

ИЗЫСКАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ ИНАКТИВАНТОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Еремец Н.К., Еремец В.И., Самуйленко А.Я., Бобровская И.В.,
Матвеева И.Н., Еремец О.В.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАСХН, г. Щелково, Московская обл., Россия

Проведен анализ по применению различных инактивантов при производстве противовирусных вакцин. Определено на основании экспериментальных данных преимущество использования производных азиридинов. Подобраны биомодели для оценки полноты инактивации. Представлены уравнения динамики инактивации вирусов.

Производные азиридинов в настоящее время признаны инактивантами, в наибольшей степени отвечающими требованиям безопасности вакцин и рекомендованы МЭБ к применению. Такие производные азиридинов, как аминоэтиленмин (АЭИ), аминоэтилэтилен (АЭЭИ), бинарный этиленмин (БЭИ), димер этиленмина (ДЭИ) и другие оказались наиболее эффективными при изготовлении вакцин против бешенства, ящура, болезни Ньюкасла. Brown F. et al впервые применили АЭЭИ в 1963 г. и показали его преимущества перед формальдегидом и β -пропиолактоном (БП). В отличие от формальдегида, вызывающего частичное изменение белковой структуры вируса за счет образования поперечных связей в вирусных белках, производные азиридинов оказывали действие только на нуклеиновую кислоту. Так, по данным Doel T.R., Brown F., Graves I. капсиды большинства штаммов вируса ящура (ВЯ) не разрушаются при обработке азиридинами. Инактивирующий эффект, в частности АЭИ, заключался в депуринизации и последующей деполимеризации нуклеиновых кислот. Показано, что инактивация ВЯ имела линейный характер, без «хвостового» эффекта. В практике приготовления противоящурных вакцин из вируса, полученного по разным технологиям, наиболее широкое применение нашел ДЭИ, который впервые использовали Улупов Н.А., Дудников А.И., Гембицкий Л.И. и др. в 1973 г. Так, для инактивации лапинизированного и полученного методом суспензионного культивирования ВЯ оптимальными режимами оказались 0,01-0,02%-ная концентрация ДЭИ; $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; 4-8 ч. экспозиции. В более ранних наших работах определены преимущества ДЭИ перед формальдегидом, БПЛ и метилглиоксалем. Накопленный опыт позволяет рекомендовать производные азиридинов как надежный, стандартный инактивант не только при промышленном производстве противоящурных и антирабических вакцин, но и при разработке новых противовирусных препаратов для сельскохозяйственных животных и птиц. С появлением новых инактивантов (например, теотропина), актуальность выбора инактиванта и совершенствование процесса инактивации, как «критической» стадии в изготовлении биопрепаратов, без сомнения повышается.

Материалы и методы. Использованы вирусы ящура, бешенства, Ауэски, болезни Ньюкасла. Полноту инактивации формальдегидом, ДЭИ, АЭЭИ, БПЛ оценивали на КРС, морских свинках, мышцах-сосунах, первичнотрипсинизированных клетках СП, КрП, БП, перевиваемой линии клеток ВНК 21/13.

Результаты исследований. Определена эффективность инактивирующего агента относительно различных вирусов. Так, например, относительно ВЯ типов A_{22} , шт. 550, O_1 , шт. 1618 и C_1 , шт. 564 культивируемого на эксилантатах эпителия языка КРС эффективность инактивантов оценивали с учетом 3-х основных факторов:

- 1) полная потеря инфекционной активности вируса при строго определенных параметрах (рН, время и температура инактивации);
- 2) максимальное сохранение протективного антигена- компонента 146 S;
- 3) возможность нейтрализации остаточного количества инактиванта (особенно при конструировании многокомпонентных ассоциированных вакцин).

В результате многочисленных экспериментов для проведения крупномасштабно-го производства противовирусных вакцин выбраны формальдегид и ДЭИ. Это обусловлено следующим: налажено промышленное производство препаратов; имеется надежный поставщик и возможность получения крупной партии (исходя из сроков годности), что увеличивает стандартность; совместимость антигенов при конструировании ассоциированных вакцин; наличие средств нейтрализации; относительная дешевизна. Если по формальдегиду есть многочисленная информация, то относительно производных азиридинов, картина иная. Так, анализ поступивших партий ДЭИ показал, что при соблюдении правил ТУ, препарат тем не менее характеризовался широким разбросом показателя массовой доли основного вещества (от 15 до 27 %) и значений рекомендуемой концентрации для полной инактивации вируса болезни Ньюкасла (от 0,1 до 0,15 %). Эти обстоятельства требуют введения жесткого входного контроля поступающих серий ДЭИ и проведения валидации как самого процесса изготовления, так и используемых оборудования и приборов.

При использовании формальдегида кинетика инактивации, например, для ВЯ типа А₂₂ выражается уравнением 3-го порядка: $Y = 6,6 - 0,64t - 0,027t^2 - 0,0004t^3$. Потеря инфекционной активности при использовании ДЭИ относительно того же типа вируса ящура носит линейный характер и выражается уравнением:

$$Y = 7,4 - 0,39t.$$

Изучение динамики инактивации ВЯ типов О, А и С, полученного при культивировании на ЭЭЯ КРС с использованием в составе питательных сред как аминокислот так и ферментативного гидролизата мяса (ФГМ-С), подвергнутого двукратной обработке хлороформом (или в комбинации с производными полигуанидинов) и сепарированию показало, что условия инактивации при $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$; 0,04 % ДЭИ в течение 18-24 ч. гарантировали получение полностью инактивированного ВЯ всех типов. Обеспечение сохранности протективного антигена в течение 10 суток при $+4^\circ\text{C}$ позволило рекомендовать применение более жестких условий инактивации ВЯ (по сравнению с литературными данными) и гарантировать получение инактивированного вируса с сохранением достаточного количества протективного антигена для получения высокоэффективных вакцин.

Выводы. Наиболее перспективным инактивантом при изготовлении моно-, поливалентных и ассоциированных противовирусных вакцин, на наш взгляд, является димер этиленимина (ДЭИ).

Список литературы

1. Бурдов, А.Н. и соавт. Ящур // М., Агропромиздат, 1990, — 450 с. 2. Инфекционная патология животных: в 2-х т. / под ред. Самуйленко А.Я., Соловьева Б.В., Непоклонова Е.А., Воронина Е.С. / М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. — 1811 с. 3. Биотехнология / И.В. Тихонов, Рубан Е.А., Гриднева Т.Н. и др. / СПб.: ГИОРД. — 2008. — 704 с. 4. Вирусы и вирусные вакцины / Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алигер Т.И. / М.: Библионика, 2007, — 524 с.

RESEARCH OF EFFECTIVE INACTIVANTS AT MANUFACTURE OF ANTIVIRAL OF VACCINES

Eremets N.K., Eremets V.I., Samuylenko A. Ya., Bobrovskaja I.V., Matveeva I.N., Eremetz O.V.

All-Russian Scientific Research Technical Institute for Biological Industry, Schelkovo, Moscow region, Russia

The analysis of application of various inactivants at manufacture of antiviral vaccines has been conducted. Advantage of use of asiridin derivatives has been determined on the basis of experimental data. Biomodels for the estimation of inactivation completeness have been selected. The equations of the dynamics of virus inactivation are presented.