

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF MANUFACTURING THE FIRST KAZAKHSTAN SEASONAL INFLUENZA SPLIT VACCINE

Assanzhanova N.N., Kydyrbayev Zh.K., Ryskeldinova Sh.Zh.,
Kassenov M.M., Khairullin B.M., Tabynov K.K.

*Research Institute for Biological Safety Problems
Gvardeiskiy, Kordaiskiy rayon, Zhambylskaya oblast, 080409, Republic of Kazakhstan
anurika@mail.ru*

ABSTRACT

The development of the technological stages of manufacturing an experimental, inactivated seasonal trivalent influenza split vaccine in the Republic of Kazakhstan is presented here. Master and working seed lots of the A/NIBRG-121xp (H1N1), A/NYMC X-217 (H3N2), and B/NYMC BX-49 (type B) strains were obtained for manufacturing a seasonal influenza vaccine. The purification and concentration of the three influenza virus strains were optimised and achieved by flow-through centrifugation on a linear sucrose gradient (0-60%). The optimal modes of inactivation were achieved using β -propiolactone at a final concentration of 0.1% and the subsequent splitting was carried out using the detergents Triton X-100 and Tween-80. The purified and inactivated virus concentrates were subjected to technological quality control at each production stage, as well as to stability testing. Quality control was carried out in accordance with regulations approved by the biological industry for the production and vaccines control for health care. For the first time in the Republic of Kazakhstan, a pilot batch of seasonal trivalent influenza split vaccine was produced from the NIBRG-121xp, A/NYMC X-217 (H3N2), and B/NYMC BX-49 strains. Quality-control results demonstrated that the prepared batch of vaccine meets National Pharmacopeia of Republic of Kazakhstan and European Pharmacopeia requirements and is suitable for further clinical trials.

Keywords: seasonal influenza virus, cultivation, purification and concentration, inactivation, splitting, stabilization, vaccine

УДК 619:615.371:616:921.5

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПЕРВОЙ КАЗАХСТАНСКОЙ СПЛИТ-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СЕЗОННОГО ГРИППА

Асанжанова Н.Н., Кыдырбаев Ж.К., Рыскельдинова Ш.Ж.,
Касенов М.М., Хайруллин Б.М., Табынов К.К.

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
п.г.т. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область, 080409, Казахстан
anurika@mail.ru*

АБСТРАКТ

В работе представлены результаты разработки технологических этапов приготовления экспериментальной трехвалентной инактивированной сплит-вакцины против сезонного гриппа в Республике Казахстан. В результате были получены маточные и посевные раскладки штаммов A/NIBRG-121xp (H1N1), A/NYMC X-217 (H3N2), B/NYMC BX-49 (тип В) в качественном отношении пригодные для приготовления вакцины против сезонного гриппа. Отработаны этапы очистки и концентрирования вируса гриппа A/NIBRG-121xp (H1N1), A/NYMC X-217 (H3N2), B/NYMC BX-49 (тип В) на проточной центрифуге через линейный градиент сахарозы 0-60%, установлен оптимальный режим инактивации с использованием β -пропиолактона в конечной концентрации 0,1% с последующим расщеплением смесью детергентов Тритон X-100 и Твин-80 и стабилизацией очищенного и инактивированного вирусного концентрата с технологическим контролем качества каждого этапа производства. Контроль качества проводился в соответствии с нормативами, принятыми в биологической промышленности при производстве и контроле вакцин, предназначенных для здравоохранения. Впервые в РК приготовлена опытно-промышленная серия трехвалентной сплит-вакцины против сезонного гриппа из штаммов NIBRG-121xp, A/NYMC X-217 (H3N2) и B/NYMC BX-49. Результаты контроля качества показали, что приготовленная серия вакцины соответствует требованиям Государственной фармакопеи РК и Европейской фармакопеи и пригодна для дальнейшего проведения клинических испытаний.

Ключевые слова: вирус сезонного гриппа, культивирование, очистка и концентрирование, инактивация, расщепление, стабилизация, вакцина.

ВВЕДЕНИЕ

Вакцинация против гриппа является одним из важнейших способов борьбы с эпидемиями гриппа. За последние годы значительно улучшилось качество вакцинных препаратов, увеличился их ассортимент. Известно, что при своевременной вакцинации можно предотвратить заболевание гриппом у 80-90% детей и взрослых. При этом болезнь у привитых протекает, как правило, легче и без каких-либо осложнений [1, 2].

Анализ литературы показывает, что для специфической профилактики сезонного гриппа используются сплит-вакцины и субъединичные вакцины. Большинство фирм стран ближнего и дальнего зарубежья в настоящее время предпочитают изготовление сплит-вакцины. Проводя сравнение известных видов гриппозных вакцин, можно отметить, что наличие открытых для иммунной системы внутренних антигенов вируса гриппа (нуклеокапсида и матриксного белка) делает сплит-вакцины уникальными. Они защищают не только от ежегодных мутаций вируса гриппа, но частично и от всех возможных разновидностей вируса, поскольку внутренние антигены подвержены лишь незначительным мутациям. По сути дела, сплит-вакцины представляют собой «золотую середину» в профилактике гриппа, поскольку по уровню побочных реакций аналогичны субъединичным вакцинам, а по иммунологической эффективности – цельновирионным. Профилактическая эффективность вакцин этого класса колеблется в интервале от 75 до 96%. Сплит-вакцины содержат частицы разрушенного вируса – поверхностные и внутренние белки. Изготавливается вакцина путем расщепления вирусных частиц при помощи органических растворителей или детергентов. Ведущие специалисты по клинической вакцинологии однозначно утверждают о целесообразности разработки технологии и приготовления сплит-вакцин для специфической профилактики сезонного гриппа [1-4].

В настоящее время в РК отсутствует собственное производство вакцин против сезонного гриппа. Ежегодно для нужд здравоохранения РК закупается от 1,5 до 2,0 миллионов доз трехвалентной вакцины против гриппа типа А и В. РК не имеет собственного производства и находится в прямой зависимости от иностранных поставщиков. Аналогичная ситуация наблюдается и в других государствах Центральной Азии.

Имеющиеся в настоящее время мировые производственные мощности не достигают 1 миллиарда доз моновалентной противогриппозной вакцины. Почти все мировое производство вакцин сосредоточено в девяти странах, из них большая доля приходится на пять западноевропейских стран. В последнее время возрастает спрос на сезонную вакцину против гриппа. Вакцинация против гриппа недостаточно используется как в развитых, так и в менее развитых странах.

В случае пандемии потребность в изготовлении вакцины для всех подверженных заболеванию людей создаст дополнительную нагрузку на и без того недостаточные мощности предприятий по производству вакцин против гриппа. Из этого следует, что «глобальные» мощности по производству противогриппозных вакцин являются недостаточными.

Важным аспектом для государств, не имеющих собственного производства, является научная и технологическая готовность к выпуску собственных вакцин против этого заболевания. В случае возникновения пандемии страна, имеющая в своем активе вакцину против пандемического гриппа, в первую очередь обеспечит вакцинацией своих граждан, только потом будет продавать ее другим государствам.

В Европе, Северной Америке и других развитых регионах вакцинация в целях профилактики гриппа рассматривается как экономически эффективный и ресурсосберегающий подход, предпочтительный по сравнению с выжидательной политикой. Поэтому создание отечественного производства вакцины против гриппа для обеспечения потребностей РК является важнейшей задачей национальной безопасности и устойчивого развития нашего государства.

Следует отметить, что Казахстан, в лице Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности, в настоящее время имеет достаточный научно-технический потенциал, позволяющий решить задачи, связанные с обеспечением страны отечественным препаратом, не уступающим по эффективности зарубежным аналогам.

Учитывая вышеизложенное, приоритетным направлением в области профилактики заболевания населения РК гриппом является создание современного отечественного производства вакцин против гриппа. Развитие отечественного производства вакцины против гриппа позволит обеспечить потребности РК, даст возможность отказаться от импорта и тем самым отпадет зависимость от иностранных производителей, предоставит возможность выхода на рынки близлежащих государств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изготовления сезонной трехвалентной противогриппозной вакцины использованы рекомбинантные штаммы NIBRG-121xp (A/H1N1), NYMC X-217 (A/H3N2) и NYMC VX-49 вируса гриппа согласно рекомендациям ВОЗ [5].

Культивирование рекомбинантных вакцинных штаммов вируса гриппа проводили по методике, описанной ранее [6].

Накопленную биомассу вируса в виде вирусодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ) предварительно осветляли фильтрованием через капсулы Opticar XL2 с диаметром пор 2,0/1,2 мкм. Далее осветленный вирусный материал пропускали через линейный градиент сахарозы 0-60% и центрифугировали при различной скорости 35000 об/мин в течение 6 ч. По окончании центрифугирования линейный градиент сахарозы собирали по фракциям от 0 до 60% по 53,3 см³. Каждую фракцию исследовали на гемагглютинирующую активность, фракции с наивысшей гемагглютинирующей активностью (ГАА) собирали в объединенный пул для дальнейшей инактивации.

Инактивацию вирусодержащего концентрата проводили в асептических условиях с использованием β-пропиолактона в конечной концентрации 0,1% 24 ч. при постоянном перемешивании. Инактивированную суспензию считали авирулентной, если ВАЖ после второго пассажа не вызывает агглютинацию эритроцитов петуха в реакции гемагглютинации (РГА) [7].

Диафильтрация очищенного и инактивированного вирусного концентрата проводилась с использованием диафильтрационной установки Millipore Pellicon Cassette system в асептических условиях. Рециркуляцию вируса проводили против 10 объемов физиологического буферного раствора в течение 30 мин с концентрированием объема вируса до 360 см³.

Расщепление очищенного и инактивированного вирусного концентрата

К очищенному препарату вируса добавляли детергенты Тритон X-100 и Твин-80 в конечных концентрациях 1,0 и 0,05%, соответственно. Смесь инкубировали в течение 1 ч. при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После чего удаляли детергенты обработкой Amberlite XAD-4 в течение 3 ч. также при постоянном перемешивании.

Для оценки эффективности расщепления суспензию центрифугировали при 100000 g в роторе SW-50.1 в течение 45 мин., надосадов и осадок анализировали на содержание ГА в ОРИД. В качестве контроля использовали необработанный вирус.

Стабилизация расщепленного очищенного и инактивированного вирусного концентрата

К инактивированному расщепленному вирусному концентрату медленно добавляли субъединичный буфер В в конечной концентрации 1%, при постоянном перемешивании. После добавления осторожно перемешивали еще в течение 2 мин.

Стерилизующая фильтрация

Стабилизированный расщепленный очищенный и инактивированный вирусный концентрат пропускали через каскад фильтров с диаметром пор 2,0 мкм и 0,22 мкм в стерильный сосуд и стерильно закрывали. Отбирали пробу для определения содержания гемагглютинина (ГА), эндотоксинов и остаточного содержания сахарозы, овальбумина, белков, детергентов, контроля стерильности и pH моновалентного продукта.

Определение ГА проводили в реакции одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД) [5]. Определение содержания общего белка проводили по методу Лоури. Количественное определение неионного детергента (Тритон X-100 или Твин-80) осуществляли по методу Голдстейна [8]. Определение содержания овальбумина в иммуноферментном анализе (ИФА) проводили согласно инструкции к коммерческому набору Chicken Egg Ovalbumin ELISA Kit (Alpha Diagnostic International, USA).

Электронная микроскопия

Образец исследуемого вируса смешивали с равным объемом суспензии шариков латекса с известной концентрацией. Полученную смесь готовили по стандартной методике негативного контрастирования с использованием 1% раствора уранилацетата, сравнивали число латексных и вирусных частиц на единицу площади. Просмотр осуществляли на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония).

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента при уровне вероятности P=0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По отработанной ранее технологии культивирования [6] были приготовлены маточные и посевные расплодки штаммов NIBRG-121xp (A/H1N1), NYMC X-217 (A/H3N2) NYMC и VX-49 с использованием СПФ-эмбрионов, отвечающие требованиям контроля качества.

В дальнейшем из посевных расплодок получены вирусные биомассы вышеуказанных штаммов (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика наработанного вирусного материала гриппа А и В

Table 1. Characteristics of the accumulated viral material of influenza A and B

Наименование показателя Name of indicator	Штаммы Strains		
	NIBRG-121xp (A/H1N1)	NYMC X-217 (A/H3N2)	NYMC BX-49 (B)
Количество РКЭ, шт. Number of chicken embryos, pcs	4300	4800	3000
Объем ВАЖ, см ³ VCAF volume, cm ³	35000	37500	23000
Гемагглютинирующая активность Hemagglutinating activity	512±0,0	512±0,0	128±0,0
Инфекционная активность, log ₁₀ ЭИД ₅₀ /см ³ Infectious activity, log ₁₀ EID ₅₀ /cm ³	8,5±0,14	8,2±0,14	7,5±0,14
Стерильность Sterility	Стерильна Sterile	Стерильна Sterile	Стерильна Sterile

По результатам проделанной работы наработано от 23,0 до 35,0 л стерильной вирусной суспензии вышеуказанных штаммов. Полученные суспензии по инфекционной и гемагглютинирующей активности (таблица 1) соответствуют для приготовления сплит-вакцин.

Следующим этапом являлись очистка и концентрирование вирусного материала, где в качестве модельного вируса был использован штамм А/NYMC X-217 (H3N2). Как известно, объем и концентрация сахарозы в прямой зависимости влияет на степень очистки и выход вируса, также на агрегацию вируса в сахарозной фракции пика [9]. В первых сериях работы на промышленной ультрацентрифуге была отработана длительность проведения самой процедуры очистки и концентрирования в течение 1, 2, 3, 4, 5 часов, так как объем используемого градиента сахарозы был большой (3,2 л) для прохождения через него вируса (рисунок 1).

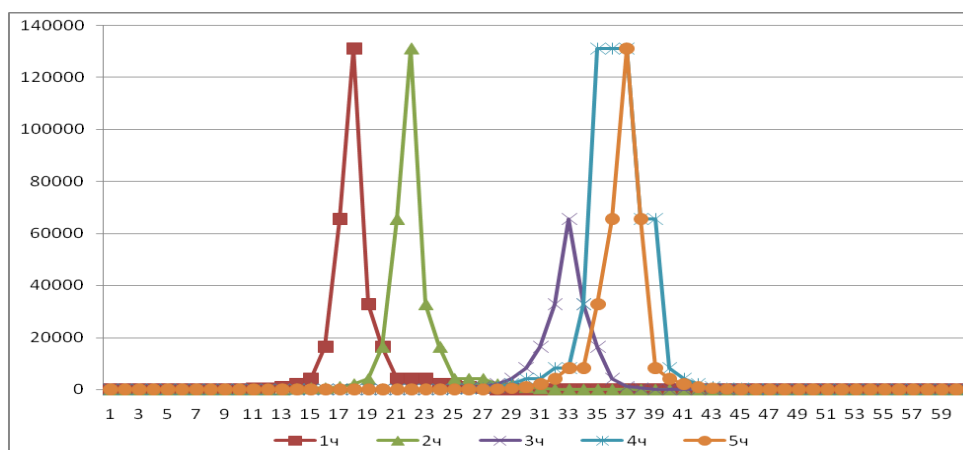


Рис. 1. Распределение гемагглютинирующей активности очищенного вируса гриппа А/NYMC X-217 (H3N2) во фракциях линейного градиента сахарозы 1-60%

Fig. 1. Distribution of hemagglutinating activity of the purified influenza A/NYMC X-217 (H3N2) in fractions of a linear sucrose gradient of 1-60%

Как видно из рисунка 1, наибольшую эффективность показали 4 и 5 ч. очистки и концентрирования с использованием проточной промышленной центрифуги. Учитывая незначительное различие ($p > 0,05$) между результатами 4 ч. (где вирус концентрировался в 30-41% градиента сахарозы) и 5 ч. очистки (вирус концентрировался в 31-41% градиента сахарозы), мы остановились на режиме очистки и концентрирования с длительностью 5 ч. (результаты трех опытов). Отработанный режим очистки и

концентрирования использовали для проведения работ со штаммами A/NIBRG-121xp (H1N1) и B/NYMC BX-49 (таблица 2).

Таблица 2. Сравнительная характеристика очищенных и концентрированных вирусных материалов

Table 2. Comparative characteristics of the purified and concentrated virus materials

Наименование показателя Name of indicator	Очистка штаммов Strains purification					
	NIBRG-121xp		NYMC X-217		B/NYMC BX-49	
	до before	после after	до before	после after	до before	после after
Объем ВАЖ, см ³ VCAF volume, cm ³	35000	636	37500	550	23000	630
Кратность концентрирования Concentration multiplicity	-	55,0	-	68,2	-	36,5
Гемагглютинирующая активность Hemagglutinating activity	512 ± 0,0	65536 ± 0,0	512 ± 0,0	26008,0 ± 5461,3	161,3 ± 42,7	5160,6 ± 1365,3
Общий белок, мкг/см ³ Total protein, µg/cm ³	6900	4790	2100	2301	2600	1120
Удаление белка, % Protein removal, %		98,74		98,39		98,82
Овальбумин, мкг/см ³ Ovalbumin µg/cm ³	н/и	23,2	н/и	7,1	н/и	2,9
ГА, мкг/см ³ HA, µg/cm ³	9,74	1112,1	9,1	495,04	8,9	260,0
Выход ГА, % HA exit, %	-	70,0	-	80,0	-	80,0

Таким образом, сравнительные результаты очистки и концентрирования вируса гриппа штаммов A/NIBRG-121xp (H1N1), A/NYMC X-217 (H3N2) и B/NYMC BX-49 показали хорошую эффективность центрифужного метода с использованием промышленной центрифуги eРКП – выход гемагглютинина (70,0-80,0%) и очистка от белков (98,39-98,82%), что явилось основанием для продолжения работ по разработке технологии изготовления сезонной инактивированной трехвалентной сплит-вакцины против гриппа.

После получения высокоочищенного вирусного концентрата проведены исследования, направленные на подбор оптимального инактиванта для вирусосодержащих материалов. Одной из главных проблем получения высокоэффективных инактивированных вакцин является изыскание наиболее оптимального способа инактивации вируса, обеспечивающего необратимое повреждение его репликативного механизма при полном сохранении исходной антигенной структуры. В качестве инактивантов были выбраны β-пропиолактон и формальдегид, которые, согласно литературным данным [10-12], используются большинством компаний, специализирующихся на производстве противогриппозных вакцин. Несмотря на эффективность этих методов инактивации, каждый из них имеет свои недостатки.

В опыте использовали очищенные вирусные концентраты с титром гемагглютинирующей активности (ГАА) не менее 1:16384 для вирусов гриппа типа А, и не менее 1:4096 – типа В. После инактивации все пробы были проверены на полноту инактивации с помощью стандартной методики проведения трех последовательных пассажей на 10-суточных куриных эмбрионах. Обобщенные данные инактивации штамма NIBRG-121xp вируса гриппа β-пропиолактоном и формальдегидом приведены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты инаktivации вирусов гриппа β -пропиолактоном и формалином

Table 3. Results of the inactivation of influenza virus with β -propiolactone and formalin

Наименование инаktivанта Name of inactivant	Время возд-я Exposure time	ГАА штаммов Strans hemagglutinating activity						Пассаж на ПКЭ Passage on chicken embryos
		NIBRG-121xp		NYMC X-217		B/NYMC BX-49		
		до и. before i.	после и. after i.	до и. before i.	после и. after i.	до и. before i.	после и. after i.	
0,1% β -пропиолактон 0,1% β -propiolactone	24 час 24 hours	32768± 0,0	32768± 0,0	32768± 0,0	32768± 0,0	4096± 0,0	4096± 0,0	полная инаktivация complete inactivation
0,2% β -пропиолактон 0,2% β -propiolactone	24 час 24 hours	32768± 0,0	26008,0± 5461,3	32768± 0,0	32768± 0,0	4096± 0,0	4096± 0,0	полная инаktivация complete inactivation
0,4% β -пропиолактон 0,4% β -propiolactone	24 час 24 hours	32768± 0,0	20642,5± 5461,3	32768± 0,0	20642,5± 5461,3	4096± 0,0	2580,3± 682,7	полная инаktivация complete inactivation
0,02% формальдегид 0,02% formaldehyde	5 сут 5 days	32768± 0,0	16384± 0,0	32768± 0,0	26008,0± 5461,3	4096± 0,0	3251,0± 682,7	полная инаktivация complete inactivation

Из данных таблицы 3 видно, что выбранные режимы обеспечивают полную и необратимую инаktivацию вирусных суспензий испытанных штаммов вируса гриппа вне зависимости от вида и концентрации инаktivанта. Не наблюдалось снижения ГАА очищенных и концентрированных вирусных материалов при использовании обоих видов инаktivантов, кроме 0,4% β -пропиолактона.

Сравнение формы и размеров структурных элементов вирионов в очищенном и концентрированном материале до и после инаktivации электронной микроскопией не позволило обнаружить какие-либо значимые различия. Концентрация вирусных частиц в исследуемых препаратах была практически одинаковой.

На основании полученных данных сделано заключение, что отработанные режимы инаktivации очищенного и концентрированного вируса (β -пропиолактон 0,1% в течение 24 ч. и формальдегид 0,02%-ной конечной концентрации в течение 120 ч. при температуре 2-8°C) обеспечивают получение инаktivированного вирусного материала штамма NIBRG-121xp и не оказывают заметного воздействия на структурную организацию вируса. С учетом отсутствия β -пропиолактона в инаktivированном материале в результате его самораспада и меньшего времени для инаktivации вирусного материала по сравнению с формальдегидом в дальнейшем в качестве инаktivанта был выбран 0,1% β -пропиолактон.

В дальнейшем провели диафильтрацию инаktivированного вирусного концентрата для отмывки от сахарозы, после чего суспензию вируса доводили до исходного объема физиологическим буферным раствором. Контроль промежуточного продукта на данном этапе показал, что гемагглютинирующая активность вируса не изменилась в процессе диафильтрации, отмечалось некоторое снижение количества общего белка и гемагглютинина (таблица 4).

Таблица 4. Показатели контроля качества инактивированных вирусных концентратов после диафильтрации

Table 4. Quality Control Indicators of inactivated viral concentrate after filtration

Наименование показателя Name of indicator	Диафильтрация штаммов Strains diafiltration					
	NIBRG-121xp		NYMC X-217		B/NYMC BX-49	
	до before	после after	до before	после after	до before	после after
	Объем ВАЖ, см ³ VCAF volume, cm ³	638	650	555,7	500	640
Гемагглютинирующая активность, ГАЕ Hemagglutinating activity, HAU	65536±0,0	52015,0±10922,7	26008,0±5461,3	16384±0,0	5160,6±1365,3	4096±0,0
Общий белок, мкг/см ³ Total protein, µg/cm ³	6970,4	6041,0	2301,0	2230,0	1120,0	1010,0
Гемагглютинин, мкг/см ³ Hemagglutinin, µg/cm ³	1112,1	978,3	495,04	376,0	260,0	248,0
Сахароза, мг/см ³ Sucrose, mg/cm ³	-	0,6	-	0,54	-	0,49

Остаточное содержание сахарозы составило 0,49-0,6 мг/см³ с учетом показателей ГАА и содержания ГА, это позволило передать материалы для следующего этапа расщепления.

Анализ литературных данных для оптимизации метода расщепления вируса гриппа типа А и В детергентами показал, что различные производители для расщепления вируса гриппа используют различные детергенты, согласно которым для разрушения вируса может быть использован Тритон X-100 как самостоятельно, так и в смеси с Твин-80. На основании вышеизложенного мы остановились на использовании Тритона X-100 как самостоятельного, так и смеси его с Твин-80 в концентрации 1,0/0,5%, соответственно. Результаты исследований приведены в таблице 5.

Таблица 5. Сравнительные результаты разрушения вирионов вируса гриппа NIBRG-121xp детергентами

Table 5. Comparative results of the splitting of the NIBRG-121 xp influenza virion with detergents

Детергент The detergent	Концентрация , % Concentration, %	Время, мин Time, min	Температура, °С Temperature, °С	Содержание ГА (ОРИД) HA content (SRID)		Эффективность расщепления, % Efficacy of splitting, %
				до обработки before treatment	после обработки after treatment	
				Тритон X-100 Triton X-100	0,5 1 2	
Тритон X-100 /Твин 80 Triton X-100 /Tween 80	1/0,5	60	22	109,4	101,4	92,69
Примечание – Рассчитано по содержанию ГА в нерасщепленном вирусном осадке						
Note – Calculated by the HA content in the cleavage of the viral precipitate						

Данные таблицы 5 свидетельствуют о том, что наиболее эффективное расщепление вируса происходит при использовании смеси Тритона X-100 с Твин-80 с использованием меньших концентраций детергентов. Так, эффективность расщепления вируса 2% Тритоном X-100 составила 71,79%, тогда как для достижения такой же эффективности смесью использовалась его меньшая концентрация – 1%.

Используя смесь Тритон X-100/Твин 80, были проведены опыты по разрушению вируса гриппа штаммов А/NIВRG-121хр, А/NYMC X-217 и В/NYMC ВХ-49 (таблица 6). Эффективность разрушения исследуемых штаммов составила от 80,15 до 88,5%.

Для подтверждения полученных результатов также провели серию опытов на нативном материале для оценки эффективности разрушения вирусов гриппа А/NIВRG-121хр, А/NYMC X-217 и В/NYMC ВХ-49 с последующей оценкой инфекционной активности на куриных эмбрионах, которые показали отсутствие вируса.

Таблица 6. Сравнительные результаты разрушения вируса гриппа смесью Тритон X-100/Твин 80

Table 6. Comparison of the influenza virus destruction mixture of Triton X-100/Tween 80

Штаммы Strains	Количество ГА в ОРИД, мкг/см ³ Quantity HA in SRID, µg/cm ³		Эффективность расщепления, % Efficacy of splitting, %
	до расщепления before splitting	после расщепления after splitting	
	А/NIВRG-121хр	107,01	94,7
А/NYMC X-217	108,09	89,6	82,89
В/NYMC ВХ-49	92,45	74,1	80,15

В результате проведенных исследований установлено, что для разрушения вируса в качестве оптимального детергента может быть использована смесь Тритона X-100 с Твином 80 в концентрации 1,0/0,5%, соответственно, что было подтверждено определением содержания ГА в ОРИД и определением инфекционной активности вируса на РКЭ.

Одним из важнейших этапов в приготовлении сплит-вакцин является подбор стабилизаторов после расщепления вируса и последующая стерилизующая фильтрация с наименьшими потерями гемагглютинаина на данных этапах. С использованием научного опыта голландских коллег из Нидерландского института вакцин (г. Билтховен, Голландия) на основании экспериментальных исследований был определен оптимальный состав буфера, содержащий ионы Ca²⁺ и Mg²⁺, для стабилизации нейраминидазы вируса, который в конечном итоге влияет на иммуногенную активность противогриппозной вакцины. В дальнейшем была проведена финальная фильтрация продукта – стерилизация через каскад фильтров с диаметром пор 2,0/1,2 мкм и 0,45/0,22 мкм (таблица 7).

Таблица 7. Сравнительные результаты стерилизующей фильтрации вируса гриппа

Table 7. Comparative results sterilizing filtration of influenza virus

Штаммы Strains	Количество ГА в ОРИД, мкг/см ³ Quantity HA in SRID, µg/cm ³		Эффективность фильтрации, % Efficacy of filtration, %
	до фильтрации before filtration	после фильтрации after filtration	
	А/NIВRG-121хр	94,7	63,86
А/NYMC X-217	89,6	57,08	63,70
В/NYMC ВХ-49	74,1	44,24	59,70

Выход гемагглютинаина после стерилизующей фильтрации составил 67,43% для штамма А/NIВRG-121хр, 63,70% – для штамма А/NYMC X-217 и 59,70% – для В/NYMC ВХ-49. Высевы на бактериальные среды (МПБ, МПА, Сабуро жидкая и твердая, тиогликолевая) показали отсутствие бактериального и грибкового загрязнения, что указывает на стерильность полученного материала.

В результате проведенных работ по расщеплению, стабилизации и стерилизующей фильтрации очищенного и инактивированного концентрата из штаммов NIBRG-121xp, NYMC X-217 и B/NYMC BX-49 получены конечные моновалентные полуфабрикаты вакцины с содержанием гемагглютинаина не ниже 185,0 мкг/см³ каждого штамма. Содержание овальбумина (ниже 1 мкг/доза – на 15,0 мкг гемагглютинаина) и эндотоксинов соответствует требованиям технологического контроля согласно ОПР. Обобщенные данные качества полученных конечных моновалентов полуфабриката вакцины показаны в таблице 8.

Таблица 8. Характеристика конечных моновалентных полуфабрикатов вакцины

Table 8. Characteristics of the final monovalent bulks of vaccine

Наименование параметров качества Name of quality parameters	Ед. измерения Unit of measure	NIBRG-121xp	NYMC X-217	B/NYMC BX-49
Объем Volume	см ³ cm ³	610	530	440
Общий белок Total protein	мкг/см ³ µg/cm ³	670,0	600,0	750,0
Гемагглютинин (ОРИД) Hemagglutinin (SRID)	мкг/см ³ µg/cm ³	205,1	185,0	231,0
Эндотоксин Endotoxin	МЕ/см ³ IU/cm ³	10,00	1,2	1,2
Овальбумин Ovalbumin	мкг/см ³ µg/cm ³	6,4	3,9	2,4
Детергенты Detergents	мкг/см ³ µg/cm ³	284,1	498,2	475,0
Овальбумин на дозу препарата (15,0 мкг) Ovalbumin in the dose of the drug (15,0 µg)	мкг/доза µg/dose	0,94	0,63	0,31
Общий белок (не более 100 мкг на вирусный штамм) Total protein (no more 100 µg per viral strain)	мкг/доза µg/dose	98,0	97,3	97,4

В результате получены конечные моновалентные полуфабрикаты вакцины с содержанием гемагглютинаина 205,1 мкг/см³, 185,0 мкг/см³ и 231,0 мкг/см³ указанных выше штаммов. Содержание эндотоксинов, общего белка и овальбумина соответствует требованиям технологического контроля согласно ОПР.

С использованием конечных моновалентных полуфабрикатов вакцины из штаммов A/NIBRG-121xp (H1N1), A/NYMC X-217 (H3N2) и B/NYMC-BX49 приготовлена опытно-промышленная серия инактивированной тривалентной сплит-вакцины против сезонного гриппа.

Для составления готовой вакцины конечные моновалентные полуфабрикаты объединяли в асептических условиях таким образом, чтобы концентрация гемагглютинаина каждого штамма в конечном препарате приближалась к 15±3 мкг/см³. Готовую вакцину после проверки показателя pH и подтверждения ее стерильности разливали по 10 см³ во флаконы и маркировали. Всего было приготовлено 330 флаконов (6600 доз) вакцины гриппозной аллантоисной расщепленной инактивированной. Результаты контроля качества готовой вакцины показаны в таблице 9.

Таблица 9. Результаты контроля качества вакцины гриппозной аллантоисной расщепленной инактивированной

Table 9. Results of quality control of influenza allantoic split inactivated vaccine

Параметры качества Quality parameters	Норма (от и до) Norm (from and to)	Результаты контроля качества вакцины Vaccine quality control results
Описание Description	Бесцветная, слегка опалесцирующая жидкость A colorless, slightly opalescent liquid	Слабо-опалесцирующая бесцветная жидкость Low-opalescent colorless liquid
Идентификация Identification	Должна взаимодействовать с типоспецифическими сыворотками (Н1, Н3 и В) Be reacted with type-specific antisera (H1, H3 and B)	Взаимодействует с типоспецифическими сыворотками (Н1, Н3 и В) и не реагирует с сыворотками других типов и подтипов вируса гриппа Interacts with type-specific antisera (H1, H3 and B), and does not react with the sera of other types and subtypes of influenza virus
рН	6,8-7,4	7,05
Стерильность Sterility	Должен быть стерильным It must be sterile	Стерильна Sterile
Общий белок, мкг/доза Total protein, µg/dose	Не более 300 No more 300	286,0
Бактериальные эндотоксины Endotoxine	Не более 100 МЕ/доза No more 100 IU/dose	Менее 10 МЕ/доза Less 10 IU/dose
Специфическая активность A/NIBRG-121xp A/NYMC X-217 B/NYMC BX-49	Доверительный интервал содержания от 80 до 125% Confidence interval content from 80 to 125%	15,5 мкг/доза (µg/dose) 14,9 мкг/доза (µg/dose) 16,0 мкг/доза (µg/dose)
Овальбумин Ovalbumine	Не более 1 мкг/доза No more 1 µg/dose	Менее 1,0 мкг/доза Less 1,0 µg/dose
Детергенты (Тритон X-100, Твин-80) Detergents (Triton X-100, Tween-80)	Не более 500 мкг/доза No more 500 µg/dose	496 мкг/доза 496 µg/dose
Специфическая безопасность Residual infectious viruses	Не должна содержать живого вируса It must be inactive	Не содержит живого вируса гриппа Inactive

По результатам проведенных испытаний (таблица 9) установлено, что опытно-промышленная серия вакцины гриппозной аллантоисной расщепленной инактивированной по качеству (стерильность, общий белок, бактериальные эндотоксины, остаточное содержание овальбумина, β-пропиолактона) удовлетворяет требованиям Государственной фармакопеи РК и Европейской фармакопеи [13, 14].

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Настоящая работа направлена на получение опытно-промышленных образцов отечественной

трехвалентной сплит-вакцины против сезонного гриппа, которые по качеству способны удовлетворять всем требованиям национального и международного стандартов.

Следует отметить, что в технологическом отношении данная вакцина гораздо проще и дешевле в производстве по сравнению с известными зарубежными аналогами, и, следовательно, она более доступна для стран с ограниченными финансовыми ресурсами. К примеру, технологический процесс производства гриппозной сплит-вакцины в компании Smith Kline Beecham Pharma GmbH & Co KG [United States Patent, Patent number: US7,316,813 B2], состоит из таких этапов как: 1) осветление вирусной суспензии; 2) адсорбция вирусной суспензии; 3) фильтрация ресуспендированного осадка; 4) изопикническое проточное центрифугирование вирусного концентрата в линейном градиенте сахарозы (0-55%) с тиомерсалом; 5) повторное центрифугирование в градиенте сахарозы с диоксихолатом натрия; 6) стерильная фильтрация; 7) инактивация вируса; 8) ультрафильтрация; 9) заключительная стерилизующая фильтрация. Как видно из вышеизложенной схемы, процесс производства этого зарубежного аналога состоит из 9 основных технологических этапов. Для сравнения, в технологическом процессе производства нашей вакцины отсутствуют такие стадии как 2, 3, 5 и 6, вследствие чего требуется меньше трудовых и материальных затрат, оборудования, а также времени для производства определенной единицы продукции. При этом в отношении качества обе технологии позволяют получать продукцию, отвечающую требованиям национальных и международных фармакопей.

В результате проведенного комплекса исследований, включающих работы по освежению вируса методом предельных разведений на СПФ-РКЭ, лиофильному высушиванию, контролю на внешний вид, растворимость, остаточную влажность, стерильность, подлинность, патогенность для куриных эмбрионов, гемагглютинирующую и инфекционную активность, получены маточные расплодки штаммов NIBRG-121хр, А/НУМС Х-217, В/НУМС ВХ-49, в качественном отношении пригодные для производства вакцины против сезонного гриппа.

В соответствии с разработанной технологией изготовления вакцины, которая включала в себя такие технологические этапы как наработка вирусного материала; очистка и концентрирование вирусного материала; инактивация вирусной биомассы; диафильтрация инактивированного вирусного концентрата; расщепление, стерилизующая фильтрация очищенного и инактивированного концентрата; составление и контроль качества готового препарата вакцины была приготовлена опытно-промышленная серия трехвалентной гриппозной сплит-вакцины из вышеуказанных штаммов.

По результатам проведенных испытаний установлено, что приготовленная опытно-промышленная серия гриппозной сплит-вакцины по параметрам качества (стерильность, общий белок, бактериальные эндотоксины, специфическая активность, остаточное содержание овальбумина и детергентов) удовлетворяет требованиям Государственной фармакопеи РК и Европейской фармакопеи, и в связи с чем передана для проведения доклинического испытания безопасности и иммуногенности вакцины.

Финансирование

Начальные исследования по отработке каждого технологического этапа выполнены в рамках грантового проекта «Разработка технологии изготовления сезонной инактивированной трехвалентной сплит-вакцины против гриппа», дальнейшая работа по приготовлению опытно-промышленной серии проведена в рамках проекта «Изготовление и контроль качества опытно-промышленных серий трехвалентной сплит-вакцины против сезонного гриппа» программы «Организация и проведение доклинических и клинических испытаний трехвалентной сплит-вакцины против сезонного гриппа», финансируемой Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байер В.Е., Палаш А.М., Остерхаус А.Д. Сравнение иммуногенности и реактогенности субъединичных, цельновирионных и расщепленных вакцин против гриппа // *Русский Медицинский Журнал*. – 2000. – Т. 8, №5. – С. 17-23.
2. Beyer W.E.P., Nauta J.J.P., Palache A.M. et al. Immunogenicity and safety of inactivated influenza vaccines in primed populations: A systematic literature review and meta-analysis // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29, №34. – P. 5785-5792.
3. Bresson J.L., Perronne C., Launay O. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: phase I randomised trial // *Lancet*. – 2006. – Vol. 367. – P. 1657-1664.
4. Robert W., Frenck Jr., Belshe R. et al. Comparison of the immunogenicity and safety of a split-virion, inactivated, trivalent influenza vaccine (Fluzone®) administered by intradermal and intramuscular route in healthy adults // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29, №34. – P. 5666-5674.
5. WHO Expert Committee on Biological Standardization: fifty-fourth report. WHO technical report series; 927. Annex 3. Recommendations for the production and control of influenza vaccines (inactivated). – Geneva, Switzerland, 2003. – P. 99-135.
6. Akzhunusova I., Assanzhanova N., Tabynov K. et al. Optimization of influenza A and B viruses cultivation conditions for preparation of trivalent seasonal influenza split vaccine // *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2015. – Vol. 6, №6. – P. 1000-1007.
7. Методические указания МУ 3.3.2.1758-03 «Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа»: утв. главн. гос. сан. врачом РФ 28 сентября 2003 г. – 31 с.
8. Goldstein S., Blecher M. The spectrophotometric assay for polyethoxy nonionic detergents in membrane extracts: a critique // *Anal. Biochem*. – 1975. – Vol. 24. – P. 130-135.
9. Пат. 2503719 RU МПК7: C12N7/02 A61K39/145 A61K39/12. Способ очистки вирусов путем ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахара (варианты) / Грильбергер Л., Райтер М., Мундт В., Миттерер А., Шафхаузер Х.; заявитель и патентообладатель Бакстер Интернэшнл Инк. (США), Бакстер Хелткер С.А. (Китай); заявл. 30.04.08, опубл. 10.01.14; Бюл. №1; приоритет 04.05.07, №60/927692 (США).
10. Tosh P.K., Jacobson R.M., Poland G.A. Influenza vaccines: From surveillance through production to protection // *Mayo Clinic Proceedings*. – 2010. – Vol. 85, №3. – P. 257-273.
11. Lagacé-Wiens P.R.S., Rubinstein E., Gumel A. Influenza epidemiology-past, present, and future // *Critical Care Medicine*. – 2010. – Vol. 38, №4. – P. 1-9.
12. Tabynov K., Kydyrbayev Zh., Sansyzbay A. et al. Immunogenic and Protective Properties of the First Kazakhstan Vaccine against Pandemic Influenza A (H1N1) pdm09 in Ferrets // *Virologica Sinica*, Dec 2012. – Vol. 6, №27. – P. 345-352.
13. Государственная Фармакопея Республики Казахстан. – Алматы: Жибек Жолы, 2008. – Т. 1. – 592 с.
14. European Pharmacopoeia EP 5.0-01/2005-0158 Monograph Influenza vaccine (split virion, inactivated).

REFERENCES

1. Bayer V.E., Palash A.M., Osterhaus A.D. Sravnenie immunogenosti i reaktogenosti sub"edinichnykh, tsel'novirionnykh i rassheplennykh vaksin protiv grippa. *Russkii Meditsinskii Zhurnal*, 2000, vol. 8, no. 5, pp. 17-23.
2. Beyer W.E.P., Nauta J.J.P., Palache A.M. et al. Immunogenicity and safety of inactivated influenza vaccines in primed populations: A systematic literature review and meta-analysis. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 34, pp. 5785-5792.
3. Bresson J.L., Perronne C., Launay O. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: phase I randomised trial. *Lancet*, 2006, vol. 367, pp. 1657-1664.
4. Robert W., Frenck Jr., Belshe R. et al. Comparison of the immunogenicity and safety of a split-virion, inactivated, trivalent influenza vaccine (Fluzone®) administered by intradermal and intramuscular route in healthy adults. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 34, pp. 5666-5674.
5. WHO Expert Committee on Biological Standardization: fifty-fourth report. WHO technical report series; 927. Annex 3. Recommendations for the production and control of influenza vaccines (inactivated). Geneva, Switzerland, 2003, pp. 99-135.
6. Akzhunusova I., Assanzhanova N., Tabynov K., et al. Optimization of influenza A and B viruses cultivation conditions for preparation of trivalent seasonal influenza split vaccine. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015, vol. 6, no. 6, pp. 1000-1007.
7. Metodicheskie ukazaniia MU 3.3.2.1758-03 «Metody opredeleniia pokazatelei kachestva immunobiologicheskikh preparatov dlia profilaktiki i diagnostiki grippa»: utv. Glavn. gosud. san. vrachom RF 28 sentiabria 2003 g. – 31 p.

8. Goldstein S., Blecher M. The spectrophotometric assay for polyethoxy nonionic detergents in membrane extracts: a critique. *Anal. Biochem.*, 1975, vol. 24, pp. 130-135.
9. Pat. 2503719 RU Int. Cl. 7: C12N7/02 A61K39/145 A61K39/12. Method of virus treatment by ultracentrifugation in sugar concentration gradient (versions): Grill'berger L., Rajter M., Mundt V., Mitterer A., Shafkhauser Kh.; Proprietor(s) Baxster International Inc. (US), Baxter Healthcare C.A. (Ch); appl. 30.04.08, publ. 10.01.14; Bul. №1; priority 04.05.07, №60/927692 (US).
10. Tosh P.K., Jacobson R.M., Poland G.A. Influenza vaccines: From surveillance through production to protection. *Mayo Clinic Proceedings*, 2010, vol. 85, no. 3, pp. 257-273.
11. Lagacé-Wiens P.R.S., Rubinstein E., Gumel A. Influenza epidemiology-past, present, and future. *Critical Care Medicine*, 2010, vol. 38, no. 4, pp. 1-9.
12. Tabynov K., Kydyrbayev Zh., Sansyzbay A. et al. Immunogenic and Protective Properties of the First Kazakhstan Vaccine against Pandemic Influenza A (H1N1) pdm09 in Ferrets. *Virologica Sinica*, 2012, vol. 6, no. 27, pp. 345-352.
13. State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. Almaty, Zhibek Zholy, 2008, vol. 1, 592 p.
14. European Pharmacopoeia EP 5.0-01/2005-0158 Monograph Influenza vaccine (split virion, inactivated).

АЛҒАШҚЫ ҚАЗАҚСТАНДЫҚ МАУСЫМДЫҚ ТҰМАУҒА ҚАРСЫ СПЛИТ-ВАКЦИНАНЫ ӨЗІРЛЕУДІҢ ТЕХНОЛОГИЯЛЫҚ АСПЕКТІЛЕРІ

**Асанжанова Н.Н., Қыдырбаев Ж.Қ., Рыскельдинова Ш.Ж.,
Қасенов М.М., Хайруллин Б.М., Табынов Қ.Қ.**

*Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты
Гвардейск қ.т.к., Қордай ауданы, Жамбыл облысы, 080409, Қазақстан
anurika@mail.ru*

ТҮЙІН

Зерттеу жұмысында Қазақстан Республикасында маусымдық тұмауға қарсы эксперименталды үшвалентті инактивтелген сплит-вакцинаны дайындау технологиялық сатыларының өңдеу нәтижелері көрсетілген. Зерттеу нәтижесінде сапасы жағынан маусымдық тұмауға қарсы вакцинаны дайындауға сай келетін А/NIВRG-121хр (H1N1), А/NYMC X-217 (H3N2) және В/NYMC ВХ-49 (В типі) штамдарының бастапқы және екпе өсімдері алынды. А/NIВRG-121хр (H1N1), А/NYMC X-217 (H3N2) және В/NYMC ВХ-49 (В типі) тұмау вирустарының белсенділігін жою, тазалау және ағынды центрифугада қоюландыру, β-пропиолактонды қолдана отырып, инактивтеу және ыдырату сатысына қолайлы тәртіптеме анықталды және тазартылған және инактивтелген вирустық концентраттарды тұрақтандыру сатыларында сапаның технологиялық сараптама жұмыстары жүргізілді. Сапа сараптамасы денсаулық сақтау саласына арналған вакциналардың биологиялық өндіріс барысында дайындау мен сапасын қадағалау жөнінде қабылданған нормалары бойынша жүргізілді. Қазақстан Республикасында алғаш рет NIВRG-121хр, А/NYMC X-217 (H3N2) және В/NYMC ВХ-49 штамдарынан маусымдық тұмау вирусына қарсы үш валентті сплит-вакцинаның тәжірибелік өндірістік сериялары даярланды. Технологиялық сараптама жұмыстары арқасында дайындалған вакцинаның сапасы Қазақстан Республикасының Мемлекеттік Фармокопеясы мен Еуропалық Фармокопея талаптарына сай екендігі көрсетілді.

Негізгі сөздер: маусымдық тұмау вирусы, өсіру шарттары, тазалау және қоюландыру, инактивтеу, ыдырату, тұрақтандыру, вакцина.