

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА
СУБЛИМАЦИОННОГО
ВЫСУШИВАНИЯ
КУЛЬТУРАЛЬНЫХ
ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫХ
ВАКЦИННЫХ ОБРАЗЦОВ
ВИРУСА ГРИППА А/Н5N2**

**Мазуркова Н.А., Скарнович М.О.,
Трошкова Г.П., Шишкина Л.Н.**

*ФГУН ГНЦ вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

Роспотребнадзора,

*р.п. Кольцово, Новосибирской области,
e-mail: troshkova@vector.nsc.ru*

Вирусы гриппа – единственные возбудители, способные вызывать в современном мире пандемии. В настоящее время в связи с продолжающейся циркуляцией высокопатогенного гриппа H5N1 у птиц и случаями высоколетального заболевания у людей угроза пандемии гриппа сохраняется. По мнению экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) при начале пандемии первой линией защиты должна стать вакцинопрофилактика, особенно с помощью живой гриппозной вакцины, так как такой препарат возможно наработать в очень короткий период в больших объемах.

В настоящее время в России единственным разрешенным субстратом для производства гриппозных вакцин являются развивающиеся куриные эмбрионы. Однако широкое распространение высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц может привести к значительному сокращению поголовья кур и, как следствие, к нехватке куриных эмбрионов. Несомненным преимуществом культуральных вакцин будет возможность их быстрого изготовления в экстремальной пандемической ситуации.

Предлагаемая нами роллерная технология создания сухой живой культуральной гриппозной вакцины подтипа А/Н5N2 с использованием растительных протеаз и питательных сред на основе ферментативных растительных гидролизатов позволит сделать эту вакцину более экономичной и безопасной. Одним из факторов, влияющим на качество такой вакцины, является режим сублимационного высушивания.

Задачей настоящего исследования явилось изучение оптимальных условий лиофильного высушивания вакцинных образцов на основе холодоадаптированного реассортантного штамма вируса гриппа А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2),

полученных в клеточных линиях MDCK и Vero при использовании растительных компонентов.

Условия эксперимента

Для создания экспериментальных культуральных вакцинных образцов использовали холодоадаптированный (ca⁺) штамм вируса гриппа типа А (А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2)) (17/H5) (реассортант вирусов А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и А/утка/Потсдам/1402-6/86 (H5N2), соотношение генов 7:1), полученный Дешевой Ю.А. и Руденко Л.Г. в отделе вирусологии НИИЭМ СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург и любезно предоставленный нам для работы [1].

Вакцинные образцы были наработаны при множественности инфекции 0,3 ТЦД₅₀/кл. (50%-ная тканевая цитопатическая доза) и температуре 33 °С в течение 48 ч в 2-литровых роллерах («Bellco», США), площадью 690 см² в присутствии 4 мкг/мл папаина («Sigma», США) и 20 мкг/мл бромелайна («Sigma», США) в клеточных линиях MDCK (клетки почки взрослой самки кокер-спаниеля) в присутствии разработанных нами ранее [2] питательных сред на основе трипсинового гидролизата риса и гидролизата сои, полученного с помощью бромелайна. Во все ростовые среды для культивирования клеток MDCK добавляли 2% сыворотки крови плода коровы («Gibco», США).

В качестве стабилизатора для культуральных вакцинных образцов мы использовали три состава защитной среды. Основой для всех трех составов был 10%-ный раствор сахарозы («Sigma, США»). Кроме сахарозы в стабилизатор 2 дополнительно вводили 1,2% желатина («Sigma, США») (сахарозо-желатиновая среда – САЖ). В стабилизатор 3 кроме 10% сахарозы вводили 5% полученного с использованием бромелайна гидролизата соевой муки. Процедура лиофильного высушивания вакцинных образцов проводилась на адсорбционно-криогенном аппарате для сублимационного высушивания биологических материалов, разработанном в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» [3]. Вирусосодержащую жидкость каждого вакцинного образца в объеме 1 мл смешивали с 4 мл одного из трех стабилизаторов. Полученный материал разливали в ампулы по 0,5 мл. Ампулы с материалом устанавливали на подставку адсорбционно-криогенного аппарата, выдерживали при минус 79 °С в течение 10-12 ч, после чего помещали в адсорбционно-криогенный аппарат, который в свою очередь устанавливали в сосуд Дьюара СК-25. После установления в системе вакуума материал высушивали в течение 10-12 ч при

температуре минус 50 °С. Затем ампулы с высушенным материалом заполняли инертным газом (аргоном) и запаивали и использованием медицинского сварочного аппарата САМ-1 (Россия).

Остаточную влажность сухих вакцинных образцов измеряли стандартным термографическим способом [4]. Биологическую активность образцов определяли титрованием по ТЦД₅₀ на клетках MDCK [5]. Снижение биологической активности лиофилизированных образцов изучали для температуры 37 °С (тест на термостабильность) [6].

Полученные результаты статистически обработаны с использованием общепринятых методов вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Процесс высушивания вакцинных образцов состоит из замораживания при низких температурах и собственно сублимации. Во время стадии криоконсервирования (глубокого замораживания), представляющего собой наибольшую опасность для сохранности клеток, вирусов и других объектов, нам необходимо было выбрать стабилизаторы, которые могут предохранить вирусный материал от криповреждений, а также провести процесс лиофилизации в указанных выше условиях. В практике сублимационного высушивания вирусных препаратов в качестве стабилизатора широко используют сахарозу, лактозу, мальтозу, декстран, тиомочевину, диметилсульфоксид, сорбит и другие вещества [7]. При этом в состав всех широко известных стабилизаторов входит один или несколько компонентов животного происхождения. В качестве стабилизатора для живых аллантоисных гриппозных вакцин используют смесь желатиноля, сорбитола, альбумина и гидролизина (или инфузамина) и пептон сухой, ферментативный.

В наших исследованиях в качестве стабилизаторов для культуральных вакцинных гриппозных образцов были использованы разные защитные среды, которые, за исключением САЖ, не содержат компонентов животного происхождения.

В случае использования двухкомпонентной защитной среды, включающей в себя сахарозу и желатин (САЖ), инактивация полученных на клетках MDCK экспериментальных вакцинных образцов в процессе сублимационного высушивания по выше представленному режиму составляла (0,6–1,0) Ig. Для образцов, приготовленных со стабилизатором 1, снижение инфекционного титра было больше по сравнению с применением стабилизаторов 2 и 3. Так высушивание материала только в присутствии 10% сахарозы без других стабилизирующих добавок (стаби-

лизатор 1) сопровождалось максимальными потерями, которые составляли (1,1-1,6) Ig. Показано, что для всех исследованных вакцинных образцов наилучшими защитными свойствами обладал стабилизатор 3, состоящий из смеси 10% сахарозы и 5% ферментативного гидролизата соевой муки, полученного с использованием бромелайна. Снижение титра у образцов с этим стабилизатором составляло (0,50-0,65) Ig, что было ниже по сравнению с использованием САЖ для этих же образцов (0,60-0,95) Ig. Остаточная влажность лиофилизированных вакцинных образцов составляла 1,0-3,0%.

Полученные сухие вакцинные образцы хранили при температуре 6 ± 2 °С в течение 1 года.

Последующее проведение тестов на термостабильность путем экспозиции сухих образцов в условиях повышенной температуры – в течение 7 сут при 37 °С подтвердили эффективность применения защитного состава на основе смеси сахарозы и гидролизата соевой муки для лиофилизации культуральных вакцинных образцов. При этом установлено, что величина потерь инфекционной активности при режимном хранении образцов со стабилизатором на основе смеси сахарозы и ферментативного гидролизата соевой муки составляла (0,55-0,60) Ig, что было на (1,25-1,40) и (0,25-0,60) Ig меньше, чем со стабилизаторами 1 и 2, соответственно.

Таким образом, использование предложенного стабилизатора, содержащего 10% сахарозы и 5% гидролизата соевой муки, полученного с помощью бромелайна, позволяет более эффективно по сравнению с другими использованными стабилизаторами проводить процесс высушивания с максимальным сохранением инфекционного титра холодоадаптированного роеассортантного вируса гриппа А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2), входящего в состав культуральных образцов живой вакцины, разработанных с использованием растительных компонентов. Кроме того, в качестве белкового носителя в стабилизаторе использованы только компоненты растительной природы, что существенно с точки зрения безопасности вакцинного препарата.

Список литературы

1. Дешева Ю.А., Руденко Л.Г., Александрова Г.И. Штамм вируса гриппа А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2) для производства живой и инактивированной гриппозной вакцины. Патент № 2318871, 2008.
2. Трошкова Г.П., Сумкина Т.П., Мартынец Л.Д., Мазуркова Н.А. Питательная среда

для культивирования клеток млекопитающих. Патент РФ № 2377295, 2009.

3. Онищенко Г.Г., Сергеев А.Н., Скарнович М.О., Агафонов А.П., Стодольский И.М., Мистюрин Ю.Н., Гуськова Н.В., Дроздов И.Г. Адсорбционно-криогенный аппарат для сублимационного высушивания биологических материалов. Патент № 55949, 2006.

4. Методические рекомендации по контролю качества вирусологических питательных сред. – М., 1985. – 14 с.

5. Вирусология. Методы / пер. с англ. Б. Мейхи. – М.: Мир; 1988. – 344 с..

6. И-42-2-82. Инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода «ускоренного старения» при повышенной температуре. – М., 1983. – 13 с.

7. Звягин И.В., Хорьков И.А., Токарик Э.Ф. и др. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания-высушивания биологических препаратов. – М: Изд-во Минсельхоз СССР, 1981. – 35 с.

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А/Н3N2

Мазуркова Н.А.

*ФГУН ГНЦ вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

Роспотребнадзора,

*р.п. Кольцово, Новосибирской области,
e-mail: troshkova@vector.nsc.ru*

Успехи в определении аминокислотной последовательности, пространственной и антигенной структуры белков стимулировали интерес к использованию в качестве антигенов синтетических пептидов, имеющих последовательность антигенных сайтов вирусных белков [1]. Конъюгаты таких пептидов с высокомолекулярными носителями при введении в организм млекопитающего могут вызвать иммунный ответ против инфекционного агента. В связи с этим в 80-е годы возникло новое направление по созданию биосинтетических вакцин на основе пептидных фрагментов, соответствующих аминокислотной последовательности тех структур вирусного (бактериального) белка, которые распознаются иммунной системой и вызывают иммунный ответ. В настоящее время в литературе сообщается

о многочисленных примерах успешного создания синтетических препаратов, способных индуцировать наработку в организме животных нейтрализующих антител к ряду вирусов, в том числе и к вирусу гриппа [2].

Основной мишенью для нейтрализующих антител у вируса гриппа является тяжелая цепь (HA1) гемагглютинина. При этом показано, что иммунный ответ направлен против отдельных элементов цепи HA1, так называемых антигенных сайтов. Исследованием антигенных и иммуногенных свойств синтетических пептидных фрагментов HA вируса гриппа занимаются ученые в разных странах [2], однако сопоставить полученные ими данные нелегко, так как при изучении одних и тех же антигенных сайтов авторы использовали пептиды разной длины и аминокислотной последовательности, применяли неодинаковые носители, способы конъюгации, а также схемы иммунизации. Следует также отметить, что в большинстве работ авторы ограничивались оценкой способности антипептидных антител связываться с HA или вирусом в методе иммуноферментного или радиоиммунного анализа и не исследовали антигемагглютинирующие и нейтрализующие свойства полученных антител.

Цель настоящей работы – исследование иммуногенных свойств синтетических пептидов, соответствующих некоторым предполагаемым антигенным сайтам HA вируса гриппа А/Н3N2, конъюгированных с белком-носителем – бычьим сывороточным альбумином (БСА).

Материалы и методы

В работе использовали вирус гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2), полученный из музея вирусов ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Иванова РАМН, Москва.

Использовали синтезированные в лаборатории ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под руководством В.В. Самукова пептиды, соответствующие участкам 122-133 (Thr Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Cys¹), 136-147 (Ser Asn Ala Cys Lys Arg Gly Pro Gly Ser Gly Phe), 154-164 (Leu Thr Lys Ser Gly (или Glu) Ser Thr Tyr Pro Val leu Cys) [3]. Через имеющиеся в составе или искусственно введенные остатки цистеина (Cys¹) пептиды были конъюгированы с БСА с помощью бифункционального сшивающего реагента N-оксисукцинимидного эфира 3-(2-пиридилдитио)-пропионовой кислоты (SPDP) [3].

Для постановки реакции нейтрализации (РН) использовали линию клеток MDCK – клетки почки взрослой самки кокер – спаниеля