доказательства хорошей переносимости, безопасности и иммуногенности инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина.

По данным литературных источников в технологии получения инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов А. Сэбина для проведения гель-фильтрации использовали сорбент Sepharose CL-6B [48;49] с диапазоном фракционирования 10-4000 кДа [112]. К сожалению, авторы не приводят данные по выходу целевого антигена. Согласно нашим исследованиям применение сорбента с диапазоном фракционирования 10-4000 кДа сопровождается значительными потерями целевого антигена (более 50%), что привело к поиску более приемлемых сорбентов.

Нами показано, что 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. В исследованиях Y. Thomassen et.al для проведения ионообменной хроматографии применяли 20 мМ фосфатный буферный раствор [49] или 40 мМ фосфатный буферный раствор [50]. Нами было показано, что при проведении ионообменной хроматографии в фосфатном буферном

растворе без натрия хлорида происходит связывание D-антигена с сорбентом. 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 типа 3 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 [113]. Повидимому, 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

ПолиоакСин. Существенным вкладом в технологию изготовления вакцины является определение оптимальных параметров ионнообменной хроматографии, позволяющее снизить содержание остаточной клеточной ДНК практически до нуля, что делает инаktivированную 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 ПолиоакСин (Вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инаktivированная жидкая из аттенуированных штаммов Сэбина) для проведения клинических исследований.

Было проведено двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование переносимости, реактогенности и безопасности препарата ПолиоакСин на 60-ти добровольцах в возрасте 18-60 лет (I фаза) и двойное слепое сравнительное клиническое исследование переносимости, безопасности и иммуногенности препарата ПолиоакСин на 200-та добровольцах в возрасте 18-60 лет (II фаза). В качестве вакцины сравнения использована Имовакс Полио («Санофи Пастер», Франция) [90].

Результаты исследования иммуногенности вакцины ПолиоакСин показали нарастание титров нейтрализующих антител у всех добровольцев: как в группе вакцины ПолиоакСин, так и в группе вакцины Имовакс Полио [90]. 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 ПолиоакСин и Имовакс Полио. Однако титры против штаммов Сэбина типа 3, MEF-1 и Saukett, как правило, были немного ниже в группе, привитой вакциной ПолиоакСин, чем в группе, получившей дозу Имовакс Полио. Тем не менее, антитела, индуцируемые вакциной ПолиоакСин, могут нейтрализовать не только штаммы Сэбина, но и дикие штаммы полиовируса. Таким образом, профиль иммуногенности вакцины ПолиоакСин можно считать сопоставимым с вакциной Имовакс Полио [90].

Вакцина ПолиоакСин 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 инаktivированных 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 [46,68,71,75,76].

Результаты клинических исследований ПолиовакСин позволили продолжить регистрационные мероприятия, направленные на внедрение в клиническую практику отечественной вакцины и дальнейшее ее использование в рамках Национального календаря профилактических прививок. Вакцина ПолиовакСин зарегистрирована в РФ (Регистрационное удостоверение ЛП-007478, 07.10.2021).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Традиционно в качестве инактиватора вируса полиомиелита применяют раствор формалина. Однако процесс инаktivации вируса формалином является самой длительной и трудоемкой операцией при производстве вакцины. Процесс длится 13 суток, причем на 6-8 сутки необходимо проводить промежуточную фильтрацию полуфабриката (диаметр пор фильтра 0,22 мкм), чтобы удалить образовавшиеся агрегаты полиовируса, в которых, возможно, часть вирусных частиц экранируется и остается недоступной для взаимодействия с формалином. На 9 и 13 сутки инаktivации необходимо проводить отбор проб для контроля эффективности инаktivации. Данные операции должны проводиться в заразной зоне, что также может представлять опасность контаминации инаktivируемого полуфабриката.

Длительность процесса инаktivации оказывает негативное влияние на сохранность и активность самого целевого вирусного антигена и, как следствие, на протективную активность самой инаktivированной полиомиелитной вакцины.

Большую часть приведенных выше недостатков инаktivации вируса полиомиелита формалином можно избежать при замене его бета-пропиолактоном. Необходимо отработать технологию инаktivации вируса непосредственно в одноразовых культуральных сосудах биореакторов сразу после получения в них вирусных суспензий. Это позволит сократить длительность стадии инаktivации в 3-4 раза. Стадии фильтрации, ультрафильтрации, стадии хроматографических очисток будут проводиться уже не с живым, а с инаktivированным полиовирусом. Это значительно снизит производственные риски, связанные с соблюдением биобезопасности.

В случае успешной инаktivации полиовируса бета-пропиолактоном потребуются также оценить эффективность и надежность применяемых в настоящее время хроматографических очисток концентратов полиовируса. Необходима также оптимизация стадии ИОХ для концентрата полиовируса типа 3 с целью увеличения степени извлечения целевого антигена до 70% и выше, то есть до значений степени извлечения целевого антигена для концентратов полиовируса типа 1 и типа 2.

Новая инаktivированная 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 СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АД	- артериальное давление
БОПВ	- бивалентная пероральная полиомиелитная вакцина
ВАПП	- вакцино-ассоциированный паралитический полиомиелит
ВОЗ	- Всемирная организация здравоохранения
ГИЛП	- глобальной инициативы по ликвидации полиомиелита
ГФ	- гель-фильтрация
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДПВ1	- дикий полиовирус типа 1
ДПВ2	- дикий полиовирус типа 2
ДПВ3	- дикий полиовирус типа 3
ДПВ	- дикие полиовирусы
ИОХ	- ионообменная хроматография
ИПВ	- инактивированная вакцина против полиомиелита
ИФА	- иммуноферментный анализ
кДа	- килодальтон - единица массы, равная 1000 дальтон
ЛАЛ-тест	- теста на лизат амебоцитов Limulus
ЛПС	- липополисахариды
моПВ2	моновалентная пероральная полиомиелитная вакцина 2 типа
ноПВ2	- новая пероральная полиомиелитная вакцина 2-го типа
ноПВ1	- новой пероральной полиомиелитная вакцина 1-го типа
ноПВ3	- новой пероральной полиомиелитная вакцина 3-го типа
НЯ	- нежелательных явлений
ОСО БСА	- отраслевой стандартный образец бычьего сывороточного альбумина
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РБК Vero	- рабочий банк клеток Vero
РНК	- рибонуклеиновая кислота
СНЯ	- серьезных нежелательных явлений
тоПВ	- трехвалентная пероральная полиомиелитная вакцина
ТЦД ₅₀ /кл	- тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя
ЦПД	- цитопатическое действие
цПВВП1	- циркулирующий полиовирус вакцинного происхождения типа 1
цПВВП2	- циркулирующий полиовирус вакцинного происхождения типа 2

цПВВПЗ	- циркулирующий полиовирус вакцинного происхождения типа 3
ЦПЭ	- цитопатогенный эффект
ЧДД	- частота дыхательных движений
ЧСС	- частота сердечных сокращений
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭКГ	- электрокардиограмма
Нер-2	- культуру клеток эпидермоидной карциномы человека
IgE	- иммуноглобулины E
Me	- медианы (Median)
NIBSC	- National Institute for Biological Standards and Control (Национальный институт биологических стандартов и контроля)
SD	- стандартное отклонение
Q1-Q3	- интерквартильный размах
Vero	- перевиваемая культура клеток почек зеленой мартышки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванова, О.Е. Полиомиелит в современных условиях: достижения и перспективы / О.Е. Иванова // Журнал Инфектологии. – 2018. – Т. 10. – № 2. – С. 17-29. DOI: 10.22625/2072-6732-2018-10-2-17-29.
2. ПРИКАЗ от 6 декабря 2021 г. №1122н Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок. – 2021.
3. Стратегия ликвидации полиомиелита на 2022–2026 гг.: резюме [Polio Eradication Strategy 2022–2026: executive summary]. – Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2021 г. – 11 с.
4. Murph, J.R. Sabin inactivated trivalent poliovirus vaccine: first clinical trial and seroimmunity survey/ J.R. Murph, C. Grose, P. McAndrew, C. Mickiewicz, S. Mento, F. Cano, L. Radick, M. Ritchey, M.G. Stout // The Pediatric Infectious Disease Journal – 1988. – Т. 7 – № 11 – С. 760–764. DOI: 10.1097/00006454-198811000-00003.Sabin.
5. Shimizu, H. Development and introduction of inactivated poliovirus vaccines derived from Sabin strains in Japan / H. Shimizu // Vaccine. – 2016. – Т. 34. – № 16. – С. 1975-1985. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.11.015.
6. World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 64th World Medical Association General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013.
7. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 31 августа 2010 года № 774 н «О Совете по этике».
8. Постановление Правительства РФ от 13 сентября 2010 г. N 714 «Об утверждении типовых правил обязательного страхования жизни и здоровья пациента, участвующего в клинических исследованиях лекарственного препарата» (с изменениями и дополнениями от 18.05.2011 года, 4 сентября 2012 г., 15 октября 2014 г.)
9. Российская Федерация. Законы. Об обращении лекарственных средств. Федеральный закон № 61-ФЗ: [Принят Государственной Думой 24 марта 2010 г. : Одобрен Советом Федерации 31 марта 2010 г.]. – Москва: 2010 г.
10. Российская Федерация. Законы. Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации № 323-ФЗ: [Принят Государственной Думой 1 нояб. 2011 г. : Одобрен Советом Федерации 9 нояб. 2011 г.] – Москва: 2010 г.
11. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I, глава 7– М.: Гриф и К, 2013.

12. Правила надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза, утвержденные решением Совета Евразийской Экономической Комиссии № 79 от 03.11.2016 года. – 2016. – 43 с.
13. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 200н от 01.04.2016 года «Об утверждении правил надлежащей клинической практики». – 2016. – 23 с.
14. Rai, A. Polio returns to the USA: An epidemiological alert / A. Rai, O. Uwishema, L. Uweis Saleh R.E., Arab S., Abbass M., Wellington J., Musabirema F., Irem Adanur I., Onyeaka C.V.P. // *Annals of Medicine and Surgery*. – 2022. – Т. 82. – № August. – С. 104563. DOI: 10.1016/j.amsu.2022.104563.
15. Ишмухаметов, А.А. Разработка вакцинных препаратов для профилактики полиомиелита: современное состояние проблемы (обзор) / А.А. Ишмухаметов, А.А. Синюгина, К.М. Чумаков // *Современные технологии в медицине*. – 2019. – Т. 11. – № 4. – С. 200-215. DOI: 10.17691/stm2019.11.4.22.
16. Baicus, A. History of polio vaccination / A. Baicus // *World Journal of Virology*. – 2012. – Т. 1. – № 4. – С. 108-114. DOI: 10.5501/wjv.v1.i4.108.
17. Харит, С.М. Программа эрадикации полиомиелита ВОЗ: проблемы и решения / С.М. Харит, В.С. Покровский, А.А. Рулева, И.В. Фридман // *Педиатрическая фармакология*. – 2016. – Т. 13. – № 3. – С. 289-298. DOI: 10.15690/pf.v13i3.1580.
18. Strebel, P.M. Epidemiology of Poliomyelitis in the United States One Decade after the Last Reported Case of Indigenous Wild Virus-Associated Disease / P.M. Strebel, R.W. Sutter, S.L. Cochi, R.J. Biellik, E.W. Brink, O.M. Kew, M.A. Pallansch, W.A. Orenstein, A.R. Hinman // *Clinical Infectious Diseases*. – 1992. – Т. 14. – № 2. – С. 568-579. DOI: 10.1093/clinids/14.2.568
19. Иванов, А.П. Система иммуноферментного анализа на основе специфических антител класса (IgY) из яичных желтков для количественного определения D-антигена в инактивированных полиовирусных вакцинах / А.П. Иванов, В.Г. Козлов, Т.Д. Клеблеева, О.Е. Иванова, А.В. Киктенко // *Вопросы вирусологии*. – 2014. – Т. 59. – № 6. – С. 39-42.
20. van Wezel, A.L. Inactivated poliovirus vaccine: current production methods and new developments/ A. L. van Wezel, G. van Steenis, P. van der Marel, A. D. M. E. Osterhaus // *Reviews of infectious diseases*. – 1984. – Т. 6 – № 2 – С. 1984. DOI: 10.1093/clinids/6.supplement_2.s335.
21. Montagnon, B.J. Industrialscale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier / B.J. Montagnon, B. Fanget, J.C. Vincent-Falquet // *Reviews of Infectious Diseases*. – 1984. – Т. 6 – № 2 – С. 341-344. DOI: 10.1093/clinids/6.supplement_2.s341
22. Bernier, R.H. Improved inactivated poliovirus vaccine: an update / R.H. Bernier // *The Pediatric*

Infectious Disease Journal – 1986. – Т. 5. – С. 289-292. DOI: 10.1097/00006454-198605000-00003

23. Лашкевич, В.А. История создания в 1959 г. живой вакцины из аттенуированных штаммов А. Сэбина и идея искоренения полиомиелита / В.А. Лашкевич // Вопросы вирусологии. – 2013. – № 1. – С. 4-10.

24. Sabin, A.B. Live, orally given poliovirus vaccine. Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses / A.B. Sabin, M. Ramos-Alvarez, J. Alvarez-Amezquita, W. Pelon, R.H. Michaels, I. Spigland, M.A. Koch, J.M. Barnes, J.S. Rhim // Journal of the American Medical Association – 1960. – Т. 173. – С. 1521-1526.

25. Hinman, A.R. Landmark perspective: Mass vaccination against polio / A.R. Hinman // Journal of the American Medical Association – 1984. – Т. 251. – № 22. – С. 2994-2996.

26. Agol, V.I. Russian contribution to OPV / V.I. Agol, S.G. Drosdov // Biologicals. – 1993. – Т. 21. – С. 321-325.

27. Patriarca, P.A. Randomised trial of alternative formulations of oral poliovaccine in Brazil / P.A. Patriarca, F. Laender, G. Palmeira, M.J. Oliveira, J. Lima Filho, M.C. Dantes, M.T. Cordeiro, Jr.J.B. Risi, W.A. Orenstein // The Lancet. – 1988. – Т. 1. – № 8583. – С. 429-433.

28. Expanded programme on immunization. Global Advisory Group--Part II. // The Weekly Epidemiological Record – 1991. – Т. 66 – С. 9–12.

29. Prevots, D.R. Completeness of reporting for paralytic poliomyelitis, United States, 1980 through 1991. Implications for estimating the risk of vaccine-associated disease / D.R. Prevots, R.W. Sutter, P.M. Strebel, R.E. Weibel, S.L. Cochi // The Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine – Т. 148 – № 5 – С. 479–485.

30. Global Polio Eradication Initiative: Polio Eradication and Endgame Strategic Plan 2013-2018. – Geneva: World Health Organization, 2013. – 124 с.

31. Global eradication of poliomyelitis by the year 2000. – Geneva: World Health Organization, 1988. – 2 с.

32. Global Polio Eradication Initiative: strategic plan 2001 – 2005. – Geneva: World Health Organization, 2000. – 21 с.

33. Global Polio Eradication Initiative: strategic plan 2004-2008. – Geneva: World Health Organization, 2003. – 40 с.

34. Global Polio Eradication Initiative. Annual Report 2009. – Geneva: World Health Organization, 2010. – 52 с.

35. Global Polio Eradication Initiative: strategic plan 2010-2012. – Geneva: World Health Organization, 2010. – 59 c.
36. Global Polio Eradication Initiative: Polio Endgame Strategy 2019–2023: Eradication, integration, certification, and containment. – Geneva: World Health Organization, 2019. – 55 c.
37. Shabbir, H. Poliomyelitis in Pakistan : Challenges to polio eradication and future prospects / H. Shabbir, S. Saeed, M. Farhan, K. Abbas, M. Ebad ur Rehman, F. Gul, J. Basit // *Annals of Medicine and Surgery* – 2022. – T. 80 – № 104274 – C. 1–3. DOI: 10.1016/j.amsu.2022.104274.
38. Tharwani, Z.H. Polio amid a humanitarian crisis in Afghanistan: challenges and recommendations / Z.H. Tharwani, S.K. Shaeen, M.S. Arshad, M.A. Khalid, Z. Islam, A. Nemat, M.Y. Essar // *The Lancet Infectious Diseases* – 2022. – T. 22 – № 2 – C. 168–169. DOI: 10.1016/S1473-3099(22)00004-4
39. Chunda, P. The 2022 Malawi Polio outbreak / P. Chunda, M.N. Chisema, A. Mwale, D. Kambalame, D. Mapemba, A.S. Muula // *Malawi Medical Journal* – 2022. – T. 34 – September – C. 223–224. DOI: 10.4314/mmj.v33i2.1.https.
40. Rachlin, A. Progress Toward Polio Eradication — Worldwide , January 2020 – April 2022 / A. Rachlin, J.C. Patel, C.C. Burns, J. Jorba, G. Tallis, A. O’Leary, S.G.F. Wassilak, J.F. Vertefeuille // *Morbidity and Mortality Weekly Report Progress* – 2022. – T. 71 – № 19 – C. 650–655.
41. Javed, H. Global polio eradication; can we replicate the smallpox success story? / H. Javed, M.A. Rizvi, Z. Fahim, M. Ehsan, M. Javed, M.A. Raza // *Medical Virology* – 2022. – T.2409. DOI: 10.1002/rmv.2409.
42. John, T.J. Lessons from Vaccine-Related Poliovirus in Israel , UK and USA / T.J. John, D. Dharmapalan // *Vaccines* – 2022. – T. 10 – № 1969 – C. 1–9. DOI: 10.3390/vaccines10111969
43. Cooper, L.V. Risk factors for the spread of vaccine-derived type 2 polioviruses after global withdrawal of trivalent oral poliovirus vaccine and the effects of outbreak responses with monovalent vaccine : a retrospective analysis of surveillance data for 51 countries / L.V. Cooper, A.S. Bandyopadhyay, N. Gumede, O. Mach, P. Mkanda, M. Ndoutabé, S.O. Okiror, A. Ramirez-Gonzalez, K. Touray, S. Wanyoike, N.C. Grassly, I.M. Blake // *The Lancet Infectious Diseases* – 2022. – T. 22 – C. 284–294. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00453-9.
44. Zuckerman, N.S. Emergence of genetically linked vaccine-originated poliovirus type 2 in the absence of oral polio vaccine , Jerusalem , April to July 2022. / N.S. Zuckerman, I. Bar-Or, D. Sofer, E. Bucris, H. Morad, L.M. Shulman, N. Levi, W. Leah, I. Aguvaev, Z. Cohen, K. Kestin, R. Vasserman, M. Elul, I.S. Fratty, M. Geva, W. Marina, O. Erster, R. Yishai, L. Hecht-Sagie, S. Alroy-Preis, E. Mendelson, M. Weil // *Euro Surveill* – 2022. – T.27 – №37 – C. 1–6. DOI: 10.2807/1560-

7917.ES.2022.27.37.2200694

45. Bakker, W.A.M. Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV / W.A.M. Bakker, Y.E. Thomassen, A.G. van't Oever, J. Westdijk, M.G.C.T. van Oijen, L.C. Sundermann, P. van't Veld, E. Sleeman, F.W. van Nimwegen, Ahd Hamidia, G.F.A. Kersten, N. van den Heuvel, J.T. Hendriks, L.A. van der Pol // Vaccine – 2011. – T. 29 – № 41 – C. 7188–7196. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.079.
46. Liao, G. Safety and Immunogenicity of Inactivated Poliovirus Vaccine Made From Sabin Strains: A Phase II, Randomized, Positive-Controlled Trial / G. Liao, R. Li, C. Li, M. Sun, Y. Li, J. Chu, S. Jiang, Q. Li // Journal of Infectious Diseases – 2012. – T. 205 – № 2 – C. 237–243. DOI: 10.1093/infdis/jir723.
47. Simizu, B. Development of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains / B. Simizu, S. Abe, H. Yamamoto, Y. Tano, Y. Ota, M. Miyazawa, H. Horie, K. Satoh, K. Wakabayashi // Biologicals – 2006. – T. 34 – № 2 – C. 151–154. DOI: 10.1016/j.biologicals.2006.02.010.
48. Thomassen, Y.E. Multivariate data analysis on historical IPV production data for better process understanding and future improvements / Y.E. Thomassen, E.N.M. van Sprang, L.A. van der Pol, W.A.M. Bakker // Biotechnology and Bioengineering. – 2010. – T. 107. – № 1. – C. 96-104. DOI: 10.1002/bit.22788.
49. Thomassen, Y.E. Next generation inactivated polio vaccine manufacturing to support post polio-eradication biosafety goals / Y.E. Thomassen, A.G. van 't Oever, M.G.C.T. van Oijen, R.H. Wijffels, L.A. van der Pol, W.A.M. Bakker // PLoS ONE. – 2013. – T. 8. – № 12. – C. 1-12. DOI: 10.1371/journal.pone.0083374.
50. Thomassen, Y.E. Scale-down of the inactivated polio vaccine production process / Y.E. Thomassen, A.G. van 't Oever, M. Vinke, A. Spiekstra, R.H. Wijffels, L.A. van der Pol, W.A.M. Bakker // Biotechnology and Bioengineering. – 2013. – T. 110. – № 5. – C. 1354-1365. DOI: 10.1002/bit.24798.
51. Montagnon, B.J. Industrial-Scale Production of Inactivated Poliovirus Vaccine Prepared by Culture of Vero Cells on Microcarrier / B.J. Montagnon, B. Fanget, J.C. Vincent-Falquet // Reviews of Infectious Diseases – 1984. – T. 6 – № 2 – C.341-344.
52. Montagnon, B.J. The large-scale cultivation of VERO cells in micro-carrier culture for virus vaccine production. Preliminary results for killed poliovirus vaccine/ B.J. Montagnon, B. Fanget, J.C. Vincent-Falquet // Reviews of Infectious Diseases – 1981. – T. 47 – C. 55–64.
53. van Wezel, A.L. New approach to the production of concentrated and purified inactivated polio and rabies tissue culture vaccines / A.L. van Wezel, G. van Steenis, C.A. Hannik, H. Cohen // Developments

in biological standardization – 1978. – Т. 41 – С. 159–168.

54. Wang, Y. Bead-to-bead transfer of Vero cells in microcarrier culture / Y. Wang, F. Ouyang // *Cytotechnology* – 1999. – Т. 31 – № 3 – С. 21–224. DOI: 10.1023/A:1008079013375.

55. Yang, J. Large-scale microcarrier culture of HEK293T cells and Vero cells in single-use bioreactors / J. Yang, P. Guertin, G. Jia, Z. Lv, H. Yang, D. Ju // *AMB Express*. – 2019. – Т. 9. – № 1. – С. 1-14. DOI: 10.1186/s13568-019-0794-5.

56. Thomassen, Y.E. Improved poliovirus D-antigen yields by application of different Vero cell cultivation methods / Y.E. Thomassen, O. Rubingh, R.H. Wijffels, L.A. van der Pol, W.A.M. Bakker // *Vaccine*. – 2014. – Т. 32. – № 24. – С. 2782-2788. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.022.

57. Ковпак, А.А. Применение ультрафильтрационных мембран для очистки и концентрирования вируса полиомиелита типа 1 штамм Сэбина / А.А. Ковпак, Ю.Ю. Ивин, А.Н. Пиняева, Ю.Х. Хапчаев, С.В. Ожерелков, А.В. Белякова, А.А. Ишмухаметов // *Журнал Микробиологии, Эпидемиологии и Иммунологии*. – 2021. – Т. 98. – № 2. – С. 135-143. DOI: 10.36233/0372-9311-94.

58. Thomassen, Y.E. Transfer of an adherent Vero cell culture method between two different rocking motion type bioreactors with respect to cell growth and metabolic rates / Y.E. Thomassen, J.E. van der Welle, G. van Eikenhorst, L.A. van der Pol, W.A.M. Bakker // *Process Biochemistry*. – 2012. – Т. 47. – № 2. – С. 288-296. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.11.006

59. Bakker, W.A.M. Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV / W.A.M. Bakker, Y.E. Thomassen, A.G. van't Oever, Westdijk J., M.G.C.T. van Oijen, L.C. Sundermann, P. van't Veld, E. Sleeman, F.W. van Nimwegen, Hamidi A., G.F.A. Kersten, N. van den Heuvel, J.T. Hendriks, L.A. van der Pol // *Vaccine* – Т. 29 – № 41 – С. 7188–7196. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.079

60. Ягшис, Г. БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО. Разработка, проектирование и внедрение производственных процессов / Г. Ягшис, Е. Линдског, К. Лаки, П. Галлихер; под ред. А.А. Ишмухаметова, Н.В.Пятигорской – СПб.: Издательство Профессия, 2020. – 2 тома, 1488 (728+760) с.

61. Andreani, N.A. Potential neoplastic evolution of Vero cells: in vivo and in vitro characterization / N.A. Andreani, S. Renzi, G. Piovani, P.A. Marsan, L. Bomba, R. Villa, M. Ferrari, S. Dotti // *Cytotechnology*. – 2017. – Т. 69. – № 5. – С. 741-750. DOI: 10.1007/s10616-017-0082-7.

62. Recommendations and guidelines for biological substances used in medicine and other documents. WHO Technical Report Series №897. – 2000. – 106 с.

63. European Pharmacopeia, 9th Edition. – 2017. – 4016 с.
64. Duizer, E. Risk assessment, risk management and risk-based monitoring following a reported accidental release of poliovirus in Belgium , September to November 2014 / E. Duizer, A. Maria, D.R. Husman, J. Schijven // *Eurosurveillance*. – 2016. – Т. 21. – № 11. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.11.30169.
65. Duizer, E. Response to a wild poliovirus type 2 (WPV2) -shedding event following accidental exposure to WPV2 , the Netherlands , April 2017 / E. Duizer, W.L.M. Rutjes, C.P. van der Weijden, Timen A. // *Eurosurveillance*. – 2017. – Т. 22. – № 21. – С. 1-5. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.21.30542.
66. Чумаков, К. Вакцины против полиомиелита: настоящее и будущее / К. Чумаков, А.А. Ишмухаметов // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. – 2018. – Т. 17. – № 3. – С. 4-18. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-4-18.
67. Иванов, А.П. Экспериментальные подходы к разработке инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина / А.П. Иванов, Т.Д. Клеблеева, О.Е. Иванова Л.В. Гмыль, А.А. Ишмухаметов // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. – 2016. – Т. 4. – № 89. – С. 59-64. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-4-59-64
68. Okada, K. Phase II and III clinical studies of diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine containing inactivated polio vaccine derived from sabin strains (DTaP-sIPV) / K. Okada, C. Miyazaki, Y. Kino, T. Ozaki, M. Hirose, K. Ueda// *Journal of Infectious Diseases*. – 2013. – Т. 208. – № 2. – С. 275-283. DOI: 10.1093/infdis/jit155.
69. Liao, G. Phase 3 trial of a sabin strain-based inactivated poliovirus vaccine / G. Liao, R. Li, C. Li M. Sun, S. Jiang, Y. Li, Z. Mo, J. Xia, Z. Xie, Y. Che, J. Yang, Z. Yin, J. Wang, J. Chu, W. Cai, J. Zhou, J. Wang, Q. Li // *Journal of Infectious Diseases*. – 2016. – Т. 214. – № 11. – С. 1728-1734. DOI: 10.1093/infdis/jiw433.
70. Resik, S. Reactogenicity and immunogenicity of inactivated poliovirus vaccine produced from Sabin strains: A phase I Trial in healthy adults in Cuba / S. Resik, A. Tejada, M. Fonseca Alemañi N., M. Diaz, Y. Martinez, G. Garcia, H. Okayasu, A. Burton, W.A.M. Bakker, P. Verdijk, R.W. Sutter // *Vaccine*. – 2014. – Т. 32. – № 42. – С. 5399-5404. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.07.109
71. Nakano, T. A phase 2 study of a combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine with a Sabin-derived inactivated poliovirus vaccine in children / T. Nakano, S. Sumino, Y. Takanami, N. Mitsuya, K. Nakatome // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2018. – Т. 00. – № 00. – С. 1-10. DOI: 10.1080/21645515.2018.1504538.

72. Yongue, J. A distinctive nation: Vaccine policy and production in Japan / J. Yongue // *The politics of vaccination: A global history*. – 2017. – С. 209-235.
73. Satoh, H. Polio vaccination coverage and seroprevalence of poliovirus antibodies after the introduction of inactivated poliovirus vaccines for routine immunization in Japan / H. Satoh, K. Tanaka-Taya, H. Shimizu, A. Goto, S. Tanaka, T. Nakano, C. Hotta, T. Okazaki, M. Itamochi, M. Ito, R. Okamoto-Nakagawa, Y. Yamashita, S. Arai, H. Okuno, S. Morino, K. Oishi // *Vaccine*. – 2019. – Т. 37. – № 14. – С. 1964-1971. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.02.034.
74. Sutter, R.W. Next Generation Inactivated Poliovirus Vaccine: The Future Has Arrived / R.W. Sutter, H. Okayasu, M.P. Kieny // *Clinical Infectious Diseases*. – 2017. – Т. 64. – № 10. – С. 1326-1327. DOI: 10.1093/cid/cix116.
75. Hu, Y. Immunogenicity and Safety of a Sabin Strain-Based Inactivated Polio Vaccine: A Phase 3 Clinical Trial / Y. Hu, J. Wang, G. Zeng, K. Chu, D. Jiang, F. Zhu, Z. Ying, L. Chen, C. Li, F. Zhu, W. Yin // *Journal of Infectious Diseases*. – 2019. – Т. 220. – № 10. – С. 1551-1557. DOI: 10.1093/infdis/jiy736.
76. Capeding, M.R. Safety and Immunogenicity of a New Inactivated Polio Vaccine Made From Sabin Strains: A Randomized, Double-Blind, Active-Controlled, Phase 2/3 Seamless Study / M.R. Capeding, G.D. Gomez-Go, P. Oberdorfer, C. Borja-Tabora, L. Bravo, J. Carlos, A. Tangsathapornpong, R. Uppala, K. Laoprasopwattana, Y. Yang, S. Han, O. Wittawatmongkol // *The Journal of infectious diseases*. – 2022. – Т. 226. – № 2. – С. 308-318. DOI: 10.1093/infdis/jiaa770.
77. Государственный реестр лекарственных средств. – 2017. URL: <https://grls.minzdrav.gov.ru/GRLS.aspx>. (дата обращения: 11.09.2023).
78. Суетина И.Г. Проблема своевременности вакцинации детей раннего возраста и пути ее решения / И.Г. Суетина, Я.Ю. Иллек, Н.В. Хлебникова, А.Я. Миндлина, Н.П. Галина, А.В. Степенко // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. – 2019. – Т. 18. – № 5. – С. 85-91. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-5-85-91.
79. Михеева, И.В. Применение пятикомпонентной вакцины АаКДС-ИПВ / Hib в рамках национального календаря профилактических прививок / И.В. Михеева, Ю.И. Акимова, М.А. Михеева // *Педиатрическая фармакология*. – 2019. – Т. 16. – № 3. – С. 171-179. DOI: 10.15690/pf.v16i3.2030.
80. Liu, B. Immunogenicity and Safety of Childhood Combination Vaccines : A Systematic Review and Meta-Analysis / B. Liu, B. Cao, C. Wang, B. Han, T. Sun, Y. Miao, Q. Lu, F. Cui // *Vaccines* – 2022. – Т. 10 – №472 – С.1–17. DOI: 10.3390/vaccines10030472

81. Намазова-Баранова, Л.С. Безопасность и иммуногенность полностью жидкой шестивалентной вакцины АбКДС-ИПВ-ГепВ-Hib у здоровых детей 1-го года жизни в Российской Федерации / Л.С. Намазова-Баранова, С.М. Харит, О.А. Перминов, В.В. Романенко, И.В. Осипова, А.Г. Асатрян, А.В. Гольдштейн, С. Б'Чир, О.И. Лябис // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 19. – № 3. – С. 28-39. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-3-28-39.
82. Брико, Н.И. Сравнительная оценка предотвращаемого социально-экономического ущерба при различных подходах к профилактике вакциноуправляемых инфекций в рамках Национального календаря профилактических прививок / Н.И. Брико, Л.Д. Попович, А.Я. Миндлина, О.И. Волкова, Е.О. Курилович // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2020. – Т. 19. – № 1. – С. 4-13. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-1-4-13.
83. Loiacono, M.M. DTaP combination vaccine use and adherence: A retrospective cohort study / M.M. Loiacono, V. Pool, R. van Aalst // Vaccine. – 2021. – Т. 39. – № 7. – С. 1064-1071. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.01.009.
84. Tanaka, Y. Concomitant administration of diphtheria, tetanus, acellular pertussis and inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains (DTaP-sIPV) with pentavalent rotavirus vaccine in Japanese infants / Y. Tanaka, R. Yokokawa, H.S. Rong, H. Kishino, J.E. Stek, M. Nelson, J. Lawrence// Human Vaccines and Immunotherapeutics. – 2017. – Т. 13. – № 6. – С. 1352-1358. DOI: 10.1080/21645515.2017.1279769.
85. Zhang, Y. Safety and immunogenicity of a combined DTaP-sIPV-Hib vaccine in animal models/ Y. Zhang, Y. Guo, Y. Dong, Y. Liu, Y. Zhao, S. Yu, S. Li, C. Wu, B. Yang, W. Li, X. Wei, Y. Zhang, Y. Huang, H. Wang, X. Yang // Human Vaccines and Immunotherapeutics. – 2022. – Т. 18. – № 7. DOI: 10.1080/21645515.2022.2160158.
86. ОФС.1.2.3.0012.15. Определение белка. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том I. – М.: Министерство Здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С. 1026-1041.
87. 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. – М.: Министерство Здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С. 5497-5502.
88. ОФС.1.2.3.0023.15. Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том I. – М.: Министерство Здравоохранения Российской Федерации, 2018. – С. 650–669.
89. Пиняева, А.Н. 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.

90. Piniaeva, A. Immunogenicity and Safety of Inactivated Sabin-Strain Polio Vaccine “PoliovacSin”: Clinical trials phase I and II / A. Piniaeva, 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.

91. WHO. Manual for virological investigation of poliomyelitis. WHO/EPI/GEN/97.1. – Geneva, 1997. – 16 с.

92. МУ 3.1.2943—11 Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит. – Москва : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.

93. Thomassen, Y.E. Upgrading the established inactivated polio vaccine production process / Y.E. Thomassen. – W.: Wageningen University, 2014. – 232 с.

94. Kersten, G. Antigenic and immunogenic properties of inactivated polio vaccine made from Sabin strains / G. Kersten, T. Hazendonk, C. Beuvery // Vaccine. – 1999. – Т. 17. – № 15-16. – С. 2059-2066. DOI: 10.1016/S0264-410X(98)00409-5.

95. Column efficiency testing. – GE Healthcare Life Sciences, 2010. – 6 с.

96. Sepharose 4 Fast Flow, Sepharose 6 Fast Flow. – GE Healthcare Life Sciences, 2013. – 4 с.

97. Sephacryl S-1000 Superfine. – GE Healthcare Life Sciences, 2006. – 26 с.

98. Sephacryl TM High Resolution. – GE Healthcare Life Sciences, 2017. – 24 с.

99. Size Exclusion Chromatography: Principles and Methods. – Uppsala: GE Healthcare, 2018. – 122 с.

100. Bio-Works. WorkBeads 40 / 100 SEC WorkBeads 40 / 10 000 SEC WorkBeads 40 / 1000 SEC WorkBeads Macro SEC. – 8 с.

101. Пиняева, А.Н. 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.
102. CM Sepharose Fast Flow, DEAE Sepharose Fast Flow, Q Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow Ion Exchange Media. Instructions for Use. – Cytiva, 2020. – 16 с.
103. Capto S, Capto Q, Capto DEAE Ion exchange resins. Instructions for Use. – Cytiva, 2020. – 42 с.
104. Bio-Works. WorkBeads 40S, WorkBeads 40Q, WorkBeads 40 DEAE. Instructions / Bio-Works. – 1-10 с.
105. ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том I. – М.: Министерство Здравоохранения Российской Федерации 2018. – С. 1233–1250.
106. Harm, S. An in vitro study on factors affecting endotoxin neutralization in human plasma using the Limulus ameocyte lysate test / S. Harm, C. Schildböck, K. Strobl, J. Hartmann // Scientific Reports. – 2021. – Т. 11(1):4192. – С. 1-23. DOI: 10.1038/s41598-021-83487-4.
107. ОФС.1.1.0006.15 Фармацевтические субстанции. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том I. – М.: Министерство Здравоохранения Российской Федерации 2018. – С. 176–184.
108. ОФС.1.4.1.0007.15 Лекарственные формы для парентерального применения. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том I. – М.: Министерство Здравоохранения Российской Федерации 2018. – С. 1881–1892.
109. ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том II. – М.: Министерство Здравоохранения Российской Федерации 2018. – С. 2545–2554.
110. ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунологические лекарственные препараты. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том II. – М.: Министерство Здравоохранения Российской Федерации 2018. – С. 2717 -2728.
111. Иванова, О.Е. Полиомиелит сегодня: состояние Глобальной программы ликвидации и современная стратегия ВОЗ по иммунизации / О.Е. Иванова // Вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 2. – № 81. – С. 73-78.
112. Sepharose and Sepharose CL. Size exclusion chromatography. Instructions for Use Table of Contents. / Cytiva. – 2020. – 14 с.

113. Thomassen Y.E. Isoelectric point determination of live polioviruses by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection / Y.E. Thomassen, G. van Eikenhorst, L.A. van der Pol, W.A.M. Bakker // *Analytical Chemistry* – 2013. – T. 85 – №12 – C. 6089–6094.