

Экспериментальные подходы к разработке инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина

А.П. Иванов¹ (ivanov_ap@chumakovs.su), Т.Д. Клеблеева¹, О.Е. Иванова²,
Е.Г. Ипатова¹, Л.В. Гмыль¹, А.А. Ишмухаметов¹

¹ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Москва (sue_polio@chumakovs.ru)

²ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Москва (institute@poliomyelit.ru)

Резюме

Представлены результаты разработки экспериментальных серий инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина (С-ИПВ) с помощью общепринятых современных технологий. Сравнительный анализ иммуногенности экспериментальной С-ИПВ и коммерческой ИПВ, приготовленной из «диких» штаммов полиовируса (Имовакс Полио, Санофи Пастер С.А., Франция), на нескольких моделях лабораторных животных показал их идентичность в отношении штаммов Сэбина и «диких» штаммов. Разработан и защищен патентом оригинальный метод (ИФА с использованием специфических куриных антител из яичного желтка класса Y – IgY) количественного определения D-антигена для составления формуляции вакцины, отработаны методы контроля вакцины по всем параметрам согласно требованиям ВОЗ и Европейской фармакопеи. Таким образом, на экспериментальном уровне показано, что С-ИПВ не уступает по основным характеристикам коммерческой ИПВ, приготовленной из «диких» штаммов полиовируса.

Ключевые слова: полиовирусные вакцины, С-ИПВ, D-антиген, иммуногенность

Experimental Approaches to the Development of Inactivated Poliovirus Vaccine Based on Sabin Strains

A.P. Ivanov¹ (ivanov_ap@chumakovs.su), T.D. Klebleeva¹, O.E. Ivanova², E.G. Ipatova¹, L.V. Gmyl¹, A.A. Ishmuhametov¹

¹Enterprise of viral and bacterial Preparations of Chumakov Institute of poliomyelitis and viral encephalitides, Moscow (sue_polio@chumakovs.ru)

²Chumakov Institute of poliomyelitis and viral encephalitides, Moscow (institute@poliomyelit.ru)

Abstract

The results of development of experimental series of inactivated poliovirus vaccine based on Sabin strains (s-IPV) using conventional modern techniques are presented. Comparative analysis of immunogenicity of the experimental s-IPV and commercial IPV prepared from «wild» poliovirus strains (Imovax, Sanofi Pasteur S.A., France) using several models of laboratory animals showed their identity regarding Sabin and «wild» strains. Original method (an ELISA using specific chicken egg yolk antibodies of class Y-IgY) for quantitative determination of D-antigen in elaboration of vaccine formulation has been developed and protected by patent; conventional control methods in accordance with the WHO and European Pharmacopoeia requirements have been adopted. Finally, at experimental level it was shown that basic characteristics of the s-IPV are comparable with those of commercial IPV prepared from «wild» poliovirus strains.

Key words: poliovirus vaccines, s-IPV, D-antigen, immunogenicity

Введение

Заключительный этап программы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по глобальному искоренению полиомиелита предусматривает:

- прекращение иммунизации с помощью оральной полиовирусной вакцины из аттенуированных штаммов Сэбина (ОПВ);
- разработку более безопасных процессов изготовления инактивированных полиовирусных вакцин (ИПВ) и приемлемых стратегий их использования [1].

Известные недостатки ОПВ (в течение многих десятилетий «вакцины выбора» для достижения целей

программы ВОЗ) – случаи вакциноассоциированного полиомиелита, вероятность формирования вакцинородственных штаммов с повышенной нейровирулентностью и способностью к трансмиссии – делают неприемлемым ее использование для рутинной иммунизации на заключительном этапе выполнения программы. Новый Стратегический план ВОЗ по искоренению полиомиелита предполагает повсеместное внедрение первоначально хотя бы одной дозы ИПВ с последующим использованием ИПВ в качестве основного средства профилактики полиомиелита [1].

В России ИПВ не производится, импортируемые ИПВ из «диких» штаммов дороги (безопасное про-

изготовление вакцины требует соблюдения условий контейнента, что влияет на стоимость конечного продукта). Производство ИПВ на основе штаммов Сэбина безопаснее и значительно дешевле. В данном сообщении приведены результаты разработки первой российской С-ИПВ на современном технологическом уровне. ИПВ из штаммов Сэбина может стать одной из перспективных вакцин для использования в рамках российского Национального календаря профилактических прививок.

Материалы и методы

Вирусы. Посевные вирусы – аттенуированные штаммы Сэбина вируса полиомиелита типа 1, 2 и 3: тип 1 – LSc 2 ab, тип 2 – P712 Ch 2 ab, тип 3 – Leon 12a₁b, используемые в производстве ОПВ на ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова». Вирусы выращивали посредством роллерного культивирования (адекватный способ для экспериментального уровня) по стандартной методике [2].

Культура клеток: перевиваемая культура клеток Vero получена из рабочего банка клеток (РБК-Vero) ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова». Экспериментальные серии С-ИПВ готовили по общепринятой методике, представленной, в частности, У.Е. Vakker с соавт. [3], но с собственными модификациями.

Краткое описание этапов разработки вакцины: вирусодержащая культуральная жидкость (каждого из 3-х типов вируса полиомиелита), титр вируса ~ 9 lg ТЦД50/мл – осветление центрифугированием при ~ 10 000 g – стерилизующая фильтрация с помощью фильтров типа SARTOBRAN 300 – концентрирование (~ 150-кратное) на лабораторном концентрате типа VIVAFLOW 200 – гель-фильтрация концентрата (Sephacryl™ 6 Fast Flow) – ионообменная хроматография элюата гель-фильтрации (DEAE Sepharose Fast Flow) – инактивация формалином (0,025%) в течение 12 дней при +37 °С – контроль на наличие остаточной инфекционности – добавление ингибитора формалина (сульфит натрия) и стабилизатора (эдетат натрия) – определение содержания D-антигена в препаратах моновакцин 1 – 3 типов – сведение 3-х типов в определенной формуляции готовой формы вакцины – хранение при +4 °С – контроль вакцины (определение иммуногенности и т.д.).

Содержание D-антигена определяли по собственной методике на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием в качестве иммуносорбента специфических антител класса Y (IgY) против «диких» штаммов полиовируса типов 1 – 3 (тип 1 – Mahoney, тип 2 – MEF-1, тип 3 – Saukett), аффинно очищенных из яичных желтков иммунизированных куриц, и вторичных антител в виде сывороток кроликов, иммунизированных «дикими» штаммами полиовируса [4, 5]. Количественное определение D-антигена в экспериментальных сериях С-ИПВ проводили параллельно с международным стандартом

D-антигена (IS 12/104), полученным из NIBSC (Великобритания) [6].

Иммуногенность (параллельно с коммерческой ИПВ, приготовленной из «диких» штаммов полиовируса, Имовакс Полио, Санофи Пастер С.А., Франция) проверяли на мышах CD-1, зеленых мартышках и морских свинках по общепринятым методикам, принятым для соответствующих модельных животных [7 – 9].

Определение вируснейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных животных проводили в реакции нейтрализации (НТ) согласно методике ВОЗ [10]. Параллельно НТ (функциональный тест, «золотой стандарт» определения функциональной аффинности антител, то есть авидности) выявляли специфические антитела в нефункциональных тестах – специально разработанных 2-х вариантах ИФА: 1-й – симулирующий НТ, 2-й – для определения вирусспецифических IgG [11].

Остальные основные показатели (концентрация общего белка, остаточная клеточная ДНК, бактериальные эндотоксины, реактогенность, остаточный формальдегид и т.д.) определяли согласно рекомендациям Европейской Фармакопеи и ВОЗ [9, 12].

Результаты и обсуждение

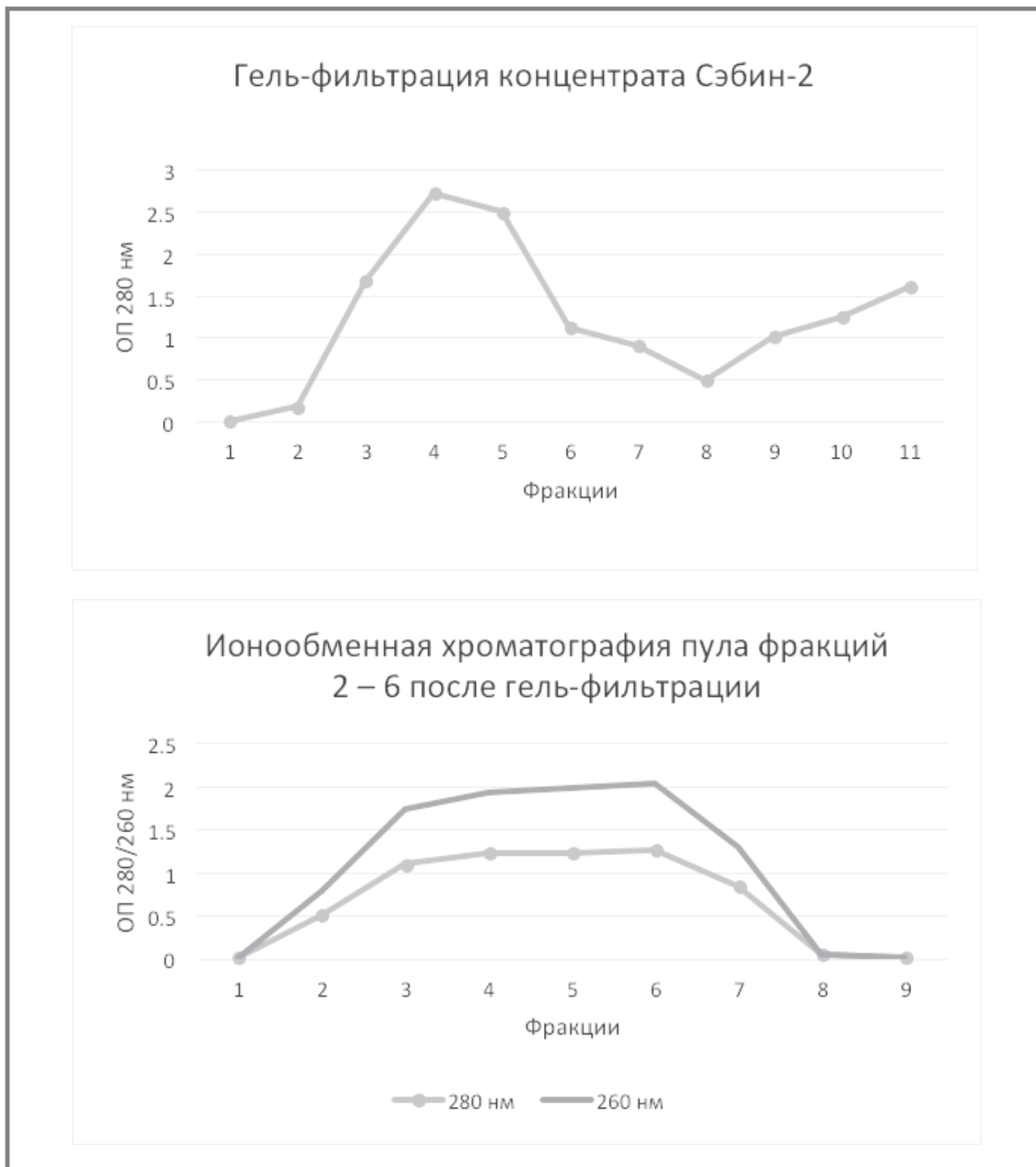
Очистка вируса. Используемые методы концентрирования и очистки вируса позволили получить экспериментальные серии С-ИПВ, отвечающие требованиям ВОЗ и Европейской Фармакопеи [9, 10]. На рисунке 1 представлены результаты очистки вируса Сэбин-2 из концентрата вирусодержащей культуральной жидкости. Первый этап – гель-фильтрация на колонке с Sepharose™ 6 Fast Flow, позволившая выделить вирус в 1-м пике («свободный объем», фракции 2 – 6, как показано на рис. 1), и второй этап – дальнейшая очистка пула 1-го пика с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE Sepharose Fast Flow – фракции 2 – 7 с отношением показателей оптической плотности 260/280 каждой фракции более 1,5 [3] объединены в пул для последующей инактивации формальдегидом и получения препарата моновакцины.

На рисунке 2 представлены результаты количественного определения D-антигена в моно-препаратах 3-х типов С-ИПВ. Количество D-антигена на 1 мл (D-АГ/мл) определяли по отношению к известному (регламентированному) количеству D-антигена 3-х инаktivированных типов «дикого» полиовируса (Международный стандарт IS 12/104) при параллельном титровании в собственной системе ИФА. По данным параллельного титрования, представленным на рисунке 2, С-ИПВ-1 содержит 2216 D-АГ/мл (IS 12/104, тип 1 – 277 D-АГ/мл); С-ИПВ-2 содержит 520 D-АГ/мл (IS 12/104, тип 2 – 65 D-АГ/мл); С-ИПВ-3 – 496 D-АГ/мл (IS 12/104, тип 3 – 248 D-АГ/мл).

Формуляция сведенной С-ИПВ (готовой формы вакцины). В результате серий экспериментов

Рисунок 1.

Очистка вируса Сэбин-2 из 150-кратного концентрата вирусосодержащей жидкости: гель-фильтрация (колонка с Sepharose™ 6 Fast Flow) с последующей ионообменной хроматографией (DEAE Sepharose Fast Flow)



по иммунизации лабораторных животных (мыши CD-1 и морские свинки) моно-препаратами С-ИПВ различных типов с отличающимся содержанием D-антигена установлена оптимальная формуляция готовой формы С-ИПВ (содержание D-антигена каждого типа в дозе 0,5 мл): С-ИПВ-1 содержит 2216 D-АГ/мл (IS 12/104, тип 1 – 277 D-АГ/мл); С-ИПВ-2 содержит 520 D-АГ/мл (IS 12/104, тип 2 – 65 D-АГ/мл); С-ИПВ-3 – 496 D-АГ/мл (IS 12/104, тип 3 – 248 D-АГ/мл).

Данная формуляция С-ИПВ укладывается в рамки опубликованных формуляций [8, 10, 3].

В таблице 1 представлены результаты оценки иммуногенности экспериментальных серий С-ИПВ в указанной формуляции и коммерческой ИПВ (официальная формуляция на дозу 0,5 мл: 1 тип – 40; 2 тип – 8; 3 тип – 32 единицы D-антигена) на моделях мышей CD-1 и зеленых мартышек (титры специфических IgG и вируснейтрализующих антител по отношению к штаммам Сэбина). В таблице 2

Рисунок 2.

Определение содержания D-антигена в моновакцинных препаратах С-ИПВ 3-х типов и Международном стандарте с установленным содержанием D-антигена трех «диких» типов полиовируса (IS 12/104)

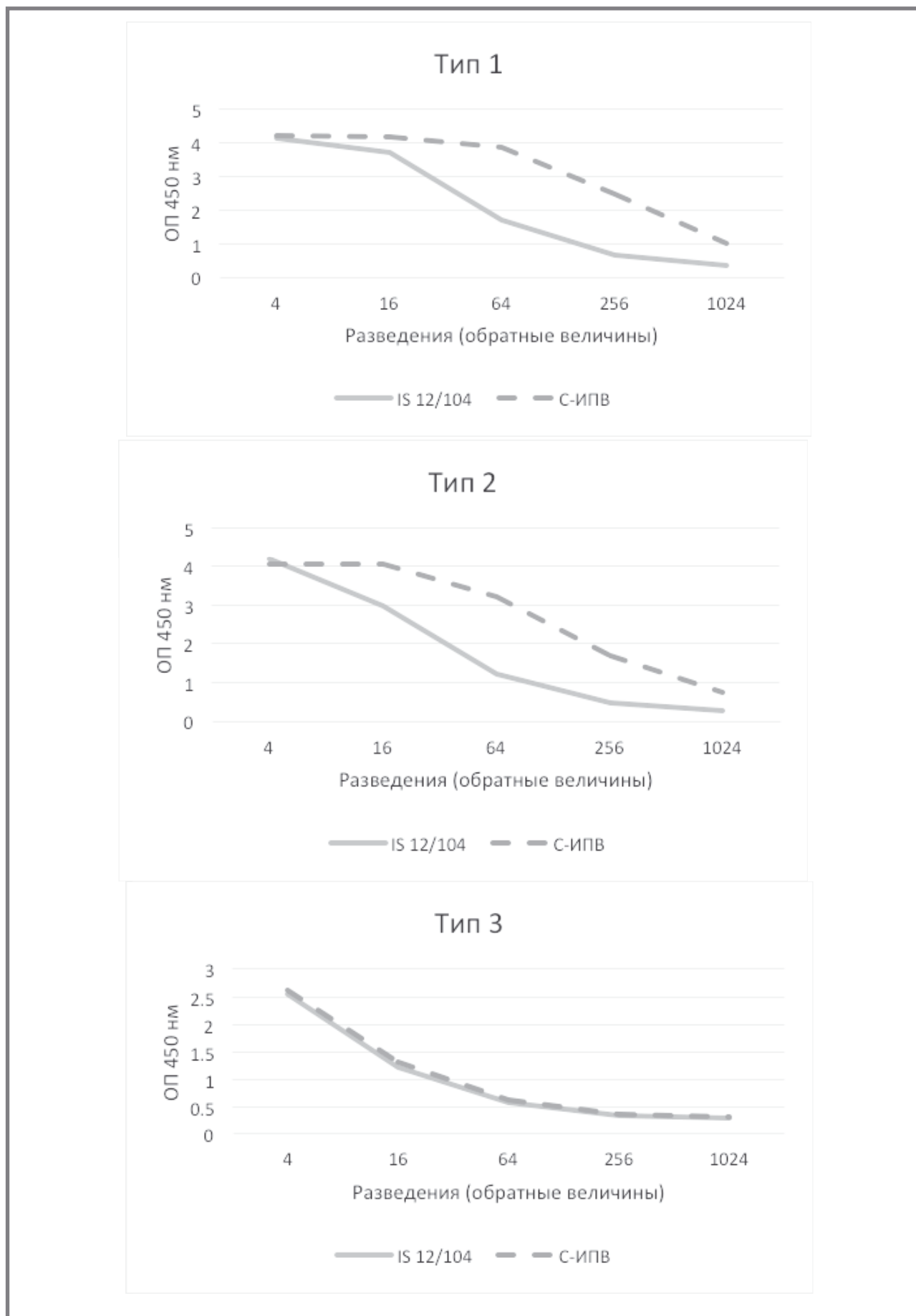


Таблица 1.

Результаты оценки иммуногенности экспериментальной серии С-ИПВ и коммерческой ИПВ из «диких» штаммов на моделях мышей CD-1 и зелёных мартышек (среднее значение титров антител по отношению к штаммам Сэбина)

Тип вируса полиомиелита	Мыши CD-1		Зелёные мартышки (<i>C. aethiops</i>)	
	С-ИПВ	Коммерческая ИПВ	С-ИПВ	Коммерческая ИПВ
	НТ/ИФА*	НТ/ИФА*	НТ**	НТ**
1	1:488/1:17920	1:537/1:25600	Тип 1 - 1:468	1:526
2	1:88/1:11520	1:80/1:12800	Тип 2 - 1:314	1:712
3	1:68/1:11520	1:86/1:12800	Тип 3 - 1:126	1:389

Примечание: *НТ/ИФА – средние титры нейтрализующих антител/средние титры вирусспецифических IgG в ИФА;
**средние титры нейтрализующих антител.

Таблица 2.

Результаты оценки иммуногенности экспериментальной серии С-ИПВ и коммерческой ИПВ из «диких» штаммов на модели морских свинок по индексу иммуногенности (ИИ) по отношению к штаммам Сэбина и «диким» штаммам

Тип вируса полиомиелита	С-ИПВ	Коммерческая ИПВ
1	2,92*/3,008**	2,13*/2,979**
2	2,74/2,878	2,28/2,95
3	2,9/2,36	2,66/2,9

Примечание: *ИИ по отношению к штаммам Сэбина;
**ИИ по отношению к «диким» штаммам.

показаны результаты оценки иммуногенности экспериментальной серии С-ИПВ в указанной формуляции и коммерческой ИПВ на модели морских свинок – индексы иммуногенности (ИИ) по отношению к штаммам Сэбина и «диким» штаммам полиовируса. Как следует из данных таблиц 1 и 2, иммуногенность С-ИПВ сопоставима с иммуногенностью коммерческой ИПВ по отношению к штаммам Сэбина и «диким» штаммам – во всех случаях индекс иммуногенности был более 2.

Основные нефункциональные показатели экспериментальных серий С-ИПВ соответство-

вали требованиям ВОЗ и Европейской фармакопеи: общий белок (по Лоури) содержится в количестве < 20 мкг/мл, остаточная клеточная ДНК – < 20 нг/мл, остаточный формальдегид – < 200 мкг/мл, бактериальные эндотоксины (ЛАЛ-тест) – < 10 МЕ/мл.

Таким образом, данная технология изготовления С-ИПВ (на экспериментальном уровне) обеспечивает качество вакцины, отвечающие требованиям ВОЗ и Европейской Фармакопеи как по основным физическим, так и по функциональным (иммуногенность) показателям. ■

Литература

1. Polio Eradication and Endgame Strategic Plan (2013 – 2018). Доступно на: <http://www.polioeradication.org/ResourceLibrary/Strategyandwork.aspx>.
2. Jiang S.D., Pye D., Cox J.C. Inactivation of poliovirus with γ -propiolactone. *Journal of Biological Standardization*. 1986;14: 103 – 109.
3. Wilfried A.M., Bakker Y., Thomassen E., van't Oever A.G., Westdijk J., van Oijnet M.G.C.T. et al. Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. *Vaccine*. 2011; 29: 7188 – 7196.
4. Иванов А.П., Козлов В.Г., Иванова О.Е., Киктенко А.В. Способ количественного определения D-антигена полиовирусов 1 – 3 типов. Патент на изобретение № 2535058 от 14 декабря 2012 г.
5. Иванов А.П., Козлов В.Г., Клеблева Т.Д., Иванова О.Е., Киктенко А.В. Система иммуноферментного анализа на основе специфических антител класса Y (IgY) из яичных желтков для количественного определения D-антигена в инактивированных полиовирусных вакцинах. *Вопр. вирусол.* 2014; 59 (6): 39 – 42.
6. Expert committee on biological standardization, Geneva, 21 to 25 October 2013.
7. Ivanov A.P., Dragunsky E.M., Chumakov K.M.. 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances systemic and mucosal immune responses to inactivated poliovirus vaccine in mice. *Journal of Infectious Diseases*. 2006; 193: 598 – 600.
8. Simizu B., Abe S., Yamamoto H., Tano Y., Ota Y., Miyazawa M. et al. Development of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains. *Biologicals*. 2006; 34 (2): 151 – 154.
9. European Pharmacopoeia 7.0, 2010, 2.7.20: 225.
10. World Health Organization (WHO). Manual for the virological investigation of polio [WHO/EPI/GEN97.01]. Geneva: WHO; 1997.
11. Ivanov A.P., Dragunsky E.M., Ivanova O.E., Rezapkin G.V., Potapova S.G., Chumakov K.M. Poliovirus binding-inhibition ELISA for evaluation of immune response to oral poliovirus vaccine. *Hum. Vaccines*, 2005; 1: 102 – 105.
12. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccine (inactivated). Expert committee on biological standardization. Geneva, 13 to 17 October 2014.

References

1. Polio Eradication and Endgame Strategic Plan (2013 – 2018). Available at: <http://www.polioeradication.org/Resourcelibrary/Strategyandwork.aspx>.
2. Jiang S.D., Pye D., Cox J.C. Inactivation of poliovirus with γ -propiolactone. *Journal of Biological Standardization*. 1986;14: 103 – 109.
3. Wilfried A.M., Bakker Yv., Thomassen E., van't Oever A.G., Westdijk J., van Oijenet M.G.C.T. et al. Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. *Vaccine*. 2011; 29: 7188 – 7196.
4. Ivanov A.P., Kozlov V.G., Ivanova O.E., Kiktenko A.V. A method of quantitative determination of D-antigen of poliovirus types 1 – 3. Russian Patent Number 2535058, 14 December 2012 (In Russian).
5. Ivanov A.P., Kozlov V.G., Klebleeva T.D., Ivanova O.E., Kiktenko A.V. – The ELISA system based on specific class Y (IgY) antibodies from egg yolks for the quantitative determination of D-antigen in inactivated poliovirus vaccines. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2014; 59 (6): 39 – 42 (in Russian).
6. Expert committee on biological standardization, Geneva, 21 to 25 October 2013.
7. Ivanov A.P., Dragunsky E.M., Chumakov K.M.. 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances systemic and mucosal immune responses to inactivated poliovirus vaccine in mice. *Journal of Infectious Diseases*. 2006; 193: 598 – 600.
8. Simizu B., Abe S., Yamamoto H., Tano Y., Ota Y., Miyazawa M. et al. Development of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains. *Biologicals*. 2006; 34 (2): 151 – 154.
9. European Pharmacopoeia 7.0, 2010, 2.7.20: 225.
10. World Health Organization (WHO). Manual for the virological investigation of polio [WHO/EPI/GEN97.01]. Geneva: WHO; 1997.
11. Ivanov A.P., Dragunsky E.M., Ivanova O.E., Rezapkin G.V., Potapova S.G., Chumakov K.M. Poliovirus binding-inhibition ELISA for evaluation of immune response to oral poliovirus vaccine. *Hum. Vaccines*, 2005; 1: 102 – 105.
12. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccine (inactivated). Expert committee on biological standardization. Geneva, 13 to 17 October 2014.

Современные менингококковые вакцины: сильные и слабые стороны, ближайшие перспективы

Н.Н. Костюкова (nathakos@mail.ru), В.А. Бехало (bekhalo@gamaleya.org)
 ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

Резюме

В обзоре рассмотрены менингококковые вакцины, как широко применяющиеся с 70-х – 80-х годов прошлого столетия, так и недавно созданные, эффективность которых еще не вполне ясна. Обсуждены достоинства и недостатки полисахаридных и гликопротеиновых вакцин против менингококков серогрупп А, С, Y, W-135, а также белковых вакцин против серогруппы В – пузырьковых и генно-инженерных, созданных на основе обратной вакцинологии. Описываются возможные варианты состава будущих вакцин. Коротко представлены данные о применении менингококковых вакцин в России. Среди ближайших задач наиболее значимыми является изучение длительности и напряженности защиты после иммунизации конъюгированными вакцинами, создание и испытание вакцины против серогруппы X, дальнейшее изучение и совершенствование вакцин против серогруппы B, а также разработка единого препарата, защищающего от всех антигенных вариантов *Neisseria meningitidis*.

Ключевые слова: менингококковые вакцины, полисахаридные вакцины, конъюгированные вакцины, генно-инженерные вакцины, обратная вакцинология

Current Meningococcal Vaccines: Advantages and Disadvantages and New Challenges

N.N. Kostyukova (nathakos@mail.ru), V.A. Bekhalo (bekhalo@gamaleya.org)

The Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

The article reviews and analyses the vaccines against invasive meningococcal disease, widely used in practice since 70s–80s of the last century, as well as newly developed ones, the efficacy of which is not completely clear yet. The advantages and disadvantages of polysaccharide and glycoprotein vaccines against meningococci of serogroups A, C, Y, W135 and of protein «vesicle» and genetic-engineering vaccines based on «reverse vaccinology» against serogroup B are discussed. Some options for composition of future vaccines under development are presented. Briefly the meningococcal vaccines used in Russia are described. Among the most important immediate tasks discussed are: the study of the duration and intensity of protection after immunization with conjugate vaccines; the development and subsequent trials of a vaccine against serogroup X; further study and improvement of vaccines against serogroup B, as well as the creation of a single vaccine product that protects against all antigenic variants of *Neisseria meningitidis*.

Key words: the meningococcal vaccines, the polysaccharide vaccines, the conjugated vaccines, the vesicle vaccines, the genetic-engineering vaccines, reverse vaccinology

Введение

В настоящее время наиболее эффективным способом борьбы с менингококковой инфекцией (МИ),

как большинством инфекций с воздушно-капельным механизмом передачи, является иммунопрофилактика. Менингококк – *Neisseria meningitidis* –