

УДК 606:615.371

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-389-399>

Научная статья | Scientific article



Изучение вакцины против клещевого энцефалита

О.В. Стронин , А.А. Епанчинцев, А.А. Колтунов

Научно-производственное объединение «Вирион», филиал Акционерного общества «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», ул. Ивановского, д. 8, Томск, 634050, Российская Федерация

 Стронин Олег Владимирович; o.v.stronin@microgen.ru

Резюме

Актуальность. Клещевой энцефалит — один из наиболее актуальных для здоровья населения России антропоозооноз, контроль над которым требует широкого охвата вакцинацией. Масштабная вакцинация невозможна без разработки новых вакцин, например с применением перевиваемой линии клеток Vero, обладающих улучшенным профилем безопасности и эффективности.

Цель. Расширенное изучение ключевых показателей качества новой вакцины «ВероКСЭН» против клещевого энцефалита, полученной с использованием перевиваемой линии клеток Vero.

Материалы и методы. В технологии создания вакцины реализованы современные подходы: накопление производственного штамма вируса клещевого энцефалита № 205 (дальневосточный субтип) в клетках перевиваемой линии Vero; использование для заключительной тонкой очистки вирусного антигена эксклюзионной хроматографии на полимерных сорбентах; введение дополнительных методов контроля. Вакцину «ВероКСЭН» получали способом, описанным в патенте на изобретение № 2678431. Контроль готового продукта проводили в соответствии с методиками, описанными в Государственной фармакопее Российской Федерации. Для лабораторного изучения вакцины и полупродуктов на мышах линии Balb/c были разработаны и внедрены оригинальные новые методы контроля, а также применялись: электрофорез в полиакриламидном геле, иммуноферментный анализ, иммуноблот с суммарными антителами против вируса клещевого энцефалита и моноклональными антителами против гликопротеина Е, метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, высокоскоростная жидкостная хроматография. При расширенном лабораторном исследовании протективной активности использовали тест-штаммы субтипов «Абсеттаров» (западный), «Софьин» (дальневосточный) и «Корзухин» (сибирский). Оценку инфекционной активности вируса клещевого энцефалита проводили при помощи фармакопейного метода титрования на беспородных мышах. Результаты исследований оценивали при помощи статистических методов анализа с вычислением среднего арифметического и среднеквадратичного отклонения.

Результаты. Изучены ключевые показатели качества новой вакцины против клещевого энцефалита «ВероКСЭН» и ее полупродуктов. Показано, что выбранный режим инаktivации снижает инфекционную активность вирусного сбора до недетектируемого уровня через 24 ч, при этом антигенная активность сохраняется на уровне около 100% от исходного значения. Этапы тонкой очистки, а также разработанные оригинальные методики и технологии позволили получить целновирионную фракцию с чистотой до 98,2% и удалить технологические примеси (ДНК клеток-продуцентов, бычий сывороточный альбумин, формальдегид, бактериальные эндотоксины) до уровней, соответствующих нормативным требованиям. Изучение стабильности вакцины на сроке хранения до 36 мес. подтвердило ее соответствие нормативным показателям.

Выводы. Новая вакцина обладает высокой специфической активностью в отношении вируса клещевого энцефалита для штаммов «Абсеттаров», «Софьин» и «Корзухин»: минимальная иммунизирующая доза (МИД₅₀) составила 0,007, 0,00125 и 0,00093 мл соответственно.

© О.В. Стронин, А.А. Епанчинцев, А.А. Колтунов, 2023

Ключевые слова: клещевой энцефалит; вакцина; Vero; ВероКСЭН; разработка вакцины; исследование

Для цитирования: Стронин О.В., Епанчинцев А.А., Колтунов А.А. Изучение вакцины против клещевого энцефалита. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):389–399. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-389-399>

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Study of a tick-borne encephalitis vaccine

Oleg V. Stronin ✉, Anton A. Epanchintsev, Aleksandr A. Koltunov

*Virion, Branch of Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines,
8, Ivanovsky St., Tomsk 634050, Russian Federation*

✉ Oleg V. Stronin; o.v.stronin@microgen.ru

Abstract

Scientific relevance. Tick-borne encephalitis is one of the most significant anthroponozoonoses for public health in the Russian Federation. Wide vaccination coverage is required to control this zoonotic infection. However, large-scale immunisation is not feasible without developing novel vaccines with improved safety and efficacy profiles, such as vaccines based on the continuous Vero cell line.

Aim. This extended study aimed to investigate the key quality attributes of VeroKSEN, a new tick-borne encephalitis vaccine that was obtained using Vero cells.

Materials and methods. The authors implemented current approaches to vaccine development, including propagation of tick-borne encephalitis strain 205 (Far Eastern subtype) in Vero cells, fine purification of the viral antigen by size-exclusion chromatography on polymeric resins, and introduction of additional quality control methods. For VeroKSEN production, the authors used the method protected by utility patent No. 2678431. Quality control of the finished product was performed according to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The laboratory study of the vaccine and its intermediates in Balb/c mice used novel control methods developed by the authors. Additional methods included polyacrylamide gel electrophoresis, enzyme immunoassay, immunoblotting with total antibodies to tick-borne encephalitis virus and monoclonal antibodies to glycoprotein E, reverse transcription–polymerase chain reaction, and high-performance liquid chromatography. The extended potency study used test strains of different subtypes, including Absettarov (Western), Sofjin (Far Eastern), and Korzukhin (Siberian). The authors studied the infectious activity of tick-borne encephalitis virus in outbred mice using the pharmacopoeial titration method. Statistical analysis of the study results involved calculating the arithmetic mean and the root-mean-square deviation.

Results. The authors studied the key quality attributes of VeroKSEN and its intermediates. Selected inactivation conditions reduced the infectious activity of the viral harvest to an undetectable level within 24 h, while its antigenic activity remained approximately 100% of the baseline. The fine purification stages and the methods and techniques developed by the authors provided a whole-virion fraction with a purity of up to 98.2% and removed process-related impurities (residual host-cell DNA, bovine serum albumin, formaldehyde, and bacterial endotoxins) to the levels required by national legislation. The stability study demonstrated that the vaccine met the requirements for up to 36 months.

Conclusions. The study showed the high potency of the new vaccine in terms of protection against the Western, Siberian, and Far Eastern subtypes of tick-borne encephalitis, with minimum immunising doses (MID_{50}) of 0.007, 0.00125, and 0.00093 mL, respectively.

Key words: tick-borne encephalitis; vaccine; Vero; VeroKSEN; vaccine development; study

For citation: Stronin O.V., Epanchintsev A.A., Koltunov A.A. Study of a tick-borne encephalitis vaccine. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3-1):389–399. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-389-399>

Funding. The work was performed without external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) — трансмиссивный природно-очаговый антропоозооз. Заражение человека возбудителем — вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) из семейства *Flaviviridae*, чаще всего происходит во время присасывания переносчика (клещи рода *Ixodes*). Эндемичные по КЭ регионы охватывают широкий пояс хвойных и смешанных лесов умеренной климатической зон Евразии от Западной Европы [1] до Дальнего Востока [2, 3]. В Российской Федерации КЭ — одно из значимых природно-очаговых заболеваний, так как именно на территории России циркулируют наиболее вирулентные штаммы вируса. Ежегодно сотни тысяч человек обращаются в медицинские учреждения по поводу присасывания клеща, тысячи — заболевают, а для сотен из них заболевание имеет тяжелые исходы — инвалидизацию или смерть [4].

Наиболее эффективный метод специфической профилактики КЭ — вакцинация, которая в десятки раз снижает вероятность заболевания и предотвращает развитие тяжелых форм и осложнений. В настоящее время в России зарегистрированы¹ четыре вакцины третьего поколения:

- ФСМЕ-ИММУН® (Вакцина клещевого энцефалита культуральная инактивированная очищенная сорбированная), Pfizer, Inc. (США) и Baxter, AG (Австрия);
- Энцевир® (Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная), АО «НПО «Микроген» (Россия);
- Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая (ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института»² полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН);
- Клещ-Э-Вак (Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная)³.

Производство перечисленных препаратов основано на сходных технологиях. Это сорбированные цельновирионные очищенные инактивированные вакцины. Культивирование ВКЭ ведется на клетках куриных эмбрионов. Различия в основном касаются производственного штамма, методов очистки и стабилизации препарата [5]. Полученные таким образом препараты имеют длительную историю успешного применения, однако к настоящему времени выявились недостатки использования первичных культур клеток:

- повышенный риск контаминации культуры латентными инфекционными агентами (микоплазмы и вирусы);
- повышенный риск контаминации иными примесями (антибиотики и прочие вещества, применяемые на птицефабриках);
- генетическая гетерогенность исходного биоматериала и, как следствие, низкая стандартизация репродукции вируса, нестабильность содержания балластных веществ в культуральной жидкости;
- нестабильное качество эмбрионов в зависимости от сезона, корма, периодов вакцинации, эпизоотий;
- повышенный риск развития аллергических реакций на примеси белков куриных эмбрионов;
- низкая технологичность производства, значительные трудности масштабирования технологии.

В этой связи становятся очевидными преимущества использования перевиваемых клеточных линий (взамен первично трипсионизированных клеток куриных эмбрионов). Их применение для производства вакцины КЭ соответствует общемировым тенденциям совершенствования технологий вакцин, направленных на повышение безопасности, эффективности и качества стандартизации. Линии перевиваемых клеток Vero и MDCK успешно используются для накопления вирусов при промышленном производстве вакцин

¹ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

² С 2021 г. ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

³ Производство ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН».

против полиомиелита [6], бешенства, японского энцефалита, герпеса, гриппа [5]. Ранее технологию производства вакцины клещевого энцефалита с использованием клеток Vero разработали в ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) и успешно провели I и II фазы клинических исследований [7]. В АО «НПО «Микроген» была разработана технология вакцины «ВероКСЭН» против клещевого энцефалита, на перевиваемых клетках Vero (в качестве субстрата накопления).

Цель работы — расширенное изучение ключевых показателей качества новой вакцины «ВероКСЭН» против клещевого энцефалита, полученной с использованием перевиваемой линии клеток Vero.

Материалы и методы

В качестве производственного использовали штамм ВКЭ № 205 (дальневосточный субтип), полученный из коллекции Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Минздрава СССР в 1978 г. и применяемый в течение длительного времени для производства зарегистрированной вакцины «ЭнцеВир». Главный и рабочий посевные материалы были аттестованы в соответствии с требованиями национального законодательства⁴.

Для культивирования производственного штамма использовали аттестованные главный и рабочий банки клеток Vero, происходящих из почек зеленой мартышки (*Cercopithecus*

aethiops). Линия получена из коллекции ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (далее — ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Накопление вирусного антигена осуществляли способом стационарного культивирования зараженного клеточного монослоя в клеточных фабриках (164327, Thermo Fisher Scientific) в среде MEM Eagle (ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) с добавлением фетальной сыворотки крупного рогатого скота (SV30160.031R, HyClone). Вирусный сбор инаktivировали регламентированным методом с помощью формалина⁵.

Метод глубинной фильтрации позволил провести грубую очистку вирусного антигена. Концентрирование раствора проводили при помощи ультрадиализации в тангенциальном потоке, используя систему SartoJet (Sartorius) и кассеты (Sartorius) с порогом отсечения 100 кДа; тонкую очистку вирусного антигена — при помощи эксклюзионной хроматографии⁶ [8].

Качество готового продукта контролировали в соответствии с методами Государственной фармакопеи⁷ Российской Федерации по таким показателям, как подлинность, время седиментационной устойчивости, проходимость через иглу, количественное содержание антигена вируса клещевого энцефалита, извлекаемый объем, стерильность, бактериальные эндотоксины, аномальная токсичность, pH, специфическая активность, полнота сорбции антигена, посторонние примеси: формальдегид и протамина сульфат, специфическая безопасность, общий белок, остаточная ДНК, бычий сывороточный альбумин (БСА), альбумин человека.

⁴ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

ОФС.1.8.1.0002.15 Иммунобиологические препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

Приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».

ФС.1.2.4.0015.18 Вирусная безопасность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ФС.1.7.2.0006.15 Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁵ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

⁶ Стручкова И.В., Кальясова Е.А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле. Электронное учебно-методическое пособие. Н. Новгород; 2012.

⁷ ФС.3.3.1.0031.15 Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инаktivированная жидкая сорбированная или сухая в комплекте с растворителем алюминия гидроксида. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ОФС.1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам — субстратам производства биологических лекарственных препаратов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

Для изучения специфической активности применяли стандартную методику⁸ на мышах линии Balb/c (масса 14–16 г, возрастная категория 30–35 дней, без различия пола). При расширенном лабораторном изучении кроме регламентированного тест-штамма «Абсеттаров» (западный субтип) использовали также штаммы «Софьин» (дальневосточный) и «Корзухин» (сибирский).

Инфекционную активность ВКЭ оценивали при помощи фармакопейного метода титрования на беспородных мышах⁹.

Процедуры и манипуляции с животными, проводимые в ходе доклинических исследований, рассмотрены и утверждены Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 2 от 29.12.2020).

Количественное содержание антигена ВКЭ и полноту сорбции определяли с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА), используя коммерческий набор D-1154 (АО «Вектор-Бест») и стандартный образец предприятия (СОП) вакцины КЭ с.070517, содержащий 12,18 мкг/мл инактивированного антигена ВКЭ: готовили серийные двукратные разведения испытуемых образцов (вакцины или ее полупродуктов) и СОП, вносили по 100 мкл в лунки планшета (в двух повторностях для каждого разведения), далее методику выполняли согласно инструкции производителя набора. Вычисление концентрации (антигенной активности) гликопротеина Е проводили методом параллельных линий¹⁰. Аттестовали СОП вакцины КЭ относительно стандарта гликопротеина Е ВКЭ по показателю «Содержание инактивированного антигена вируса КЭ» при помощи ИФА. Стандарт гликопротеина Е ВКЭ был изготовлен и аттестован в соответствии с собственной оригинальной методикой.

Определяли БСА методом ИФА с использованием набора BSA ELISA Kit (Cygnus Technologies) в соответствии с инструкцией производителя.

Остаточную ДНК клеток Vero выявляли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией согласно инструкции производителя набора resDNA SEQ Quantitative Vero DNA Kit (Applied Biosystems), с применением соб-

ственного СОПа с.011114, содержащего 5 мкг/мл ДНК клеток Vero.

Электрофорез в полиакриламидном геле выполняли в соответствии с описанным в литературе методом [9] в собственной модификации. Разделение проводили в электрофоретической камере Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) в прерывистом 4/12% геле в соответствии с инструкцией производителя оборудования. Перед использованием исследуемый образец дополнительно концентрировали (в 20 раз) в центрифужных концентраторах Amicon (Millipore), смешивали с равным объемом восстанавливающего буфера и подвергали тепловой денатурации при 95 °С в течение 5 мин. Стандарт молекулярных масс – Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific), 116–14,4 кДа. Краситель – бриллиантовый голубой Кумасси G-250 (Sigma-Aldrich). Визуализация гелей осуществлялась через систему документирования Gel Doc EZ System (Bio-Rad). Применяли камеру Mini Trans-Blot (Bio-Rad) при выполнении иммуноблота на стадии электропереноса белков из акриламидного геля на поливинилиденфторид-мембрану (PVDF) Immobilon-P (Millipore). Сайты неспецифической сорбции блокировали 3% раствором БСА (Sigma-Aldrich).

Затем проводили иммуноокрашивание мембраны с использованием моноклональных антител 14D5 к белку Е ВКЭ (БиоСан, Новосибирск) и конъюгата вторичных антител с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich); альтернативное иммуноокрашивание – при помощи конъюгата поликлональных антител к суммарным антигенам ВКЭ (АО «НПО «Микроген», Томск). Далее мембрану окрашивали 0,03% раствором 3,3'-диаминобензидина (Sigma-Aldrich) в присутствии 0,02% перекиси водорода в течение 20 мин.

Для анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) применяли хроматографическую систему 1290 Infinity (Agilent Technologies), оснащенную колонкой Protein-Pak SEC 300 SW (Waters).

Оценку результатов исследований проводили при помощи статистических методов анализа с вычислением среднего арифметического и среднеквадратичного отклонения¹¹.

⁸ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

⁹ ФС.3.3.1.0031.15 Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая сорбированная или сухая в комплекте с растворителем алюминия гидроксида. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

¹⁰ 5.3. Statistical analysis of results of biological assays and tests. European Pharmacopoeia. 10th ed. V. I. Strasbourg: EDQM; 2019.

¹¹ ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

Результаты и обсуждение

Разработка новой вакцины КЭ, основанной на использовании перевиваемых клеток, с применением новой технологии культивирования и очистки начиналась с этапов формирования и аттестации главного и рабочего банков клеток Vero, а также главного и рабочего посевных материалов производственного штамма ВКЭ.

Применение перевиваемой линии субстратных клеток потребовало создания и внедрения новых методов, позволяющих контролировать полупродукты и готовый продукт в соответствии с актуальными нормативными требованиями, в частности методов определения остаточного содержания БСА и ДНК клеток Vero.

Разработанная вакцина представляет собой инактивированный формалином очищенный антиген ВКЭ, сорбированный на гидроокиси алюминия.

Согласно требованиям законодательства все стадии производства должны быть валидированы, а также показана эффективность¹² каждой из них. Одна из критических стадий производства инактивированных вирусных вакцин — инаktivация вирусного сбора. Несмотря на то что процесс инаktivации формальдегидом регламентирован и хорошо изучен, в данном исследовании был принципиально иной

состав среды. В связи с этим для подтверждения эффективности инаktivации в новой среде возникла необходимость более длительного изучения инфекционной и антигенной активности (рис. 1) — в течение 72 ч (на трех сериях вирусного сбора).

Через 24 ч после внесения инаktivирующего агента инфекционная активность трех серий вирусного сбора снижалась до недетектируемой, через 48 и 72 ч ее отсутствие подтверждалось. Антигенная активность каждой серии была нормирована относительно исходного уровня и выражена в процентах относительно исходной; после завершения процесса инаktivации эти значения практически не отличались. Таким образом было подтверждено, что выбранный режим инаktivации обеспечивает безопасность, сохраняя антигенную активность ВКЭ.

Ряд новых технологических решений позволил повысить воспроизводимость показателей качества препарата и снизить количество примесей. Использование современных полимерных сорбентов привело к повышению скорости процесса, эффективности очистки и стабильности результатов. Высокая степень очистки пика, соответствующего цельновиральной фракции, была продемонстрирована с помощью ВЭЖХ (рис. 2).

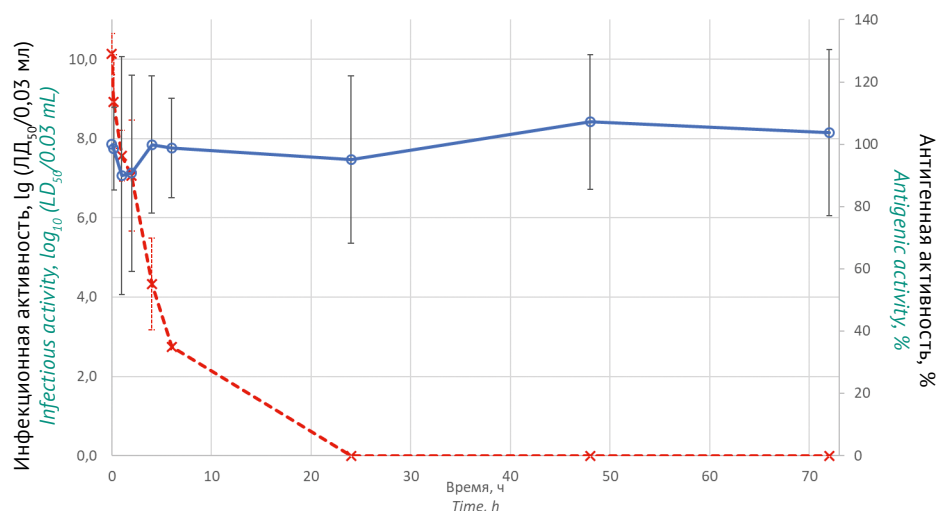


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Динамика инфекционной и антигенной активности в процессе инаktivации вирусного сбора по результатам трех серий. Антигенная активность нормирована относительно исходной, измеренной до добавления формалина. Интервалами указано стандартное отклонение. —х— — инфекционная активность (среднее арифметическое $\lg$ инфекционной активности); —о— — антигенная активность (среднее арифметическое $\lg$ антигенной активности).

Fig. 1. Time course of the infectious and antigenic activity of the virus harvest during inactivation, based on test results for three batches. Antigenic activity is normalised to the baseline values measured before adding formalin. The standard deviation is indicated by intervals. —х—, infectious activity (arithmetic means of $\lg$ values of infectious activity); —о—, antigenic activity (arithmetic means of $\lg$ values of antigenic activity).

¹² Решение Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

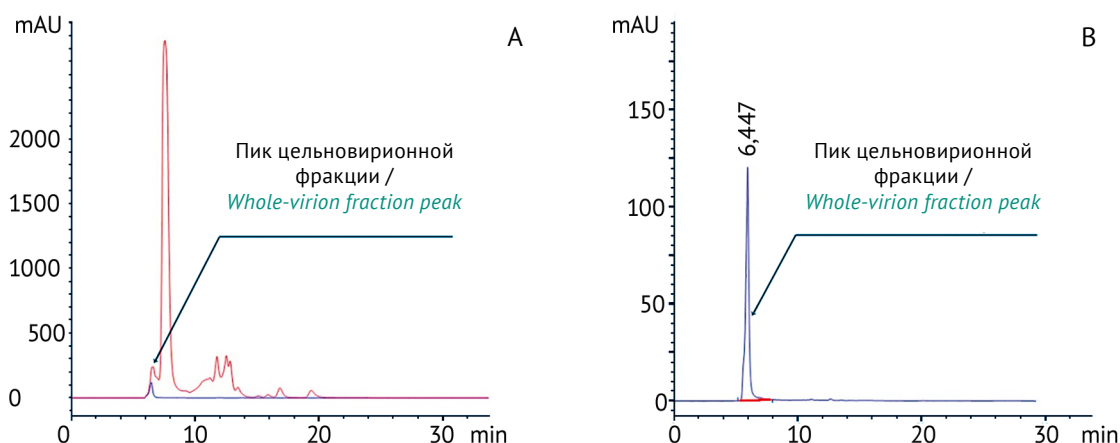


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Результаты контроля молекулярно-массового распределения полупродуктов вакцины «ВероКСЭН» методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. По оси абсцисс — время удерживания, мин; по оси ординат — оптическая плотность, mAU. А — хроматограмма очищенного концентрата: красным цветом — инактивированной вирусной взвеси; синим цветом — после хроматографической очистки. Б — хроматограмма очищенного концентрата с уменьшенным масштабом по оси ординат.

Fig. 2. Typical results of a molecular mass distribution test of VeroKSEN intermediates by high-performance liquid chromatography. The abscissa shows the retention time; the ordinate shows the absorbance. A, chromatogram of purified concentrate: inactivated virus suspension (red) and chromatographically purified concentrate (blue). B, chromatogram of chromatographically purified concentrate enlarged along the abscissa.

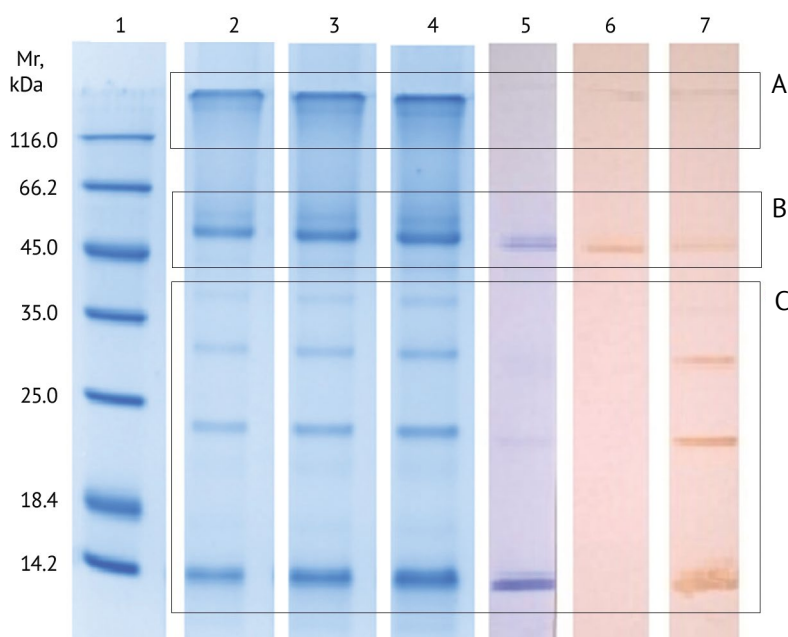


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Результаты электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблота очищенного концентрата вакцины «ВероКСЭН» (серия T08). 1 — стандарт молекулярных масс (Mr, кДа); 2–4 — электрофорез образца вакцины, нанесенной по 4, 6, 8 мкл на дорожку соответственно; 5 — контроль переноса белков на мембрану, окрашивание Кумасси G-250; 6 — иммуноблот вакцины, иммуноокрашивание моноклональными антителами к гликопротеину Е вируса клещевого энцефалита (ВКЭ); 7 — иммуноблот вакцины, иммуноокрашивание поликлональными антителами к суммарным антигенам ВКЭ. А, В, С — основные специфические вирусные белки.

Fig. 3. SDS-PAGE and immunoblotting results for the purified concentrate of VeroKSEN (batch T08). Lane 1 contains a molecular weight standard (Mr, kDa). Lanes 2–4 show electrophoresis of 4, 6, and 8 μ L samples of the vaccine, respectively. Lane 5 confirms protein transfer to the membrane (Coomassie G-250 staining). Lane 6 illustrates immunoblotting of the vaccine stained with monoclonal antibodies to tick-borne encephalitis virus (TBEV) glycoprotein E, and lane 7, with polyclonal antibodies to total TBEV antigens. A, B, and C stand for the main specific viral proteins.

Таблица 1. Ключевые показатели качества вакцины «ВероКСЭН» по результатам контроля восьми серий препарата в исследовании на мышах

Table 1. Critical quality attributes of the VeroKSEN vaccine and the results of testing eight batches of the vaccine in mice

Показатель качества (метод) <i>Quality attribute (method)</i>	Критерий приемлемости <i>Acceptance criterion</i>	Результат контроля, М±S <i>Control result, M±S</i>
Содержание антигена ВКЭ (ИФА) <i>TBEV antigen content (ELISA)</i>	2,0–6,0 мкг/мл <i>2.0–6.0 µg/mL</i>	4,3±0,9 мкг/мл <i>4.3±0.9 µg/mL</i>
Полнота сорбции антигена (ИФА) <i>Antigen adsorption (ELISA)</i>	80–100% <i>80–100%</i>	99,3±0,8% <i>99.3±0.8 %</i>
Специфическая активность, МИД ₅₀ (биологический) <i>Potency, MID₅₀ (bioassay)</i>	0,001–0,017 мл <i>0.001–0.017 mL</i>	0,005±0,003 мл <i>0.005±0.003 mL</i>
Специфическая безопасность (биологический) <i>Specific toxicity (bioassay)</i>	Не должна содержать живой ВКЭ <i>Must not contain live TBEV</i>	Не содержит живой ВКЭ <i>No live TBEV</i>
Содержание примесей: <i>Impurity content:</i>		
сахароза <i>sucrose</i>	40–60 мг/мл <i>40–60 mg/mL</i>	50,1±2,9 мг/мл <i>50.1±2.9 mg/mL</i>
алюминий <i>aluminium</i>	0,60–1,00 мг/мл <i>0.60–1.00 mg/mL</i>	0,76±0,05 мг/мл <i>0.76±0.05 mg/mL</i>
формальдегид (колориметрический) <i>free formaldehyde (colourimetry)</i>	≤20 мкг/мл <i>≤20 µg/mL</i>	<20 мкг/мл <i><20 µg/mL</i>
бычий сывороточный альбумин (ИФА) <i>residual bovine serum albumin (ELISA)</i>	≤50 нг в 1 дозе вакцины <i>≤50 ng/dose</i>	4,6±0,77 нг в 1 дозе вакцины <i>4.6±0.77 ng/dose</i>
ДНК субстратных клеток (ПЦР) <i>residual host-cell DNA (PCR)</i>	≤10 нг в 1 дозе вакцины <i>≤10 ng/dose</i>	5,85±1,7 нг в 1 дозе вакцины <i>5.85±1.7 ng/dose</i>
бактериальные эндотоксины (гель-тромб тест, метод А) ^а <i>bacterial endotoxins (gel-clot test, method A)^a</i>	≤25 ЕЭ/мл <i>≤25 EU/mL</i>	<25 ЕЭ/мл <i><25 EU/mL</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. М — среднее арифметическое значение; S — стандартное отклонение; ВКЭ — вирус клещевого энцефалита; ИФА — иммуноферментный анализ; ПЦР — полимеразная цепная реакция; МИД₅₀ — минимальная иммунизирующая доза, защищающая 50% животных; ЕЭ — единицы эндотоксина.

^а ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

Note. M, arithmetic mean; S, standard deviation; TBEV, tick-borne encephalitis virus; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PCR, polymerase chain reaction; MID₅₀, minimum immunising dose that protects 50% of the animals tested; EU, endotoxin units.

^a OFS.1.2.4.0006.15 Bacterial endotoxins. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. V. 1. Moscow; 2018.

Хроматографический анализ показал, что доля цельновирионной фракции в процессе очистки увеличилась с 6,8 до 98,2%.

При помощи методов электрофореза и иммуноблота с моноклональными и поликлональными антителами к ВКЭ (рис. 3) показано, что в составе очищенного концентрата вакцины «ВероКСЭН» присутствовали основные специфические вирусные белки: мономер гликопротеина Е (рис. 3, зона В, 53–55 кДа), олигомеры гликопротеина Е (зона А, более 116 кДа). Также выявлены мономеры и олигомеры белка С ВКЭ (зона С, молекулярная масса 12,1, 24,2, 36,3 кДа). Часть олигомеров, образовавшихся из вирусных

белков в процессе инактивации формалином, оказалась устойчивой к денатурации, что также подтверждается данными литературы [10, 11].

Готовый препарат соответствовал современным нормативным требованиям, предъявляемым к инактивированным вирусным вакцинам (табл. 1), в том числе по содержанию таких примесей, как ДНК субстратных клеток и БСА. Кроме того, использование аттестованной перевиваемой линии клеток позволило полностью исключить антибиотиков из технологии создания вакцины КЭ.

Изучение стабильности препарата подтвердило соответствие вакцины требованиям нормативной документации через 36 мес. хранения.

Таблица 2. Показатели специфической активности вакцины «ВероКСЭН» и препарата сравнения «ЭнцеВир» в опытах на мышах
Table 2. Potency values of the test vaccine (VeroKSEN) and the comparator vaccine (EnceVir) in mice

Вакцина, серия <i>Vaccine, batch</i>	Специфическая активность вакцины (МИД ₅₀ , мл) для штамма <i>Potency (MID₅₀, mL) for the strain</i>		
	Корзухин (261,0 ЛД ₅₀) <i>Korzukhin (261.0 LD₅₀)</i>	Софьин (749,9 ЛД ₅₀) <i>Sofjin (749.9 LD₅₀)</i>	Абсеттаров (204,3–1000 ЛД ₅₀) <i>Absettarov (204.3–1000 LD₅₀)</i>
ВероКСЭН, Т03 <i>VeroKSEN, T03</i>	0,00125 <i>0.00125</i>	0,00093 <i>0.00093</i>	0,007 <i>0.007</i>
ЭнцеВир, Т67 <i>EnceVir, T67</i>	0,00436 <i>0.00436</i>	0,00246 <i>0.00246</i>	0,003 <i>0.003</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. МИД₅₀ — минимальная иммунизирующая доза, защищающая 50% животных; ЛД₅₀ — летальная доза, вызывающая гибель 50% испытываемых животных.

Note. MID₅₀, minimum immunising dose that protects 50% of the animals tested; LD₅₀, lethal dose that kills 50% of the animals tested.

В ходе доклинических исследований вакцины «ВероКСЭН»¹³ изучалось ее местное раздражающее и токсическое воздействие, в том числе репродуктивная токсичность. Кроме того, исследовалась расширенная специфическая активность в биологическом тесте на мышах с применением тест-штаммов «Софьин» (дальневосточный субтип) и «Корзухин» (сибирский субтип). В качестве препарата сравнения использовалась вакцина «ЭнцеВир». Специфическая активность в отношении штамма «Абсеттаров» (западный субтип) оценивалась при контроле качества препаратов.

Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют о высокой специфической активности вакцины «ВероКСЭН» против доминирующих на территории России субтипов ВКЭ. Иммуногенность вакцин «ВероКСЭН» и «ЭнцеВир» оказалась выше в испытании штамма «Софьин», несмотря на большую дозу разрешающего заражения по сравнению со штаммом «Корзухин», что, видимо, связано с гомологичностью производственного штамма № 205 и тест-штамма «Софьин», относящихся к дальневосточному генотипу ВКЭ.

Заключение

Исследованы ключевые показатели качества новой вакцины клещевого энцефалита «ВероКСЭН», полученной с использованием перевиваемой линии клеток Vero, а также ее продуктов в опытах на мышах.

Показано, что выбранный режим инактивации снижает инфекционную активность вирусного сбора до недетектируемого уровня через 24 ч, а 72-часовой процесс надежно обеспечивает специфическую безопасность вакцины. При этом антигенная активность сохраняется на уровне около 100% от исходного значения.

Этапы тонкой очистки позволяют получить цельновирионную фракцию с чистотой до 98,2% и удалить технологические примеси (ДНК клеток-продуцентов, БСА, формальдегид, бактериальные эндотоксины и др.) до уровней, соответствующих требованиям национального законодательства.

Вакцина, полученная описанным способом, обладает высокой специфической активностью в отношении западного, сибирского и дальневосточного субтипов вируса клещевого энцефалита. Специфическая активность вакцин для штаммов «Абсеттаров», «Софьин» и «Корзухин», выраженная в МИД₅₀, составила 0,007, 0,00125 и 0,00093 мл соответственно.

Литература/References

1. Riccardi N, Antonello RM, Luzzati R, Zajkowska J, di Bella S, Giacobbe DR, et al. Tick-borne encephalitis in Europe: a brief update on epidemiology, di-

agnosis, prevention, and treatment. *Eur J Intern Med.* 2019;62:1–6.

<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.01.004>

¹³ Бутенко А.М., Ларичев В.Ф. Изучение протективной активности вакцины клещевого энцефалита на перевиваемой клеточной линии Vero на мышах линии Balb/c. Отчет по доклиническому исследованию. М.: ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; 2021.

2. Johnson N, Migne CV, Gonzalez G. Tick-borne encephalitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2023;36(3):198–202. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000924>
3. Luan Y, Gou J, Zhong D, Ma L, Yin C, Shu M, et al. The tick-borne pathogens: an overview of China's situation. *Acta Parasitol.* 2023;68(1):1–20. <https://doi.org/10.1007/s11686-023-00658-1>
4. Андаев ЕИ, Никитин АЯ, Толмачева МИ, Зарва ИД, Яцменко ЕВ, Матвеева ВА и др. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2022 г. и прогноз ее развития на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023;(1):6–16. Andaev EI, Nikitin AY, Tolmacheva MI, Zarva ID, Yatsmenko EV, Matveeva VA, et al. Epidemiological situation on tick-borne viral encephalitis in the Russian Federation in 2022 and forecast of its development for 2023. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2023;(1):6–16 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-6-16>
5. Orenstein W, Offit P, Edwards K, Plotkin S. *Plotkin's Vaccines.* 7th ed. Elsevier; 2017.
6. Vidor E, Meschievitz C, Plotkin S. Fifteen years of experience with Vero-produced enhanced potency inactivated poliovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16(3):312–22. <https://doi.org/10.1097/00006454-199703000-00011>
7. Vorovitch MF, Grishina KG, Volok VP, Chernokhaeva LL, Grishin KV, Karganova GG, Ishmukhametov AA. Evervac: phase I/II study of immunogenicity and safety of a new adjuvant-free TBE vaccine cultivated in Vero cell culture. *Hum Vaccin Immunother.* 2020;16(9):2123–30. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1757990>
8. Стронин ОВ, Колтунов АА, Епанчинцев АА, Шарова ОИ, Учуватова ЕВ, Дьяконова ЕВ и др. Способ получения вакцины клещевого энцефалита. Патент Российской Федерации № 2678431; 2017. Stronin OV, Koltunov AA, Epanchintsev AA, Sharova OI, Uchuvatova EV, Dyakonova EV, et al. Method for producing tick-borne encephalitis virus vaccine. Patent of the Russian Federation No. 2678431; 2017 (In Russ.).
9. Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 1969;244:4406–12. PMID: [5806584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5806584/)
10. Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Jarmer J, Koessl C, Stiasny K, Heinz FX. Aluminum hydroxide influences not only the extent but also the fine specificity and functional activity of antibody responses to tick-borne encephalitis virus in mice. *J Virol.* 2013;87(22):12187–95. <https://doi.org/10.1128/JVI.01690-13>
11. Heinz FX, Kunz C. Chemical crosslinking of tick-borne encephalitis virus and its subunits. *J Gen Virol.* 1980;46(2):301–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-46-2-301>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **О.В. Стронин** — анализ и обобщение данных литературы, разработка дизайна и концепции исследования, разработка up-stream процессов, разработка и выполнение биологических методов контроля, анализ и интерпретация результатов, формулировка выводов, написание, редактирование, оформление текста рукописи, работа с графическим материалом; **А.А. Епанчинцев** — сбор данных литературы, разработка и выполнение методов очистки, выполнение анализа методами ВЭЖХ, электрофореза, вестерн-блот, сбор и систематизация данных, подготовка части графического материала, критический пересмотр текста рукописи; **А.А. Колтунов** — разработка концепции исследования, критическое обсуждение результатов исследования, критический пересмотр текста рукописи, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Все исследования проводились в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, принципами этического кодекса CIOMS «Международные рекомендации по проведению биомедицинских исследований с использованием животных», Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ГОСТ 33216–2014).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **O.V. Stronin** analysed and summarised literature data; designed and conceptualised the study; developed up-stream processes; developed biological control methods and carried out the control; analysed and interpreted the results; formulated the conclusions; drafted, edited, and formatted the manuscript; and worked with graphical material. **A.A. Epanchintsev** collected literature data; developed purification methods and carried out the purification; performed HPLC, electrophoresis, and Western blotting; collected and collated data; contributed to graphical material preparation; and critically reviewed the manuscript. **A.A. Koltunov** elaborated the study concept, critically discussed the study results, critically revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. All the experiments were performed according to the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes, the CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Russian Standard GOST 33216–2014). The Bioethics Committee at the National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya approved animal procedures and manipulations

Процедуры и манипуляции с животными в ходе доклинических исследований рассмотрены и утверждены Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол заседания от 29.12.2020 № 2).

Благодарности. Авторы выражают благодарность И.В. Красильникову, д-ру мед. наук, проф., инициировавшему поисковые исследования. Авторы благодарны всем сотрудникам компании АО «НПО «Микроген», особенно коллегам из филиала «НПО Вирион» (г. Томск), непосредственно участвовавшим в организации, проведении экспериментальных работ, изготовлении и контроле экспериментальных и опытно-промышленных серий, а также сотрудникам административно-хозяйственных подразделений компании, обеспечивших поставку сырья и оборудования.

for the non-clinical study under meeting minutes No. 2 dated December 29, 2020.

Acknowledgements. The authors are grateful to Prof. Igor V. Krasilnikov, who initiated the pilot studies. They express their gratitude to all the employees of Microgen, and especially the employees of its Branch in Tomsk, Virion, who were directly involved in the organisation and performance of the experimental work, as well as the manufacture and quality control of laboratory and pilot-scale batches. Also, the authors would like to thank the employees of the administrative and economic divisions of the company who ensured the supply of raw materials and equipment.

Об авторах / Authors

Стронин Олег Владимирович, канд. мед. наук

Scopus ID: 23475557900

o.v.stronin@microgen.ru

Епанчинцев Антон Александрович

Scopus ID: 57195772463

a.a.epanchintsev@microgen.ru

Колтунов Александр Анатольевич, канд. мед. наук

Scopus ID: 6603661664

a.a.koltunov@microgen.ru

Oleg V. Stronin, Cand. Sci. (Med.)

Scopus ID: 23475557900

o.v.stronin@microgen.ru

Anton A. Epanchintsev

Scopus ID: 57195772463

a.a.epanchintsev@microgen.ru

Aleksandr A. Koltunov, Cand. Sci. (Med.)

Scopus ID: 6603661664

a.a.koltunov@microgen.ru

Поступила 20.06.2023

После доработки 29.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 20 June 2023

Revised 29 August 2023

Accepted 13 September 2023