

УДК 576:858+616.988:578.823.91-084-037.615.371

О.П. Трохименко, Л.Г. Жолнер, П.В. Куцаєв, В.М. Куцик

МОДЕЛЮВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ ЖИВОЇ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ ПРОТИРОТАВІРУСНОЇ ВАКЦИНИ

We simulate the industrial technology for rotavirus vaccine, based on the strain of group A rotavirus with G1P[8] genotype, circulating among people in Ukraine. We propose to use this strain of rotavirus as the industrial strain. Through successive passages, it is adapted to cultivation conditions in the continuous human and animal cell cultures. The model of technology for the rotavirus vaccine, based on the industrial strain of rotavirus, is developed for its cultivation in continuous cell culture Vero. Specifically, the method of pseudo-suspension cultivation on DEAE Sephadex A-50 microcarriers is used to increase the surface area for cultivation of Vero cells.

Вступ

Сьогодні ротавірусна інфекція (РВІ) є однією з найбільш значущих проблем охорони здоров'я в усіх країнах світу та саме їй належить провідна роль у структурі вірусних діарейних захворювань у новонароджених і дітей віком до п'яти років [1–5].

Щорічно в усьому світі мільйони дітей хворіють на важку форму ротавірусної діареї, з яких більше 440 тис. помирають, в основному у країнах, що розвиваються [6, 7]. В Україні РВІ впродовж останніх років також набула значного поширення. Так, були зареєстровані сезонні спалахи РВІ в м. Одеса, Одеській області (2001–2002 рр.), у м. Київ (2004–2005 рр.) [8].

З метою запобігання виникненню спалахів РВІ та її поширенню поряд із застосуванням санітарно-гігієнічних і протиепідемічних заходів найдієвішою вважається специфічна профілактика (вакцинопрофілактика).

Противірусна вакцина на основі атенуованого штаму ротавірусу людини RIX4114 з генотипом G1P[8] сьогодні розглядається як найбільш ефективна, тому що здатна зменшити кількість важких випадків ротавірусних дегідратуючих діарей з летальними наслідками в дітей молодшого віку та загальну кількість випадків, що потребують госпіталізації. Її ефективність виявилась доволі високою, що підтверджено клінічними дослідженнями серед дітей в Європі та Латинській Америці [9, 10]. Вакцина індукує перехресну імунну відповідь не тільки проти аналогічних ротавірусних штамів, що циркулюють серед людей (тобто з генотипом G1P[8]), але також і проти вірусів з меншою гомологією рецепторних білків, чий G/P-генотип відрізняється від вакцинного штаму. Вакцина зареєстрована в Україні

та включена до календаря профілактичних щеплень, затвердженого Наказом МОЗ [11].

Проте слід зазначити, що тривале застосування на певній території вакцин на основі атенуованих або реасортантних штамів вірусів, може призвести до витіснення з циркуляції ротавірусів з домінуючим генотипом, при цьому ефективність застосовуваної вакцини прогнозовано знизиться. Крім того, одночасна циркуляція диких і вакцинних штамів ротавірусів серед населення збільшує ризик реверсії вірулентності вакцинних штамів ротавірусів за рахунок реасортації їх генів. При цьому також не слід недооцінювати здатність ротавірусів до подолання міжвидових бар'єрів і велику ймовірність включення в циркуляцію ротавірусів тварин з утворенням нових життєздатних реасортантів між ними і ротавірусами людини. І нарешті, найбільш ефективною при застосуванні в певному регіоні (країні) виявиться вакцина, в яку включені штами ротавірусів, виділених від людей, що проживають на цій території.

Оскільки розроблення технології одержання будь-якої вакцини та її впровадження в практику є багатоетапним, дуже тривалим і високоартісним завданням, початковим етапом розроблення вітчизняної противірусної вакцини на основі штамів ротавірусів, що циркулюють на території України, є моделювання технологічного процесу її одержання.

Постановка задачі

Метою роботи є моделювання технологічного процесу одержання нової вітчизняної культуральної противірусної вакцини на основі виділеного від людини й адаптованого

до умов культивування в культурі клітин штаму ротавірусу з генотипом G1P[8].

Матеріали та методи

Під час розроблення технології застосовувались такі матеріали:

- *Вірус*: ротавірус людини з генотипом G1P[8], попередньо адаптований нами до умов культивування в культурі клітин Vero [15, 16].

- *Культура клітин*: перещеплювальна культура клітин нирки африканської зеленої мавпи Vero, одержана з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології і радіології ім. Р.Є. Кравецького НАН України.

- *Живильні середовища*: сухі живильні середовища DMEM і 199 (Sigma, USA).

- *Допоміжні реактиви*: сироватка крові ембріонів корів (США), розчин трипсину 0,25 %, розчин Хенкса для культур клітин (БіоТестМед (Україна)), пеніцилін, стрептоміцин (Україна).

Для збільшення площі поверхні для культивування клітин застосовували мікроносії DEAE Sephadex A-50, придатного для псевдосуспензійного культивування клітин. Оскільки поверхня часток Sephadex A-50 має гідрофільні властивості та високу спорідненість до клітин тварин завдяки позитивному заряду поверхні, це полегшує їх прикріплення і розпластання [17, 18].

Результати й обговорення

Технологічні схеми етапів одержання вакцини наведено на рис. 1–3 без санітарної підготовки, яка включає підготовку персоналу, дистильованої води, мийних і дезінфікуючих розчинів, робочого одягу, обладнання і комунікацій, повітря, а також стерильної тари.

Етап підготовки. На початковому етапі виробництва проводиться підготовка розчинів, живильних середовищ, мікроносіїв (рис. 1).

Фосфатно-сольовий буферний розчин з рН = 7,2–7,4. У змішувач за допомогою об'єм-

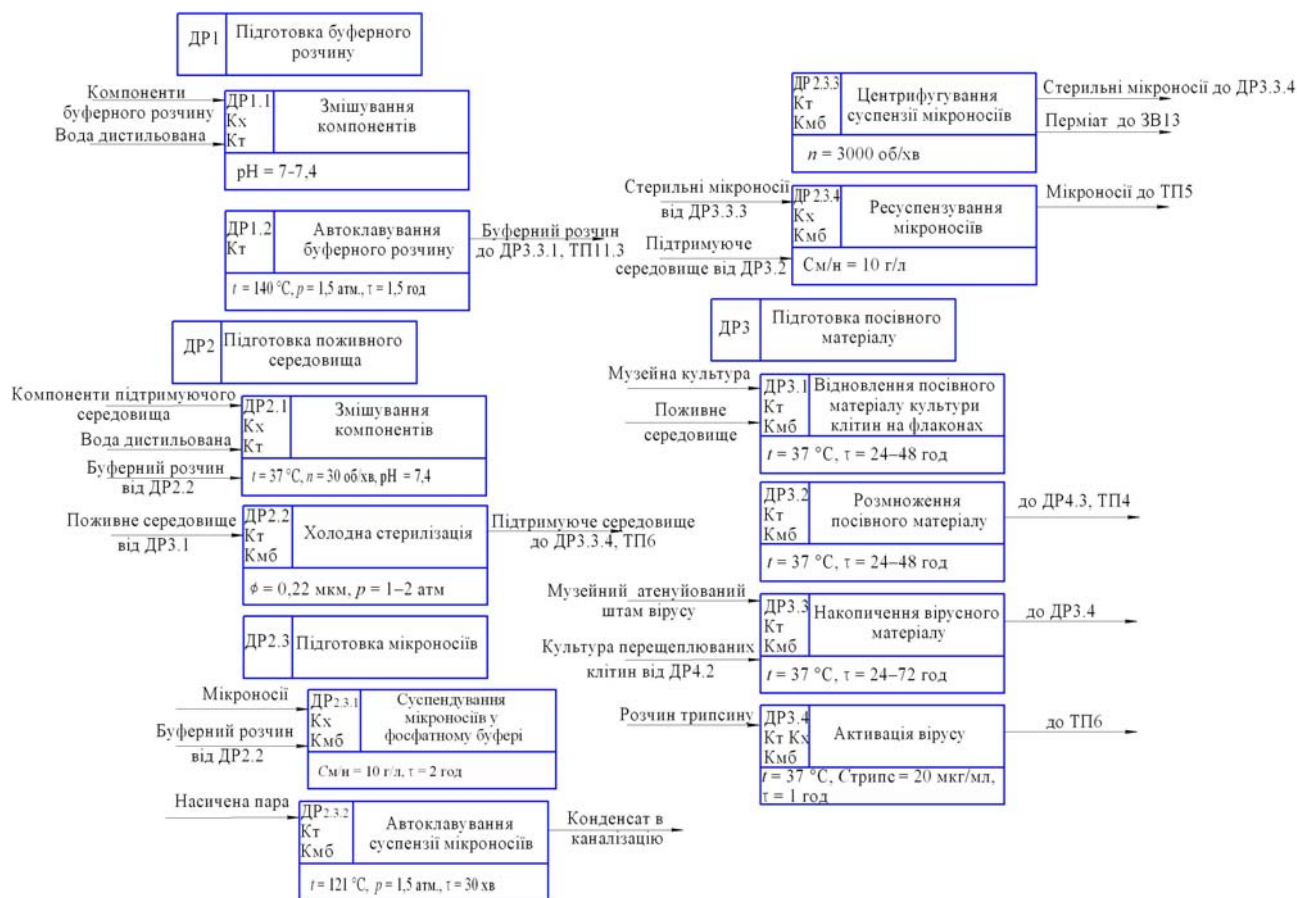


Рис. 1. Етап підготовки

но-вагових дозаторів подається необхідна кількість сухих компонентів фосфатно-сольового буферного розчину, які розчиняються в дистильованій воді, поданій з трубопроводу, рН розчину (до 7,2–7,4) доводять 1М NaOH. Одержаний буферний розчин стерилізується автоклавуванням при режимі $t = 140\text{ }^\circ\text{C}$, $p = 0,15\text{ МПа}$, $\tau = 1,5\text{ год}$.

Живильні середовища ДМЕМ і 199 окремо готують у змішувачі, в який за допомогою об'ємно-вагових дозаторів подається необхідна кількість сухих компонентів живильного середовища та дистильована вода. У змішувачі підтримується температура середовища $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$, рН = 7,4. Величина рН живильних середовищ доводиться 7,5 %-м розчином гідрокарбонату натрію та насосом подається на фільтр з діаметром пор $\varnothing = 0,22\text{ мкм}$, де під тиском $p = 2\text{ атм.}$, проводиться його стерилізація.

Підтримуюче живильне середовище готується при змішуванні рівних об'ємів підготовлених живильних середовищ ДМЕМ і 199 з додаванням антибіотиків до кінцевої концентрації: 100 Од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину.

Ростове середовище для культивування культур клітин готується на основі підтримуючого середовища: додаванням у нього сироватки крові ембріонів корів до кінцевої концентрації 5,0 %.

У змішувач за допомогою дозаторів подаються мікроносії, аналогом яких є DEAE Sephadex A-50, та фосфатно-сольовий буферний розчин (рН 7,4). Мікроносії вносяться до кінцевої концентрації $C = 10\text{ г/л}$. Суспензія перемішується протягом двох годин і автоклавується при $t = 120\text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 30\text{ хв}$ [18]. Стерильні мікроносії відокремлюються від буферного розчину при низькошвидкісному центрифугуванні та ресуспендуються у підтримуючому середовищі в змішувачі.

Вибір і підготовка виробничого штаму ротавірусу

Основним етапом розроблення технології одержання будь-якої противірусної вакцини є вибір виробничого штаму вірусу, при цьому визначальними є його генетична гомологія з найпоширенішим штамом збудника, імуногенність і високі показники репродукції в культурі клітин. Першим нашим кроком на шляху створення біотехнології отримання нової вітчизняної протиротавірусної вакцини було виділення

ротавірусів з клінічного матеріалу від хворих з різних регіонів України. Виділені штами ротавірусів було охарактеризовано за G/P-генотипами, внесено до колекції кафедри вірусології НМАПО ім. П.Л. Шупика й адаптовано до умов культивування в перешеплювальній культурі клітин людини. Серед них було виявлено штам № 136 з генотипом G1P[8], який здатний добре адаптуватись до умов культивування в перешеплювальній культурі клітин людини. Цей штам було відібрано як штам-кандидат для створення вітчизняної протиротавірусної вакцини [15, 16]. Перед початком роботи виробничий штам ротавірусу було адаптовано до культивування в культурі Vero, при цьому він вже на другому–третьому пасажах мав інфекційний титр $6,5\text{--}7,5\text{ lg TCD}_{50}/\text{мл}$.

Культура клітин Vero, яка використовується при одержанні виробничого штаму ротавірусу, готується у вигляді моношарів у скляних матрацах або ролерних бутлях. Суспензія клітин культури в посівній концентрації $0,3\text{--}0,5 \cdot 10^6\text{ кл/мл}$ вноситься у культуральну посудину та культивується впродовж 48–72 год до утворення суцільного моношару, якість якого контролюється під час мікроскопічного дослідження. Клітинні моношари відмиваються від ростового живильного середовища розчином Хенкса. До суспензії виробничого штаму ротавірусу додається розчин трипсину для його протеолітичної активації, яка проводиться при температурі $37\text{ }^\circ\text{C}$. Підготовлений у такий спосіб виробничий вірус адсорбується на поверхні відмитих клітинних моношарів. Надалі в посудину для культивування додається підтримуюче середовище і вірус культивується впродовж 24–48 год при $37\text{ }^\circ\text{C}$ до повного прояву цитопатичної дії в інфікованих культурах, що контролюється при мікроскопічному дослідженні. Після трьох циклів заморожування і розморожування рідини у флаконах з інфікованими культурами вірусомісна рідина в кожному з них контролюється на стерильність, освітлюється низькошвидкісним центрифугуванням та об'єднується у спільний пул, у якому визначається інфекційний титр посівного вірусу за цитопатичною дією в культурі клітин. Одержана вірусомісна рідина аліквотується і зберігається при $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

Етап культивування (рис. 2). Суспензія клітин поверхневозалежної клітинної культури Vero у ростовому живильному середовищі, в посівній концентрації $0,5\text{--}1,0 \cdot 10^6\text{ кл/мл}$, вводиться у взаємодію з мікроносіями до кінцевої

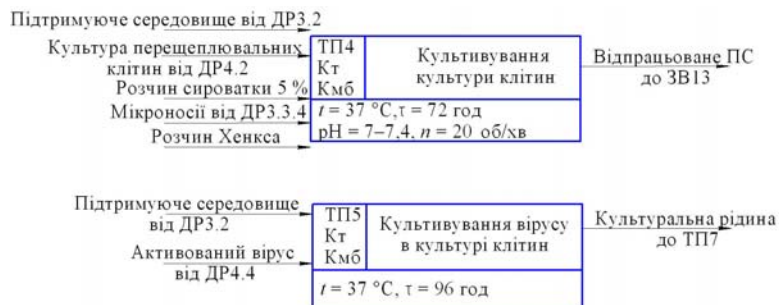


Рис. 2. Етап культивування

концентрації останніх 1–5 г/л. Культивування культури клітин Vero здійснюється в реакторі об'ємом 25 л при $t = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7\text{--}7,4$, $\tau = 72\text{--}96$ год, з коефіцієнтом заповнення $K = 0,65$ й оснащеному лопатевою мішалкою, що обертається з частотою $n = 20\text{--}40$ об/хв. Аналогом цієї конструкції є біореактор фірми Bellco Glass Inc. (Вайнленд, США).

Застосування методу псевдосупензійного культивування порівняно з методами стаціонарного або ролерного культивування істотно збільшує площу поверхні росту для субстратзалежної клітинної культури, завдяки чому, відповідно, збільшуються і об'єм клітинного субстрату для культивування виробничого вірусу та його вихід.

Після мікроскопічного контролю якості клітинного моношару на мікроносіях, ростове середовище видаляється і носії з клітинними моношарами двічі промиваються розчином Хенкса.

Відповідна аліквота виробничого вірусу розморожується, вірус активується трипсином у кінцевій концентрації 10–20 мкг/мл при $t = 37^\circ\text{C}$ протягом однієї години.

Після активації вірус адсорбується на поверхні клітин впродовж однієї години при 37°C . Потім у реактор додається підтримуюче середовище і ротавірус культивується при $t = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7\text{--}7,4$ впродовж 72–96 год.

Етап очищення (рис. 3). Після стадії культивування з метою отримання максимального виходу вірусу з клітин проводиться руйнування клітин ультразвуком, який здійснюється в дезінтеграторі, куди надходить культуральна рідина з реактора. Дезінтегратор являє собою збірник, оснащений випромінювачем ультразвуку.

Відділення вірусомісної рідини від мікроносіїв і уламків клітин здійснюється у фільтруючій центрифугі з частотою обертання 5000 об/хв з ручним вивантаженням осаду мікроносіїв. Надосадова рідина, яка містить вакцинний ротавірус, далі очищується від залишків клітин методом мікрофільтрації на фільтрах з діаметром пор $\varnothing = 0,22$ мкм під тиском $p = 0,2$ МПа.



Рис. 3. Етап очищення

На наступному етапі вірусовмісна рідина від установки мікрофільтрації за допомогою насоса подається в рулонний фільтр з діаметром пор $\varnothing = 0,1$ мкм під тиском $p = 0,2$ МПа з метою ультрафільтрації і тонкого очищення. При цьому у фільтраті залишаються компоненти підтримуючого середовища та вірусні частин-

ки. Надалі вакцинний вірус доочищується методом гельфільтрації на іонообмінних смолах та на фільтрі з діаметром пор $\varnothing = 0,22$ мкм. До одержаної вірусовмісної рідини додається стабілізатор. Отримана готова вакцина фасується в ампули або флакони в машинах автоматичної розфасовки.

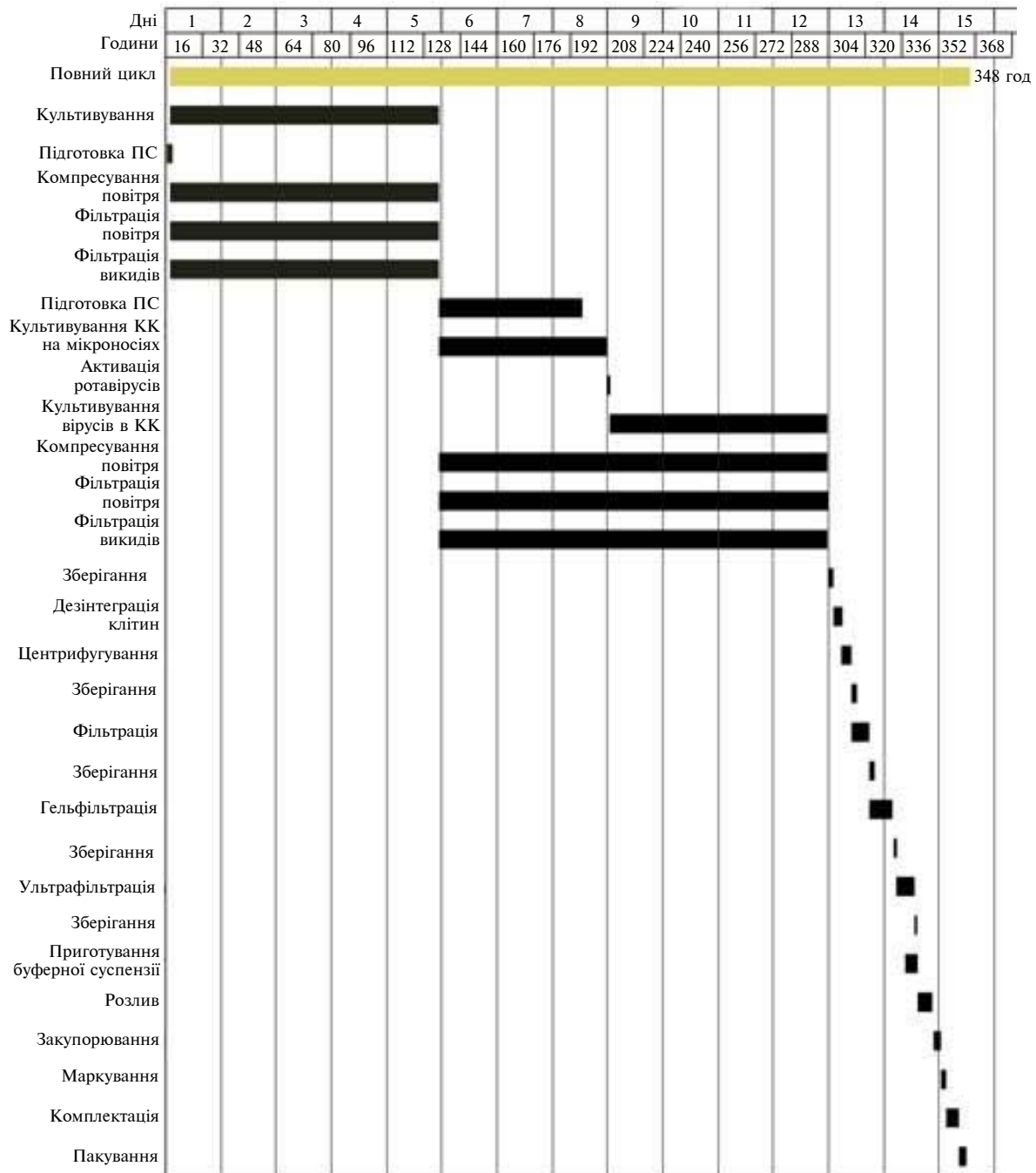


Рис. 4. Діаграма Ганта для виробництва протиротавірусної вакцини

Ліофілізація вакцини здійснюється у вакуум-сушильних агрегатах – сублімаційних сушарках з полицями для флаконів, автоматичною лінією вивантаження та направлення в машину для закупорки флаконів металевими кришками. Розлив стерильного буферного розчину для розведення проводиться в машинах автоматичної розфасовки у флакони.

Пакування, маркування та відвантаження вакцини відбувається в машині для наклеювання етикеток. Готова вакцина контролюється за параметрами стерильності, інфекційної активності вірусу в культурі клітин та на лабораторних тваринах на імуногенність. Вакцина і відповідний розчинник до неї упаковуються в коробки. Останнім етапом виробництва є знешкодження відходів.

За розробленою принциповою схемою, яка віддзеркалює модель виробництва, з використанням комп'ютерної програми SuperPro Designer розраховано матеріальний баланс одного циклу виробничого процесу. На рис. 4 наведено діаграму Ганта для виробництва, яка характеризує тривалість стадій виробництва та їх взаємозв'язок.

Враховуючи те, що при моделюванні технологічного процесу отримання живої протиротавірусної вакцини використано штам ротавірусу людини групи А з генотипом G1P[8], виділений на території України, варто сподіватись, що очікувана ефективність вакцини як у цілому по Україні, так і в окремих регіонах буде не нижчою за 0,8.

Висновки

Розроблено технологічну схему одержання протиротавірусної вакцини на основі штаму ротавірусу групи А з генотипом G1P[8], що циркулює серед людей на території України. Виділений штам ротавірусу через послідовні пасажування адаптується до умов культивування в перещеплювальній культурі клітин людини та тварин і пропонується нами як виробничий штам-кандидат. Протиротавірусна вакцина на основі виробничого штаму ротавірусу одержується в перещеплювальній культурі клітин Vero. З метою збільшення площі поверхні для культивування клітин застосовується метод псевдосуспензійного культивування на мікроносіях з використанням DEAE Sephadex A-50.

Проведене комп'ютерне моделювання процесу виробництва протиротавірусної вакцини включає розрахунок матеріального балансу одного циклу виробництва. Побудована діаграма Ганта характеризує тривалість виробничих процесів та їх взаємозв'язок.

Представлена технологія та комп'ютерна модель можуть бути використані для отримання дослідно-промислових партій вакцини і її доклінічного випробування на тваринах.

Представлені технологія та комп'ютерна модель будуть використані для отримання дослідно-промислових партій вакцини та її доклінічного дослідження на тваринах з метою вивчення нешкідливості, імуногенності та захисної дії.

1. Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H., and Ruck B.J. Letter: Evidence for viral gastroenteritis // *N Engl J Med.* – 1973. – **289**. – P. 1096–1097.
2. Kapikian A.Z., Hoshino Y., and Chanock R.M. Rotaviruses // *Fields virology* / P.M. Howley, D. Griffin, D.M. Knipe (eds.). – 4th ed. – Philadelphia, Pa: Lippincott Williams&Wilkins, 2001. – **2**. – P. 1787–1833.
3. Gray J., Vesikari T., Van Damme P. et al. Rotavirus // *J. of pediatric Gastroenterology and Nutrition.* – 2008 (May). – **46**, Sopp. 2. – P. 24–31.
4. *Rotaviruses. Methods and Protocols* / James Gray and Ulrich Desselberger (eds). – Totowa, NJ: Humana Press, 2000. – 272 p.
5. Desselberger U. Viral Factors Determining Rotavirus Pathogenicity // *Arch Virol.* – 1997. – Suppl. 13. – P. 131–139.
6. *WHO Weekly Epidemiological Record.* – 2008. – **83** (47). – 464 p.
7. Soriano-Gabarro M., Mrućowicz J., Vesicari T. et al. Burden of Rotavirus Disease in European Union Countries // *Pediatric Infect. Dis.* – 2006. – **25**. – P. 7–11.
8. Дзюблик І.В., Обертинська О.В., Костенко І.Г. та ін. Ротавірусна інфекція у дітей України // *Профілактична медицина.* – 2009. – № 2. – С. 34–37.
9. Angel J., Franco M.A., Greenberg H.B. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations // *Nat Rev Microbiol.* – 2007. – **5**(7). – P. 529–539.
10. Vesikari T., Van Damme P., Giaquinto C. et al. European Society for Paediatric Infection Disease/European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Evidence-Based Recommendations for Rotavirus Vaccination in Europe // *J. of paediatric Gastroenterology and Nutrition.* – 2008 (May). – **46**. – P. 38–48.

11. Рекомендовані щеплення (Розділ 4) // Про порядок проведення профілактичних щеплень в Україні та контроль якості й обігу медичних імунобіологічних препаратів: Наказ МОЗ України № 765 від 09.09.2010 р.
12. Дзюблик И.В., Обертинская О.В., Соловьев С.А. и др. Молекулярные методы диагностики в изучении циркуляции различных генотипов ротавирусов среди детей в Украине // Тез. докл. VII Науч.-практ. конф. с междунар. участием "Молекулярная диагностика-2010", 24–26 ноября, 2010. – 4. – С. 32–33.
13. Ruiz-Palacios G.M., Perez-Schael I., Velazquez F.R. et al. Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine Against Severe Rotavirus Gastroenteritis // N Engl J Med. – 2006. – 354(1). – P. 11–22.
14. Соловйов С.А., Трохименко Е.П., Дзюблик И.В. Прогнозирование ожидаемой эффективности применения противоротавирусных вакцин в Украине // Тез. докл. конф. "Биология будущего: традиции и инновации" (Екатеринбург, 25–28 октября 2010 г.). – С. 145–147.
15. Соловйов С.О., Трохименко О.П., Жолнер Л.Г., Шульга О.А. Особливості біотехнології виділення ротавірусів людини в культурі клітин та їх адаптація до умов культивування // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2009. – № 4. – С. 112–117.
16. Соловйов С.О., Трохименко О.П., Обертинська О.В., Жолнер Л.Г. Адаптація до умов культивування *in vitro* ротавірусів людини G1- та G2-генотипів, виділених на території України // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2010. – № 3. – С. 33–37.
17. *Microcarrier Cell Culture – Principles & Methods.* – Amersham: Pharmacia Biotech AB, 1999. – 174 p.
18. *Van Wezel A.L. The Large-Scale Cultivation of Diploid Cell Strains in Microcarrier Culture. Improvement of Microcarriers* // Dev. Biol. Stand. – 1976. – 37. – P. 143–147.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
5 квітня 2011 року