

Применение ионообменной хроматографии при разработке технологии получения инактивированной вакцины против полиомиелита

А. Н. Пиняева*¹, А. А. Ковпак¹, Ю. Ю. Ивин¹, С. Х. Санджиева¹, А. А. Шишова^{1,2},
И. О. Целых¹, В. Е. Василенко¹, К. В. Каа¹, Ж. Х. Мажед¹,
Ю. Х. Хапчаев¹, А. А. Синюгина¹, А. А. Ишмухаметов^{1,2}

¹ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова МЗ России (Сеченовский Университет), Москва

Резюме

Актуальность. Производство и контроль качества любых лекарственных средств жёстко регламентированы. В случае противовирусных вакцин требования к их безопасности и протективной активности с каждым годом ужесточаются. Во время разработки и производства иммунобиологических препаратов производители должны продемонстрировать достаточную очистку от технологических примесей, чтобы обеспечить чистоту препарата. **Цель.** Подбор сорбентов и реагентов для хроматографии, проводимой с целью снижения количества технологических примесей при производстве инактивированной вакцины против полиомиелита. **Материалы и методы.** Для получения вирусных суспензий культуру-продуцент заражали полиовирусом 1 типа (штамм Сэбина LSc 2ab), 2 типа (штамм Сэбина P712 Ch 2ab) и 3 типа (штамм Сэбина Leon 12a1b). Множественность заражения составляла $0,02 \pm 0,01$ ТЦД₅₀/клетка. Для оценки эффективности проведения ионообменной хроматографии определяли степень очистки фракций от балластных белков, степень очистки фракций от остаточной клеточной ДНК и степень извлечения целевого антигена рассчитывали по определенным формулам. **Результаты и обсуждение.** Было проведено более 80 экспериментов по очистке концентратов полиовируса 1 типа, 2 типа и 3 типа с использованием различных сорбентов. При контроле качества очищенных концентратов полиовирусов 1 типа, 2 типа и 3 типа помимо анализа на общий белок проводили анализ на наличие белков клеток Vero. **Заключение.** Применение предложенных модификаций очистки концентратов штаммов Сэбина вируса полиомиелита 1, 2 и 3 типов с помощью ионообменной хроматографии позволяют получать инактивированные вирусные препараты, отвечающие 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). Кроме того, дополнительная очистка препаратов с использованием ионообменной хроматографии позволяет снизить содержание остаточной клеточной ДНК практически до нуля, что делает инактивированную вакцину против полиомиелита наиболее привлекательной для включения её в состав разных комбинированных вакцин

Ключевые слова: инактивированная вакцина против полиомиелита (ИПВ), полиомиелит, штаммы Сэбина, ионообменная хроматография, клеточная линия Vero, остаточная клеточная ДНК

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Пиняева А. Н., Ковпак А. А., Ивин Ю. Ю. и др. Применение ионообменной хроматографии при разработке технологии получения инактивированной вакцины против полиомиелита. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022;21(5): 107–119. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-5-107-119>

Благодарность: авторы статьи выражают благодарность М.В. Онофрийчук за оказанную помощь на разных этапах исследования.

* Для переписки: Пиняева Анастасия Николаевна, начальник управления разработки и внедрения инновационных и полупромышленных технологий ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, 108819, г. Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1. +7 (925) 408-83-07, pinayeva_an@chumakovs.ru. ©Пиняева А. Н. и др.

Application of Ion Exchange Chromatography in the Development of Technology to Obtain Inactivated Poliovirus Vaccine

AN Piniaeva*¹, AA Kovpak¹, YY Ivin¹, SH Sandzhieva¹, AA Shishova^{1,2}, IO Tcelykh¹,
VE Vasilenko¹, KV Kaa¹, ZhH Mazhed¹, YuKh Khapchaev¹, AA Siniugina¹, AA Ishmukhametov^{1,2}

¹ Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune- and Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Sechenov First Moscow State Medical University, of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract

Relevance. The production and quality control of any drugs are strictly regulated. In the case of antiviral vaccines, the requirements for their safety and protective activity are getting tougher every year. Vaccine manufacturers face three tasks: ensuring high immunogenicity, safety and availability of the drug. During the development and production of immunobiological drugs, manufacturers must demonstrate sufficient purification from technological impurities to ensure the purity of the drug. Technological impurities directly depend on the technological process and the expression systems used. The Vero cell line has been widely used in the production of various antiviral vaccines for many decades. Thus, the improvement of technological processes for the purification of vaccine preparations from proteins and DNA of Vero cells is still matter of current interest. **Aims.** Selection of resins and reagents for ion exchange chromatography to reduce the amount of technological impurities in the inactivated polio vaccine production. **Materials and Methods.** To obtain viral suspensions, producer cultures were infected with poliovirus type 1 (Sabin strain LSc 2ab), type 2 (Sabin strain P712 Ch 2ab), and type 3 (Sabin strain Leon 12a1b). Multiplicity of infection was 0.02 ± 0.01 TCD₅₀/cell. To evaluate the efficiency of ion-exchange chromatography we determined the degree of purification of fractions from ballast proteins, the degree of purification of fractions from residual cellular DNA, and the degree of extraction of the target antigen using specific formulas. **Results and discussion.** More than 80 experiments have been performed to purify type 1, type 2, and type 3 poliovirus concentrates using various sorbents. In quality control of purified concentrates of type 1, type 2 and type 3 polioviruses, in addition to analysis for total protein, an analysis was performed for the presence of Vero cell proteins.

Conclusion. The use of the proposed modifications of purification of concentrates of Sabin strains of poliovirus types 1, 2 and 3 using ion exchange chromatography allows to obtain inactivated viral products that meet the requirements of WHO and the European Pharmacopoeia both in biochemical parameters (the content of host-cell DNA and the content of ballast proteins, including host-cell proteins) and specific activity (D-antigen content). Furthermore, additional purification of vaccines using ion exchange chromatography allows to reduce the content of residual cellular DNA to almost zero, which makes the inactivated polio vaccine the most attractive for its inclusion in various combined vaccines.

Keywords: inactivated poliovirus vaccine (IPV), poliomyelitis, Sabin strains, ion exchange chromatography, Vero cell line, residual cellular DNA

No conflict of interest to declare.

For citation: Piniaeva AN, Kovpak AA, Ivin YY et al. Application of ion exchange chromatography in the development of technology to obtain inactivated poliovirus vaccine. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(5):107–119 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-5-107-119>

Acknowledgements: the authors are grateful to M.V. Onofriychuk for her assistance at various stages of the study.

Вакцины – это иммунобиологические препараты, которые направлены на искусственное формирование иммунитета путём индукции клеток памяти, специфичных к определённому возбудителю. Первые вакцины были изобретены несколько веков назад. Ярким примером успешной борьбы с одним из опаснейших вирусных заболеваний – натуральной оспой – являются исследования английского врача Эдварда Дженнера, который в качестве вакцины использовал жидкость из пустулы переболевшего коровьей оспой [1]. Прошло несколько столетий, за которые были разработаны и усовершенствованы методы наработки вирусной биомассы, её фильтрации, концентрирования, хроматографической очистки, инактивации, лиофилизации и многие другие технологические подходы к созданию вирусных

вакцин. В наше время производство и контроль качества любых лекарственных средств жестко регламентированы. В случае противовирусных вакцин требования к их безопасности и протективной активности с каждым годом ужесточаются. Перед производителями вакцин стоят три задачи: достичь высокой иммуногенности препарата, гарантировать его безопасность и обеспечить доступность. Во время разработки и производства иммунобиологических препаратов производители должны продемонстрировать:

- достаточную очистку от технологических примесей, чтобы обеспечить чистоту препарата;
- соответствие производственному процессу.

Примеси потенциально могут вызывать клинические побочные эффекты от препарата-кандидата [2], что, в свою очередь, потребует

* For correspondence: Piniaeva Anastasia N., Head of Division of Development and Integration of Innovative and Semi-industrial Technologies, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, building 1, premises 8, Village of Institute of Poliomyelitis, Moscow settlement, Moscow, 108819, Russia. +7 (925) 408-83-07, piniaeva_an@chumakovs.su. ©Piniaeva AN, et al.

усовершенствования технологических процессов с целью снижения содержания примесей и, как следствие, повторного проведения доклинических и клинических исследований. Технологические примеси включают широкий спектр компонентов, образующихся на разных этапах производства конечного препарата [3].

Это могут быть компоненты растворов, используемых в различных технологических процессах, балластные белки и остаточная ДНК клеток культуры-продуцента, на которой проводилась наработка вирусной биомассы [2,4,5]. Содержание технологических примесей напрямую зависит от технологического процесса и используемых систем экспрессии. При производстве разных противовирусных вакцин на протяжении многих десятилетий широко используется перевиваемая линия клеток Vero: живая и инактивированная вакцины против полиомиелита [6,7], инактивированная вакцина против бешенства [6], инактивированная вакцина против клещевого энцефалита [8], инактивированная вакцина против жёлтой лихорадки [9], инактивированная вакцина против вируса Чикунгунья [10].

Таким образом, усовершенствование технологических процессов очистки вакцинных препаратов от белков и ДНК клеток линии Vero по-прежнему остается актуальной проблемой. Остаточные уровни балластных белков клеток-продуцентов создают проблемы безопасности и иммуногенности [2]. Для культивирования клеточных линий при производстве инактивированных вакцин часто используют питательные среды с добавлением сыворотки крови коров. Таким образом, в составе вирусосодержащей жидкости, помимо белков клеток-продуцентов находятся различные белки сывороточного происхождения и производные питательной среды [11]. Всё это приводит к увеличению концентрации общего белка в вирусосодержащей жидкости. 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. При производстве многих противовирусных вакцин одним из этапов технологического процесса является ультрафильтрация. При этом выбор мембран с подходящим отсечением позволяет существенно уменьшить белковую нагрузку на следующих этапах очистки [11].

При проведении эксклюзионной хроматографии необходимо выбрать сорбент с таким диапазоном фракционирования, который с хорошими показателями по выходу целевого продукта позволит снизить также и содержание балластных белков на 80–90% [12]. Осветляющая фильтрация, ультрафильтрация и эксклюзионная хроматография позволяют существенно сократить содержание балластных белков, но эти технологические процессы не всегда обеспечивают приемлемый уровень очистки от остаточной клеточной ДНК.

Существует вероятность того, что остаточная клеточная ДНК передаст либо активированный онкоген(ы), либо потенциально инфекционную вирусную ДНК реципиентам продукта, особенно если биологический продукт произведен в клеточной линии, обладающей онкогенным потенциалом [13]. 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 [14]. ВОЗ допускает использование клеток аттестованных банков культуры Vero до 150 пассажа [15].

Содержание остаточной ДНК клеток-продуцентов не должно превышать 10 нг в разовой дозе, рекомендованной для человека [16]. Такое низкое содержание остаточной клеточной ДНК требует включения специальной стадии очистки вакцинного препарата – ионообменной хроматографии (ИОХ) [6,17,18]. **Цель исследования** – подбор сорбентов и реагентов для ионообменной хроматографии, проводимой с целью снижения количества технологических примесей при производстве инактивированной вакцины против полиомиелита.

Материалы и методы

Получение вирусного концентрата

В качестве клеточной системы использовали культуру клеток линии Vero, полученную от ВОЗ (Швейцария). Партии культуры-продуцента готовили из клеточного пула аттестованного рабочего банка клеток Vero. Культуры использовали до 149 уровня пассажа. Клетки выращивали на среде Игла МЕМ (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») с добавлением 5% сыворотки крови эмбрионов коров (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург).

Для получения вирусных суспензий культуру-продуцент заражали полиовирусом 1 типа (штамм Сэбина LSc 2ab), 2 типа (штамм Сэбина P712 Ch 2ab) и 3 типа (штамм Сэбина Leon 12a₁b). Множественность заражения составляла $0,02 \pm 0,01$ ТЦД₅₀/клетка.

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, США), XDR-50 Xcellerex (Cytiva, США), BIostat STR 200 (Sartorius Stedim Biotech, Франция) на микроносителях Cytodex 1 и Cytodex 3 (Cytiva). 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). Затем вирусосодержащие жидкости концентрировали при помощи модульной настольной тангенциальной ультрафильтрационной системы (Sartoflow Advanced,

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

Sartorius Stedim Biotech) через мембраны из полиэфирсульфона с границами отсечения 50 кДа или 100 кДа (Sartorius Stedim Biotech).

Хроматография: гель-фильтрация.

Для проведения гель-фильтрации (ГФ) использовали хроматограф АКТА pure 150M (Cytiva). Хроматографические колонки HiScale 26/40 (Cytiva) и ХК 50/100 (Cytiva) были упакованы сорбентом для эксклюзионной хроматографии WorkBeads 40/1000 SEC (Bio-Works, Швеция). 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 бессолевым буферном растворе применяли 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, pH 7,2 ± 0,1 (раствор 1), для получения очищенного концентрата в солевом буферном растворе применяли – 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, pH 7,2 ± 0,1, содержащий 0,1М натрия хлорида (раствор 2). Скорость потока и условия регенерации были выбраны согласно рекомендациям производителя сорбента [19].

Контроль качества

Определение концентрации D-антигена

Концентрацию D-антигена полиовируса определяли методом твердофазного ИФА в «сэндвич» варианте, разработанным в ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» [20].

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.

Определение концентрации остаточной клеточной ДНК

Концентрацию остаточной клеточной ДНК в вирусных препаратах определяли 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 K-CORB (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; MgCl – 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 этого 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 секунд, 60 °C – 40 минут. По значениям, полученным для стандартного образца, строили калибровочную кривую зависимости десятичного логарифма концентрации ДНК от величины порогового цикла. По кривой зависимости рассчитывали значение концентрации остаточной клеточной ДНК для исследуемых препаратов.

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-НСI (pH 6,8), 200 мМ β-мекаптоэтанола, 2% раствор лаурилсульфата натрия, бромфеноловый синий 0,01%), тщательно перемешивали и инкубировали при 95 °C 5 мин. Готовые пробы подвергали электрофорезу по методу Лэмми согласно ОФС.1.2.3.0023.15. Электрофорез в полиакриламидном геле, Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том I. 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 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 специфичные антитела к клеткам Vero, полученные в ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН», в разведении 1:400. После инкубации с первичными антителами мембрану промывали 3 раза по 5 минут в буфере для блокировки без молока и помещали на 1 час в раствор вторичных антител (anti-Rabbit IgG, Promega, США) в буфере для блокировки в разведении 1:2500. Затем мембрану промывали 3 раза по 5 минут 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.

Расчёт степени очистки от примесей и степени извлечения целевого антигена

Для оценки эффективности проведения ионообменной хроматографии определяли степень очистки фракций от балластных белков (1), степень очистки фракций от остаточной клеточной ДНК (2) и степень извлечения целевого антигена (3) рассчитывали по формулам:

$$CO_{ББ} = 100 - \frac{C_{ОБ_ИОХ} \times V_{ИОХ}}{C_{ОБ_ГФ} \times V_{ГФ}} \times 100, (1)$$

$$CO_{\text{ДНК}} = 100 - \frac{C_{\text{ДНК_ИОХ}} \times V_{\text{ИОХ}}}{C_{\text{ДНК_ГФ}} \times V_{\text{ГФ}}} \times 100, (2)$$

$$CI = \frac{C_{\text{D-AG_ИОХ}} \times V_{\text{ИОХ}}}{C_{\text{D-AG_ГФ}} \times V_{\text{ГФ}}} \times 100, (3)$$

где $CO_{\text{ББ}}$ – степень очистки от балластных белков, %;
 $CO_{\text{ДНК}}$ – степень очистки от остаточной клеточной ДНК, %;

СИ – степень извлечения, %;

$C_{\text{ОБ_ИОХ}}$ – концентрация общего белка в очищенном концентрате полиовируса после ионообменной хроматографии, мкг/мл;

$C_{\text{ДНК_ИОХ}}$ – концентрация остаточной клеточной ДНК в очищенном концентрате полиовируса после ионообменной хроматографии, мкг/мл;

$C_{\text{D-AG_ГФ}}$ – концентрация D-антигена в фракции очищенного концентрата полиовируса после ионообменной хроматографии, D-АГ/мл;

$V_{\text{ИОХ}}$ – объём фракции очищенного концентрата полиовируса после ионообменной хроматографии, мл;

$C_{\text{ОБ_ГФ}}$ – концентрация общего белка в концентрате полиовируса после гель-фильтрации, мкг/мл;

$C_{\text{ДНК_ГФ}}$ – концентрация остаточной клеточной ДНК в концентрате полиовируса после гель-фильтрации, мкг/мл;

$C_{\text{D-AG_ГФ}}$ – концентрация D-антигена в концентрате полиовируса после гель-фильтрации, D-АГ/мл;

$V_{\text{ГФ}}$ – объём концентрата полиовируса после гель-фильтрации, мл.

Статистический анализ

Для всех данных применяли описательную статистику: данные были проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Так как данные не соответствовали закону нормального распределения, рассчитывали медиану (Me) и квартильный размах (Q1; Q3), представленные в таблицах и на диаграммах.

При попарном сравнении непараметрических данных применяли критерий Манна-Уитни. Различия определяли при уровне значимости

$p < 0,05$. Статистический анализ выполняли с помощью лицензионного программного обеспечения OriginPro 8 (OriginLab Corp., США).

Результаты и обсуждение

Для градиента на линии А1 был установлен 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, pH $7,2 \pm 0,1$ (раствор 1) и на линии В1 был установлен – 0,04 М натрий фосфатный буферный раствор, pH $7,2 \pm 0,1$, содержащий 1М натрия хлорида (раствор 3). Градиентная хроматография была выполнена дважды на разных сериях концентратов (серия № 1 и № 2) полиовируса 2 типа, которые были получены с помощью раствора 1 на гель-фильтрации. Затем при подобранном с помощью градиентной хроматографии буферном растворе (раствор 2) была проведена ионообменная хроматография трёх серий концентратов полиовируса 2 типа, полученных с помощью раствора 2 на гель-фильтрации. Ионообменная хроматография 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 ёмкостью. Характеристики сорбентов представлены в таблице 1. Ввод концентрата полиовируса выполняли через петлю объёмом 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 [21,22].

На рисунках 1а и 1б представлены хроматограммы градиентной хроматографии на сорбенте DEAE Sepharose FF серии № 1 и серии № 2 соответственно. Результаты хроматографических очисток представлены в таблице 2.1. и 2.2.

На рисунках 2а и 2б представлены хроматограммы градиентной хроматографии на сорбенте Q Sepharose FF серии № 1 и серии № 2 соответственно. Результаты хроматографических очисток представлены в таблицах 3.1. и 3.2.

При нанесении концентратов, полученных с помощью раствора 1 на гель-фильтрации, на уравновешенные также раствором 1 колонки с сорбентами

Таблица 1. Характеристика сорбентов
Table 1. Characteristics of resins

Сорбент Resin	Тип ионо-обменника Ion exchange type	Ионная ёмкость, ммоль Cl/ мл сорбента Ionic capacity, mmol/ml resin	Средний размер частиц сорбента, мкм Average particle size of resin, µm
DEAE Sepharose FF (Cytiva)	Слабый Weak	0,11–0,16	90
Q Sepharose FF (Cytiva)	СильныйStrong	0,18–0,25	90
Capto DEAE (Cytiva)	Слабый Weak	0,29–0,35	90

Рисунок 1. Градиентная ионообменная хроматография на сорбенте DEAE Sepharose FF концентрата полиовируса 2 типа серии № 1 (А) и № 2 (Б)

Figure 1. The gradient ion exchange chromatography on the resin DEAE Sepharose FF of the concentrate of poliovirus type 2 batches № 1 (А) and № 2 (Б)

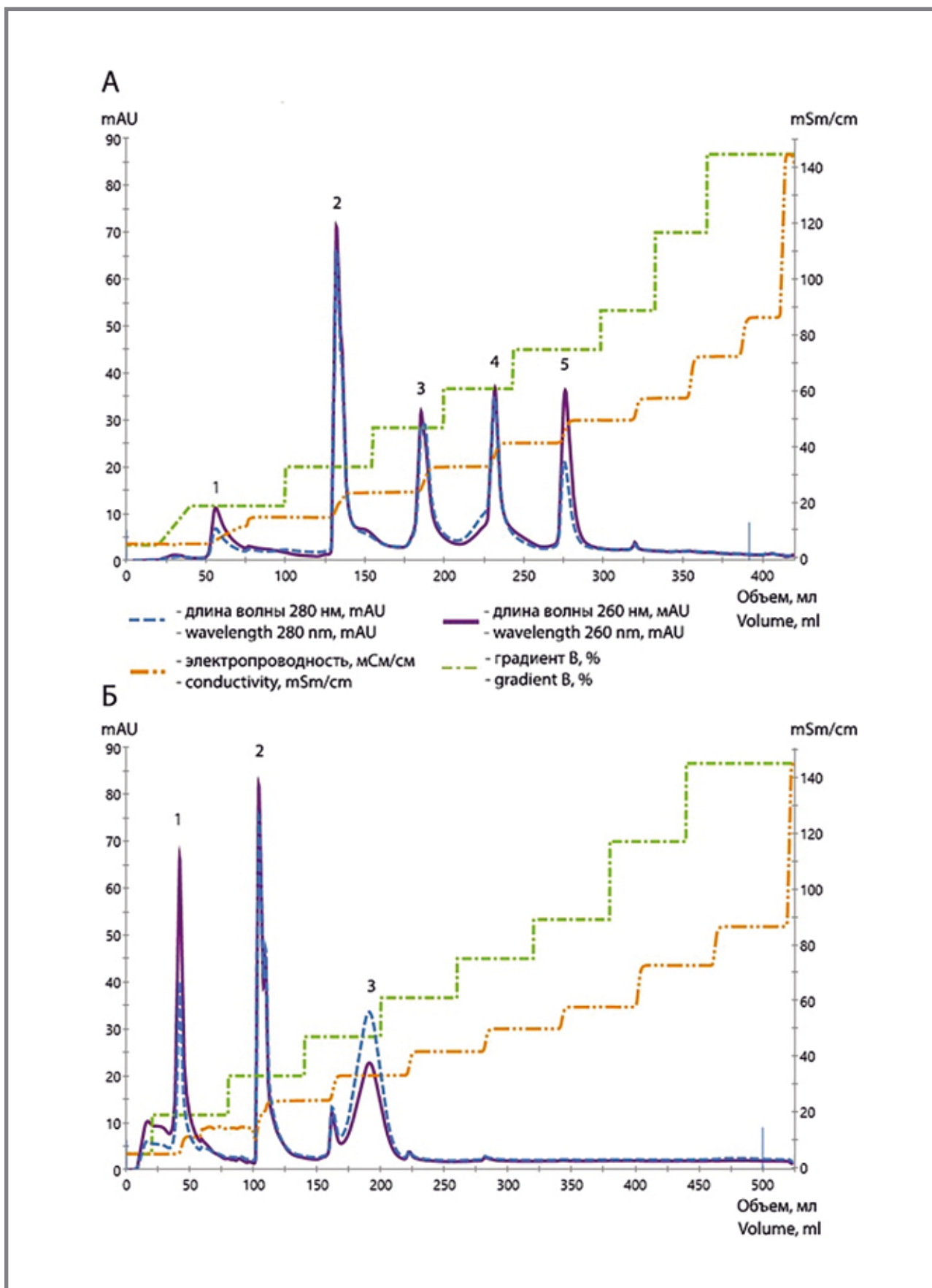


Таблица 2.1. Результаты градиентной ионообменной хроматографии на сорбенте DEAE Sepharose FF концентрата полиовируса 2 типа серии № 1**Table 2.1. The results of gradient ion exchange chromatography on the resin DEAE Sepharose FF of the concentrate of poliovirus type 2 batch № 1**

Номер пика Peak number	Концентрация натрия хлорида при элюировании пика The concentration of sodium chloride during peak elution	Степень извлечения, % Recovery, %	Степень очистки от балластных белков, % Degree of purification from ballast proteins, %	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, % Degree of purification from residual cellular DNA, %
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 2.2. Результаты градиентной ионообменной хроматографии на сорбенте DEAE Sepharose FF концентрата полиовируса 2 типа серии № 2**Table 2.2. The results of gradient ion exchange chromatography on the resin DEAE Sepharose FF of the concentrate of poliovirus type 2 batch № 2**

Номер пика Peak number	Концентрация натрия хлорида при элюировании пика The concentration of sodium chloride during peak elution	Степень извлечения, % Recovery, %	Степень очистки от балластных белков, % Degree of purification from ballast proteins, %	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, % Degree of purification from residual cellular DNA, %
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

Таблица 3.1. Результаты градиентной ионообменной хроматографии на сорбенте Q Sepharose FF концентрата полиовируса 2 типа серии № 1**Table 3.1. The results of gradient ion exchange chromatography on the resin Q Sepharose FF of the concentrate of poliovirus type 2 batch № 1**

Номер пика Peak number	Концентрация натрия хлорида при элюировании пика The concentration of sodium chloride during peak elution	Степень извлечения, % Recovery, %	Степень очистки от балластных белков, % Degree of purification from ballast proteins, %	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, % Degree of purification from residual cellular DNA, %
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

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 2.1., 2.2., 3.1. и 3.2. 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. Увеличение концентрации натрия хлорида в буферном растворе приводит к увеличению

Рисунок 2. Градиентная ионообменная хроматография на сорбенте Q Sepharose FF концентрата полиовируса 2 типа серии № 1 (А) и № 2 (Б)

Figure 2. The gradient ion exchange chromatography on the resin Q Sepharose FF of the concentrate of poliovirus type 2 batches № 1 (A) and № 2 (Б)

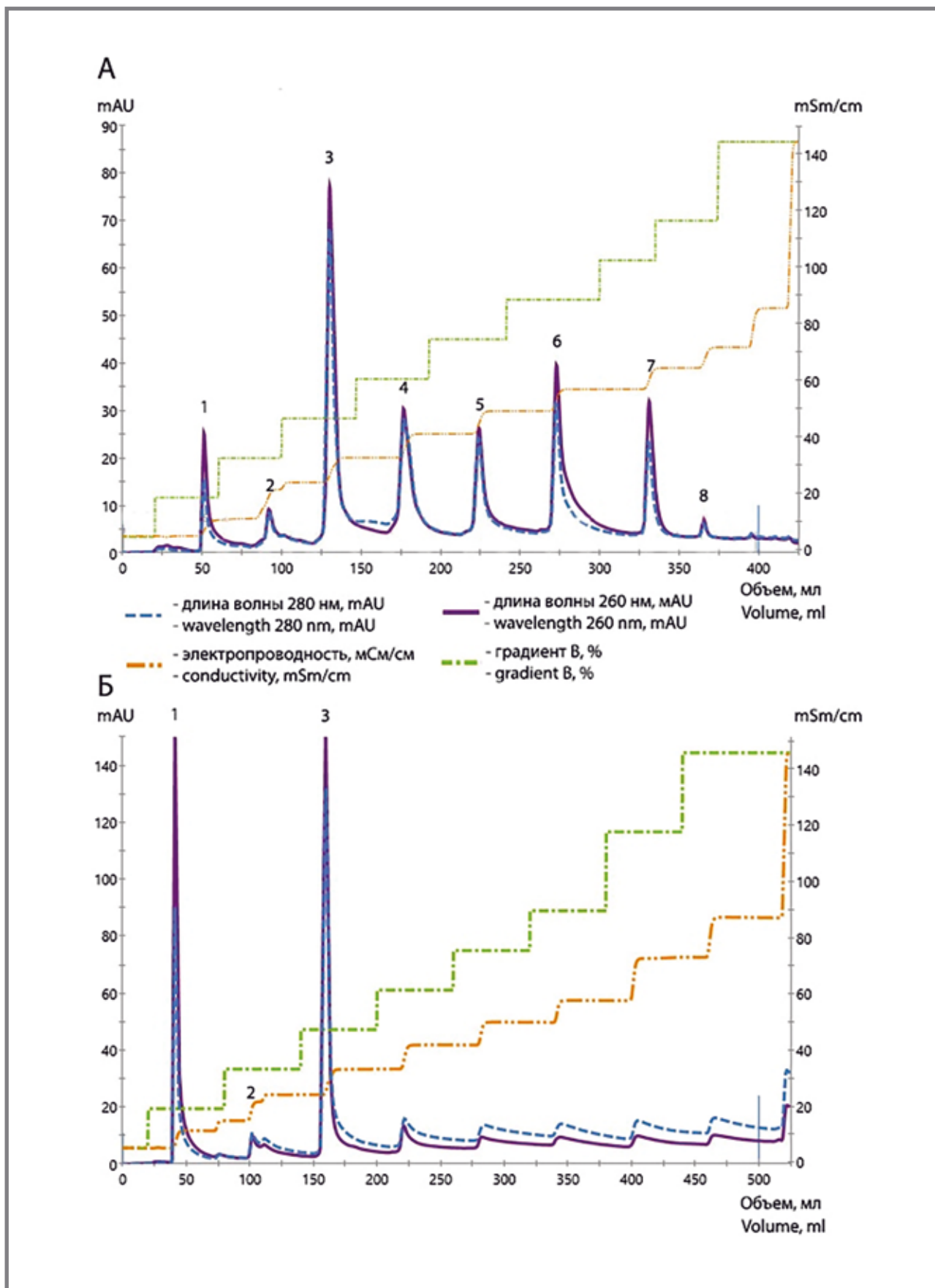


Таблица 3.2. Результаты градиентной ионообменной хроматографии на сорбенте Q Sepharose FF концентрата полиовируса 2 типа серии № 2**Table 3.2. The results of gradient ion exchange chromatography on the resin Q Sepharose FF of the concentrate of poliovirus type 2 batch № 2**

Номер пика Peak number	Концентрация натрия хлорида при элюировании пика The concentration of sodium chloride during peak elution	Степень извлечения, % Recovery, %	Степень очистки от балластных белков, % Degree of purification from ballast proteins, %	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, % Degree of purification from residual cellular DNA, %
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

содержания балластных белков и остаточной клеточной ДНК во фракциях. Дальнейшие эксперименты проводили с применением раствора 2 в качестве элюирующего буферного раствора.

Результаты очистки трёх серий концентратов полиовируса (табл. 4), подтвердили эффективность ионообменной хроматографии, 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 2 типа на сорбенте Capto DEAE (Cytiva).

Было проведено более 80 экспериментов по очистке концентратов полиовируса 1 типа, 2 типа и 3 типа 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 ёмкостью и являются аналогами сорбенту Capto DEAE, но с меньшей ионной

ёмкостью. Результаты экспериментов представлены на рисунке 3 и в таблице 5.

Медиана степени извлечения на сорбенте Capto DEAE выше в сравнении с сорбентами DEAE Sepharose FF для полиовируса 1 типа, 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 2 типа. 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 3 типа медиана степени извлечения выше на сорбенте DEAE Sepharose FF (Bio-Works). При этом степень извлечения на всех трёх сорбентах имеет статистически значимое различие ($p < 0,05$). Также наблюдается статистически значимое различие между степенью извлечения полиовируса 3 типа и степенью извлечения полиовируса 1 типа ($p < 0,05$).

При контроле качества очищенных концентратов полиовирусов 1 типа, 2 типа и 3 типа

Таблица 4. Результаты очистки трёх серий концентратов полиовируса 2 типа**Table 4. Purification results of three batches of poliovirus type 2 concentrates**

Сорбент Resin	Номер серии Batch number	Степень извлечения, % Recovery, %	Степень очистки от балластных белков, % Degree of purification from ballast proteins, %	Степень очистки от остаточной клеточной ДНК, % Degree of purification from residual cellular DNA, %
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	

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

Figure 3. The results of ion-exchange chromatography of concentrates of type 1, type 2 and type 3 poliovirus on three resins in terms of the recovery presented in the form of a median (Median) and interquartile range (Q1-Q3)

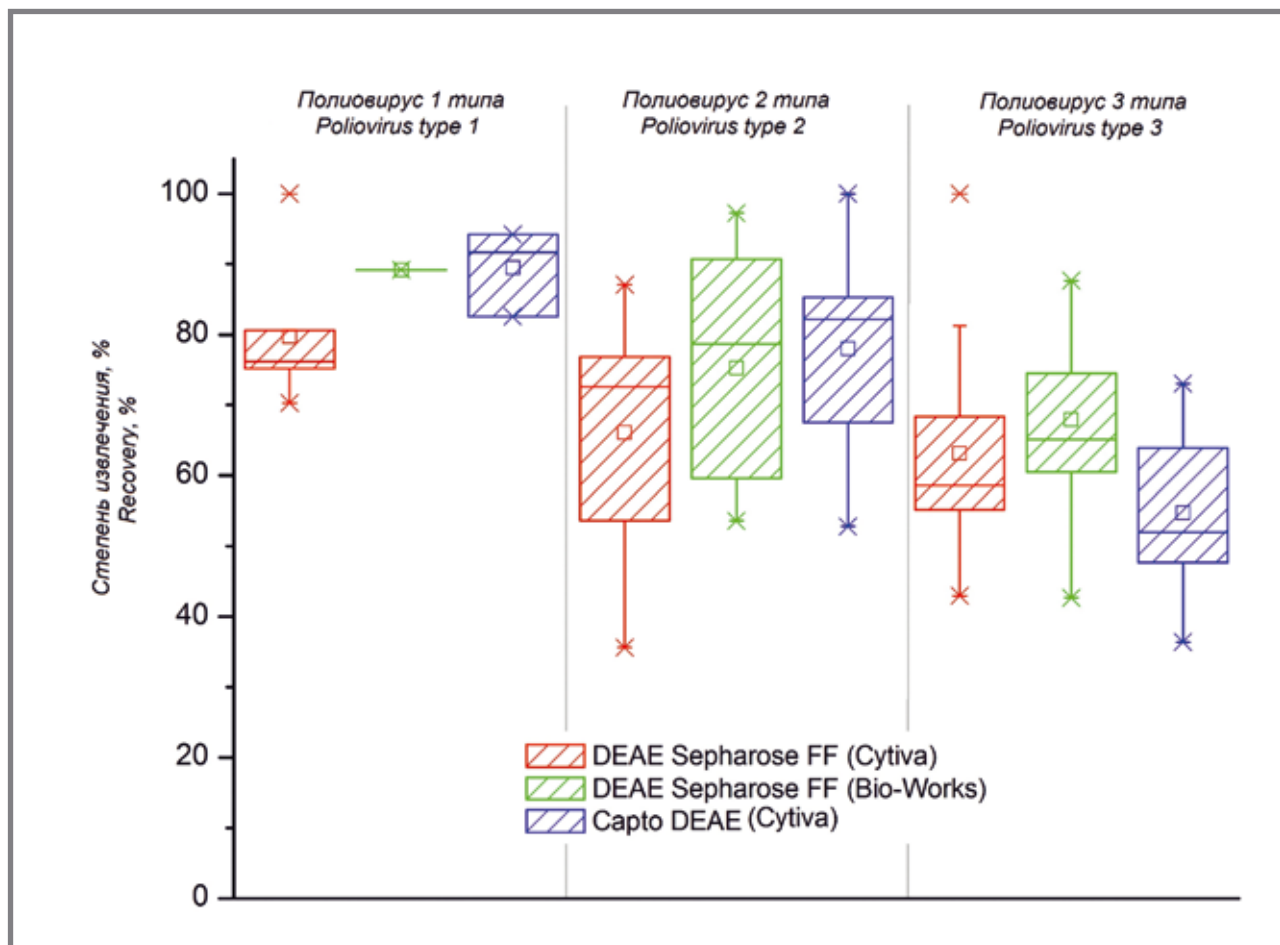


Таблица 5. Результаты ионообменной хроматографии концентратов полиовируса 1 типа, 2 типа и 3 типа на трёх сорбентах

Table 5. Results of ion exchange chromatography of type 1, type 2 and type 3 poliovirus concentrates on three resins

Сорбент Resin	Тип полиовируса Poliovirus type					
	1 тип Type 1		2 тип Type 2		3 тип Type 3	
	Количество опытов Number of experiments	Степень извлечения, % Recovery, % Me (Q1;Q3)	Количество опытов Number of experiments	Степень извлечения, % Recovery, % Me (Q1;Q3)	Количество опытов Number of experiments	Степень извлечения, % Recovery, % 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)

помимо анализа на общий белок проводили анализ на наличие белков клеток Vero. Для этого использовали образцы концентратов полиовирусов 1, 2 и 3 типов после гель-фильтрации, очищенных концентратов всех трёх типов полиовируса

после стадии ионообменной хроматографии, а также образец серии инактивированной трёхвалентной вакцины против полиомиелита. Образцы анализировали в денатурирующих условиях в иммуноблоте с использованием специфической

поликлональной сыворотки к белкам клеток Vero. Результаты представлены на рисунке 4. Как видно на рисунке 4, в образцах концентрата полиовируса 2 типа после гель-фильтрации выявляются клеточные белки, а в образцах очищенного концентрата полиовируса после ионообменной хроматографии клеточные белки не выявлены.

При разработке инаktivированных вакцин, применяемых как отдельный препарат или входящих в состав комбинированных вакцин, необходимо учитывать системы экспрессии, используемые при производстве каждого из таких компонентов. Роль систем экспрессии определяется тем, что от них напрямую зависит как содержание белков клеток-продуцентов, так и их ДНК в вакцинах. Суммарное содержание таких компонентов из разных систем экспрессии может непосредственно влиять на безопасность уже самих комбинированных вакцин. Так, показано, что два клеточных онкогена при совместной инокуляции индуцировали саркомы у мышей двух разных линий [13].

В свете этих данных включение в технологию изготовления вакцинных препаратов, в частности инаktivированной вакцины против полиомиелита, стадии очистки препаратов методом ионообменной хроматографии является, на наш взгляд, вполне оправданным для повышения безопасности как самой вакцины, так и, в случае применения ее в составе разных комбинированных вакцин, безопасности последних.

Анализ результатов градиентной ионообменной хроматографии на разных сорбентах концентратов полиовируса 2 типа 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 (табл. 2.1, 2.2, 3.1, 3.2). 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 Capto DEAE при очистке концентратов полиовирусов 1 и 2 типа показатели степени извлечения для обоих вирусных препаратов были высокими, т.е. содержание в них D-антигена было относительно высоким. В случае очистки концентратов полиовируса 3 типа оба показателя были значительно ниже показателей для 1 и 2 типов вируса.

При проведении ионообменной хроматографии на сорбентах DEAE Sepharose FF и Capto DEAE сорбент имеет положительный заряд. Остаточная клеточная ДНК и балластные белки имеют отрицательный заряд, за счёт чего происходит адсорбция технологических примесей (рис. 5).

По данным Y. Thomassen et al., изоэлектрическая точка полиовирусов 1 типа, 2 типа и 3 типа вакцинных штаммов Сэбина составляет 7,4, 7,2 и 6,3 соответственно [23]. По-видимому, при pH=7,2 полиовирусы 1 типа и 2 типа имеют слабые заряды, что обуславливает высокую степень извлечения. При pH=7,2 полиовирус 3 типа имеет отрицательный заряд, как следствие, происходит частичная адсорбция вируса при проведении ионообменной хроматографии. Отрицательный заряд полиовируса 3 типа при pH=7,2 обуславливает

Рисунок 4. Детекция белков клеток Vero методом иммуноблоттинга в образцах: 1 – концентрат полиовируса 2 типа после ГФ; 2 – концентрат полиовируса 1 типа после ГФ; 3 – концентрат полиовируса 3 типа после ГФ; 4 – очищенный концентрат полиовируса 1 типа после ИОХ; 5 – очищенный концентрат полиовируса 2 типа после ИОХ; 6 – очищенный концентрат полиовируса 3 типа после ИОХ; 7 – инаktivированная вакцина против полиомиелита

Figure 4. Detection of Vero cell proteins by immunoblotting in samples: 1 – poliovirus concentrate type 2 after GF; 2 – poliovirus concentrate type 1 after GF; 3 – poliovirus concentrate type 3 after GF; 4 – purified poliovirus concentrate type 1 after IEC; 5 – purified poliovirus concentrate type 2 after IEC; 6 – purified poliovirus concentrate type 3 after IEC; 7 – inactivated poliovirus vaccine

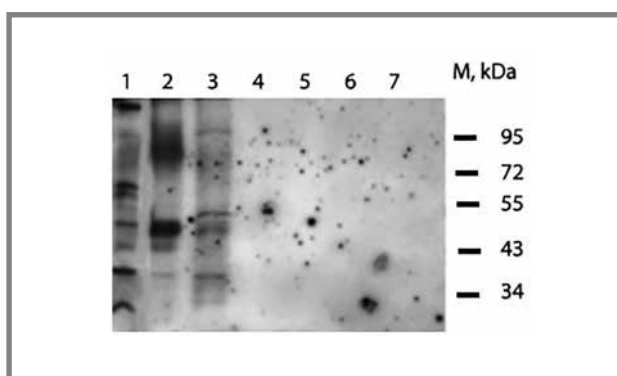
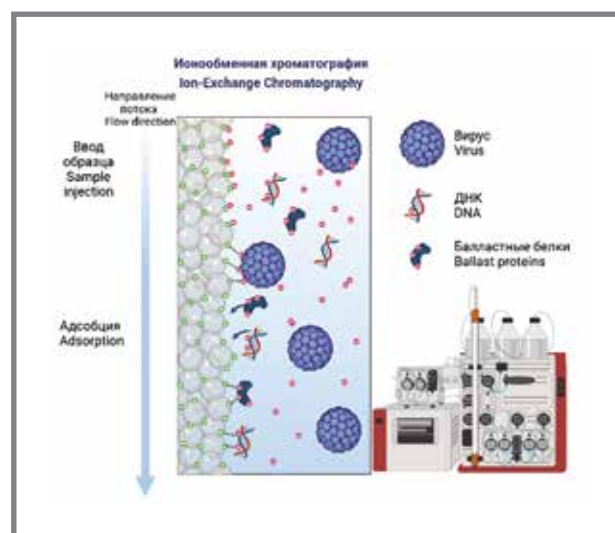


Рисунок 5. Ионообменная хроматография полиовируса (рисунок получен с помощью biorender.com)

Figure 5. Ion-exchange chromatography of poliovirus (courtesy biorender.com)



Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

видимо и разницу в степени извлечения на сорбентах DEAE Sepharose FF и Capto DEAE. Сорбент Capto DEAE имеет большую ионную силу в сравнении с сорбентом DEAE Sepharose FF, поэтому происходит большая адсорбция полиовируса 3 типа и, как следствие, отмечаются самые низкие показатели степени извлечения. Сорбент DEAE Sepharose FF имеет меньшую ионную силу в сравнении с сорбентом Capto DEAE, вследствие чего адсорбция вируса менее выражена, а показатель степени извлечения выше.

Вакцинация по-прежнему остаётся наиболее эффективной и экономичной мерой профилактики инфекционных заболеваний. Однако с появлением новых опасных инфекционных заболеваний разработка, производство, внедрение вакцин против этих заболеваний, выполнение и проведение необходимых профилактических мероприятий могут столкнуться с рядом проблем [24]. 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 [24], например, вакцины против полиомиелита [7]; (2) вакцины, содержащие антигены нескольких возбудителей в одном препарате

и, соответственно, защищающие от вызываемых ими заболеваний [24], например, шестивалентная вакцина Инфанрикс Гекса против дифтерии, коклюша, столбняка, полиомиелита, гемофильной инфекции и гепатита В [25]. Возможность оперативного и одномоментного проведения такими вакцинами профилактических прививок от нескольких инфекционных агентов обеспечивает не только высокий охват населения, но и даёт существенный экономический результат [24,26–29].

Закключение

Применение предложенных нами модификаций очистки концентратов штаммов Сэбина вируса полиомиелита 1, 2 и 3 типов с помощью ионообменной хроматографии позволяют получать инаktivированные вирусные препараты, отвечающие 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). Кроме того, дополнительная очистка препаратов с использованием ионообменной хроматографии позволяет снизить содержание остаточной клеточной ДНК практически до нуля, что делает инаktivированную вакцину против полиомиелита наиболее привлекательной для включения её в состав разных комбинированных вакцин.

Литература

1. Опимах И. Эдвард Дженнер и история вакцинации. Медицинские технологии. Оценка и выбор. 2018. С. 77–81. doi:10.31556/2219-0678.2018.34.4.077-081.
2. Wang X, Hunter A, Mozier N. Host Cell Proteins in Biologicals Development: Identification, Quantitation and Risk Assessment. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009; Vol. 103, No. 3. P. 446–458. doi: 10.1002/bit.22304.
3. Ягшис Г, Линдског Э, Лаки К и др. Биофармацевтическое производство. Разработка, проектирование и внедрение производственных процессов. Издательство Профессия; 2020.
4. Pilely K, Johansen M, Lund R, et al. Monitoring process-related impurities in biologics – host cell protein analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022. N.414. P. 747–758. doi: 10.1007/s00216-021-03648-2.
5. Li M, Qiu Y. A review on current downstream bio-processing technology of vaccine products. *Vaccine*. 2013. N31. P. 1264–1267. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.12.056.
6. Montagnon B. Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line. - In: *Continuous Cell Lines as substrates for biologicals*. Dev. Biol. Stand. 1989. N70. P. 27–47.
7. Piniaeva A, et al. Immunogenicity and safety of inactivated sabin-strain polio vaccine «PoliovacSin»: Clinical trials phase I and II. *Vaccines*. 2021. N9. P. 565. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060565>.
8. Vorovitch M, Grishina K, Volok V, et al. Evervac: phase I/II study of immunogenicity and safety of a new adjuvant-free TBE vaccine cultivated in Vero cell culture. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2020. N16. P. 2123–2130. doi: 10.1080/21645515.2020.1757990.
9. Pato T, Souza M, Mattos D, et al. Purification of yellow fever virus produced in Vero cells for inactivated vaccine manufacture. *Vaccine*. 2019. N37. P. 3214–3220. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.077.
10. Tiwari M, Parida M, Santhosh S, et al. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine*. 2009. N27. P. 2513–2522. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.062.
11. Korpak A, Ivin Y, Piniaeva A, et al. Application of ultrafiltration membranes for purification and concentration of sabin poliovirus type 1. *Zhurnal Mikrobiologii i Epidemiologii i Immunobiologii*. 2021. Vol.98, N2. P. 135–143. doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-94>.
12. Piniaeva A, Korpak A, Ivin Y, et al. Selection of Sorbent for Poliovirus Vaccine Strain Concentrate Purification by Gel Filtration. *Biotechnologiya*. 2021. N37. P. 84–94. doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-6-84-94.
13. Yang H, Zhang L, Galinski M. A probabilistic model for risk assessment of residual host cell DNA in biological products. *Vaccine*. 2010. N28. P. 3308–3311. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.099.
14. Andreani N, Renzi S, Piovani G, et al. Potential neoplastic evolution of Vero cells: in vivo and in vitro characterization. *Cytotechnology*. 2017. N69. P. 741–750. doi: 10.1007/s10616-017-0082-7.
15. Recommendations and guidelines for biological substances used in medicine and other documents. WHO TRS №897, Geneva, 2000.
16. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), 10th ed.; EDQM: Strasbourg, France.
17. Kalbfuss B, Wolff M, Morenweiser R, et al. Purification of cell culture-derived human influenza A virus by size-exclusion and anion-exchange chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007. N96. P. 932–944. doi: 10.1002/bit.21109.
18. Kimia Z, Hosseini S, Taleh S, et al. A novel application of ion exchange chromatography in recombinant hepatitis B vaccine downstream processing: Improving recombinant HBsAg homogeneity by removing associated aggregates. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019. N1113. P. 20–29. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.03.009.
19. INSTRUCTIONS IN 40 300 010. WorkBeads 40 / 100 SEC WorkBeads 40 / 100 SEC WorkBeads 40 / 1000 SEC WorkBeads Macro SEC. 2020. Bio-Works. Sweden.
20. Иванов А. П., Козлов В. Г., Клебеева Т.Д., и др. Система иммуноферментного анализа на основе специфических антител класса (IgY) из яичных желтков для количественного определения D-антигена в инаktivированных полиовирусных вакцинах. *Вопросы вирусологии*. 2014. №59. С. 39–42.
21. Capto S, Capto Q and Capto DEAE Ion exchange resins. Instructions for Use. 2020. Cytiva. Доступно на: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-14017-original>
22. CM Sepharose Fast Flow, DEAE Sepharose Fast Flow, Q Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow Ion Exchange Media. Instructions for Use. 2020. Cytiva. Доступно на: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-13013-original>
23. Thomassen Y, Van Eikenhorst G, Van Der Pol L, et al. Isoelectric point determination of live polioviruses by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection. *Anal Chem*. 2013. N85. P. 6089–6094. doi: 10.1021/ac400968g.
24. Liu B, Cao B, Wang C, et al. Immunogenicity and Safety of Childhood Combination Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Vaccines (Basel)*. 2022. Vol. 10, N3. P. 472. doi: 10.3390/vaccines10030472.
25. Намазова-Баранова Л. С., Харит С. М., Перминова О. А. и др. Безопасность и иммуногенность полностью жидкой шестивалентной вакцины АКДС-ИПВ-Ген-Нib у здоровых детей 1-го года жизни в Российской Федерации. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2019;18(3):28–39. doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-3-28-3926.
26. Бруко Н. И., Попович Л. Д., Миндлина А. Я. и др. Сравнительная оценка предотвращаемого социально-экономического ущерба при различных подходах к профилактике вакциноуправляемых инфекций в рамках Национального календаря профилактических прививок. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2020;19(1):4–13. doi: 10.31631/2073-3046-2020-19-1-4-13.
27. Суетина И. Г., Иллек Я. Ю., Хлебникова Н. В. и др. Проблема своевременности вакцинации детей раннего возраста и пути ее решения. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2019;18(5):85–91. doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-5-85-91.
28. Loiacono M, Pool V, van Aalst R DTPa combination vaccine use and adherence: A retrospective cohort study. *Vaccine*. 2021. Vol. 39, N7. P. 1064–1071. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.01.009
29. Kurosky S, Davis K, Krishnarajah G. Effect of combination vaccines on completion and compliance of childhood vaccinations in the United States. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2017. N13. P. 2494–2502. doi: 10.1080/21645515.2017.1362515

References

1. Opimakh I. Edward Jenner and History of Vaccination. *Medical Technologies. Assessment and Choice*. 2018;77–81. doi:10.31556/2219-0678.2018.34.4.077-081.
2. Wang X, Hunter A, Mozier N. Host Cell Proteins in Biologics Development: Identification, Quantitation and Risk Assessment. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009; 103(3): 446–458. doi: 10.1002/bit.22304.
3. Jagtschies G, Lindsag E, Lacki K, et al. Biopharmaceutical production. Development, design and implementation of production processes. Publishing House Professia; 2020. (In Russ.).
4. Pilely K, Johansen M, Lund R, et al. Monitoring process-related impurities in biologics – host cell protein analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022; 414:747–758. doi: 10.1007/s00216-021-03648-2.
5. Li M, Qiu Y. A review on current downstream bio-processing technology of vaccine products. *Vaccine*. 2013; 31:1264–1267. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.12.056.
6. Montagnon B. Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line. - In: Continuous Cell Lines as substrates for biologicals. *Dev. Biol. Stand.* 1989; 70: 27–47.
7. Piniaeva A, et al. Immunogenicity and safety of inactivated sabin-strain polio vaccine «PoliovacSin»: Clinical trials phase I and II. *Vaccines*. 2021;9:565. https://doi.org/10.3390/vaccines9060565.
8. Vorovitch M, Grishina K, Volok V, et al. Evervac: phase I/II study of immunogenicity and safety of a new adjuvant-free TBE vaccine cultivated in Vero cell culture. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2020; 16: 2123–2130. doi: 10.1080/21645515.2020.1757990.
9. Pato T, Souza M, Mattos D, et al. Purification of yellow fever virus produced in Vero cells for inactivated vaccine manufacture. *Vaccine*. 2019;37:3214–3220. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.077.
10. Tiwari M, Parida M, Santhosh S, et al. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine*. 2009; 27:2513–2522. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.062.
11. Kovpak A, Ivin Y, Piniaeva A, et al. Application of ultrafiltration membranes for purification and concentration of sabin poliovirus type 1. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii*. 2021. 98(2):135–143. doi: https://doi.org/10.36233/0372-9311-94.
12. Piniaeva A, Kovpak A, Ivin Y, et al. Selection of Sorbent for Poliovirus Vaccine Strain Concentrate Purification by Gel Filtration. *Biotechnologiya*. 2021;37:84–94. doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-6-84-94.
13. Yang H, Zhang L, Galinski M. A probabilistic model for risk assessment of residual host cell DNA in biological products. *Vaccine*. 2010;28:3308–3311. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.099.
14. Andreani N, Renzi S, Piovani G, et al. Potential neoplastic evolution of Vero cells: in vivo and in vitro characterization. *Cytotechnology*. 2017; 69:741–750. doi: 10.1007/s10616-017-0082-7.
15. Recommendations and guidelines for the biological substances used in medicine and other documents. WHO TRS N°897, Geneva, 2000.
16. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), 10th ed., EDQM: Strasbourg, France.
17. Kalbfuss B, Wolff M, Morenweiser R, et al. Purification of cell culture-derived human influenza A virus by size-exclusion and anion-exchange chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007; 96:932–944. doi: 10.1002/bit.21109.
18. Kimio Z, Hosseini S, Taleh S, et al. A novel application of ion exchange chromatography in recombinant hepatitis B vaccine downstream processing: Improving recombinant HBsAg homogeneity by removing associated aggregates. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019; 1113:20–29. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.03.009.
19. INSTRUCTIONS IN 40 300 010. WorkBeads 40 / 100 SEC WorkBeads 40 / 1000 SEC WorkBeads 40 / 1000 SEC WorkBeads Macro SEC. 2020. Bio-Works. Sweden.
20. Ivanov AP, Kozlov VG, Klebleva TD, Ivanova OE, Kiktenko AV. An ELISA system based on the specific class Y (IgY) antibodies from egg yolks for the quantitative determination of D-antigen in inactivated poliovirus vaccines. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(6):39–42. (in Russian).
21. 28407452 AG. Capto Q and Capto DEAE Ion exchange resins. Instructions for Use. 2020. Cytiva.
22. 71500964 AH. CM Sepharose Fast Flow, DEAE Sepharose Fast Flow, Q Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow Ion Exchange Media. Instructions for Use. 2020. Cytiva.
23. Thomassen Y, Van Eikenhorst G, Van Der Pol L, et al. Isoelectric point determination of live polioviruses by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection. *Anal Chem*. 2013; 85:6089–6094. doi: 10.1021/acs.400968a.
24. Liu B, Cao B, Wang C, et al. Immunogenicity and Safety of Childhood Combination Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Vaccines (Basel)*. 2022; 10(3):472. doi: 10.3390/vaccines10030472.
25. Namazova-Baranova LS, Kharit SM, Perminova OA et al. Safety and Immunogenicity of Fully Liquid Hexavalent DTap-IPV-HepB-Hib Vaccine in Healthy Infants in Russian Federation. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019;18(3):28–39 (In Russ.). doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-3-28-39.
26. Briko NI, Popovich LD, Mindlin Aya et al. Comparative assessment of preventable socioeconomic damage in different approaches to the prevention of vaccine-controlled infections in the framework of the National vaccination schedule. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020;19(1): 4–13 (In Russ.). doi: 10.31631/2073-3046-2020-19-1-4-13.
27. Suetina IG, Illek YY, Khebnikova NV, et al. The Problem of Timeliness of Young Children Vaccination and Ways to Solve It. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019;18(5): 85–91. (In Russ.). doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-5-85-91.
28. Loiacono M, Pool V, van Aalst R. DTap combination vaccine use and adherence: A retrospective cohort study. *Vaccine*. 2021;39(7):1064–1071. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.01.009.
29. Kurosky S, Davis K, Krishnarajah G. Effect of combination vaccines on completion and compliance of childhood vaccinations in the United States. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2017; 13:2494–2502. doi: 10.1080/21645515.2017.1362515.

Об авторах

- **Анастасия Николаевна Пиняева** – начальник управления разработки и внедрения инновационных и полупромышленных технологий, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. +7 (925) 408-83-07, pinyaeva_an@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0001-5381-2393.
- **Анастасия Александровна Ковпак** – руководитель группы процессов очистки и формулировки готовых лекарственных форм, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. +7 (915) 048-85-55, kovpak_aa@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0003-3200-763X.
- **Юрий Юрьевич Ивин** – заместитель начальника управления разработки и внедрения инновационных и полупромышленных технологий, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. +7 (985) 111-32-89, ivin_yu@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0003-0995-7944.
- **Саглар Хюрмиевна Санджиева** – технолог группы процессов очистки и формулировки готовых лекарственных форм, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. +7 (929) 957-09-96, sandjieva_sh@chumakovs.ru.
- **Анна Андреевна Шишова** – руководитель группы разработки валидации методик, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. +7 (916) 733-61-18, shishova_aa@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0002-5907-0615.
- **Ирина Олеговна Целых** – микробиолог группы разработки и валидации методик, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. +7 (980) 519-22-31, tselih_io@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0002-7530-3925.
- **Владислав Евгеньевич Василенко** – руководитель группы ферментации и культивирования, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. +7 (916) 085-73-43, vasilenko_ve@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0001-7980-0921.
- **Константин Владимирович Каа** – технолог группы ферментации и культивирования, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. +7 (918) 252-41-32, kaa_kv@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0002-8446-1853.
- **Жад Хассан Мажед** – технолог группы ферментации и культивирования, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. +7 (966) 032-56-32, Mazhed_zh@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0002-5259-0984.
- **Юсуф Хаджи-Бекович Халчаев** – начальник цеха по производству полиомиелитных вакцин, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. hapchaev_uh@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0003-1613-5228.
- **Александра Александровна Синюгина** – руководитель направления по качеству и инновационным разработкам, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. sinyugina_aa@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0002-7251-6570.
- **Айдар Айратович Ишмухаметов** – генеральный директор, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова» РАН, Москва. ishmukhametov@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0001-6130-4145.

Поступила: Принята к печати:

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Anastasia N. Piniaeva** – Head of Division of Development and Integration of Innovative and Semi-industrial Technologies, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. +7 (925) 408-83-07, pinyaeva_an@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0001-5381-2393.
- **Anastasia A. Kovpak** – Head of team of purification processes and finished dosage forms formulation, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. +7 (915) 048-85-55, kovpak_aa@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0003-3200-763X.
- **Yury Yu. Ivin** – Deputy Head of Division of Development and Integration of Innovative and Semi-industrial Technologies, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. +7 (985) 111-32-89, ivin_yu@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0003-0995-7944.
- **Saglara H. Sandzhieva** – Technologist of team of purification processes and finished dosage forms formulation, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. +7 (929) 957-09-96, sandjieva_sh@chumakovs.ru.
- **Anna A. Shishova** – Head of Analytical Method Development and Validation Team, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. +7 (916) 733-61-18, shishova_aa@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0002-5907-0615.
- **Irina O. Tselikh** – Microbiologist of Analytical Method Development and Validation Team, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. +7 (980) 519-22-31, tselih_io@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0002-7530-3925.
- **Vladislav E. Vasilenko** – Head of fermentation and cultivation team, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. +7 (916) 085-73-43, vasilenko_ve@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0001-7980-0921.
- **Konstantin V. Kaa** – Technologist of fermentation and cultivation team, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. +7 (918) 252-41-32, kaa_kv@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0002-8446-1853.
- **Zhad H. Mazhed** – Technologist of fermentation and cultivation team, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. +7 (966) 032-56-32, Mazhed_zh@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0002-5259-0984.
- **Yusuf H. Hapchaev** – Head of the Polio Vaccine Production Department, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. hapchaev_uh@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0003-1613-5228.
- **Alexandra A. Siniugina** – Head of the Quality and Innovation Development Department, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. sinyugina_aa@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0002-7251-6570.
- **Aydar A. Ishmukhametov** – Director general, Federal State Autonomous Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products» of Russian Academy of Sciences, Moscow. ishmukhametov@chumakovs.ru. https://orcid.org/0000-0001-6130-4145.

Received: Accepted:

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.