DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-2-7
УДК 619:616:998

Основные направления развития производства биопрепаратов для профилактики бешенства животных Main directions of development of production of biopreparations for prevention of animal rabies

Гринь С.А.

Московская область

РЕЗЮМЕ / SUMMARY

Ключевые слова: клетки ВНК-21/13, вирус бешенства штамм "Щелково-51", культуральные вакцины, инновации.

Key words: BHK-21/13 cells, strain of rabies virus "Shchelkovo-51", culture vaccines, innovations

Представлен алгоритм разработки культуральных антирабических вакцин для животных. Применен научный подход к направленной селекции штамма вируса бешенства "Щелково-51" и адаптации его к культуре клеток ВНК-21/13. Инновационные технологические приемы и экспериментальные данные позволили разработать высокоэффективные культуральные инактивированные вакцины против бешенства животных. Производство вакцин освоено на предприятиях страны на современном оборудовании и по международным требованиям к качеству препаратов. Все этапы производства валидированы, специфическая активность выпускаемых вакцин не уступает импортным аналогам. Все разработанные вакцины конкурентоспособны. В статье описаны оригинальные технологические приемы, которые актуальны для создания современных средств профилактики и диагностики.

An algorithm for the development of culture rabies vaccines for animals is presented. The scientific approach to directed selection of the strain of rabies virus "Shchelkovo-51" and its adaptation to the culture of cells BHK-21/13 is applied. Innovative technological methods and experimental data have allowed the development of high-performance culture inactivated vaccines against animal rabies. The production of vaccines was mastered at the enterprises of the country on modern equipment and on international requirements for the quality of preparations. All stages of production are validated, the specific activity of the produced vaccines is not inferior to imported analogues. All vaccines developed are competitive. The article describes original technological methods that are relevant for the creation of innovative means of prevention and diagnosis.

Цель данной статьи – осветить основные этапы работы, показать технологические приемы и инновационные

решения, которые в силу существующего в те годы законодательства не были опубликованы или имелись только краткие сообщения в отраслевых журналах и экспресс-информации. Многие технические решения актуальны и в наше время.

Проведенные поисковые исследования по подбору клеточной системы для репродукции вируса бешенства (ВБ) включали более десятка различных клеток из тканей животных, но наибольшую привлекательность имели клетки перевиваемой линии ВНК-21/13, т.к. они отличались мощным ростовым потенциалом, сравнительной неприхотливостью к питательным средам, способностью быстро приобретать или увеличивать чувствительность к вирусам.

В работе были использованы два клона ВНК-21/13 и ВНК-21/Д7, полученные из цитологических лабораторий НИИ г. Москвы и Московской области. Опыты показали, что при создании определенных условий клетки одинаково размножались в стационарном монослое, на роллерных аппаратах и в суспензии (лабораторных ферментерах). Однако отмечено, что интенсивность размножения клеток в суспензии выше, чем в монослое, что свидетельствовало о технологическом преимуществе суспензионной технологии.

Основой стабильного производства безопасного препарата должна быть стандартизованная и аттестованная культура клеток. С целью стандартизации условий экспериментов и бесперебойного обеспечения необходимым количеством клеток одного пассажа был создан 3-х ступенчатый криобанк клеток ВНК-21/13, выращенных в роллерных аппаратах, т.к. клетки из монослойных культур проявили себя более устойчивыми к замораживанию и лучше сохранялись при консервировании в жидком азоте. Этот прием в последствие был применен при производственном внедрении технологических разработок и масштабировании процессов [1]. Клетки, замороженные на разных ступенях криобанка, практически сохраняли выживаемость на исходном уровне. Через 30 лет хранения в жидком азоте клетки исходного пула восстанавливали ростовые свойства уже через два-три пассажа с жизнеспособностью в пределах 85–95 %. В процессе освоения и усовершенствования технологий на предприятиях, выпускающих культуральные антирабические вакцины, из первоначальной линии клеток ВНК-21/13 (банк ВНИТИБП) получали собственные сублинии клеток (ВНК-21/13-02, ВНК-21/13-13) с новыми заданными технологическими характеристиками. При их депонировании в 2014 г. проводились кариологические исследования на предмет соответствия изначальной видовой принадлежности: в обоих случаях в образцах присутствовала только ДНК сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*) [2]. Это доказывает, что клетки перевиваемой линии ВНК-21/13 в процессе хранения в жидком азоте более 40 лет не утратили своей видоспецифичности.

Наиболее сложную задачу решали по адаптации виру-

Информация об авторах / Information about the authors

С.А. Гринь, член-корр. РАН, доктор биологических наук, и.о. директора ФГБНУ ВНИТИБП, г.Щелково, vnitibp@mail.ru

А.Я. Самуйленко, академик РАН, доктор ветеринарных наук, зам. директора ФГБНУ ВНИТИБП, г.Щелково

Н.М. Пухова, заведующая лабораторией вирусологии, кандидат биологических наук ФГБНУ ВНИТИБП, г.Щелково

Grin S.A., Samuylenko A.Ya., Pukhova N.M.

са бешенства (ВБ) к культуре клеток. В работе использовали ВБ, штамм "Овечий", полученный на 81 пассаже через мозг овец из штамма Пастера. Адаптацию проводили в культуре клеток ВНК-21/13 3-й ступени криобанка. Чтобы ускорить процесс и добиться требуемого увеличения активности вируса был применен метод перемежающих и прямых пассажей по схеме: 1 п (мозг овцы-клетки) – 7 п (мышь-клетки) – 10 п (клетки) – 12 п (мышь-клетки) – 9 п (клетки) – 5 овца-клетки – 8 п (клетки). В итоге к 51 пассажу был получен ВБ, способный стабильно накапливаться в монослое и суспензии клеток ВНК-21/13 до $7,3-8,0 \lg \text{ЛД}_{50}/\text{см}^3$, а в отдельных опытах – $8,4-8,7 \lg \text{ЛД}_{50}/\text{см}^3$. Сроки максимального накопления инфекционности определялись между 2 и 4 сутками. Полученный адаптант ВБ, обладающий антигенной специфичностью и высокой активностью после сублимационного высушивания в защитной среде, был помещен на хранение при -40°C .

В течение последующих 5 лет проводили комплексные исследования биологических свойств ВБ, культивируемого в роллерных, суспензионных и псевдосуспензионных (на микроносителях) условиях. Высокая активность и скорость накопления практически полностью сохранялись на уровне 8 прямых пассажей в роллерном монослое клеток. Стабильным оставалась и иммуногенная потенция, определенная рекомендованным ВОЗ объемным методом NIH, относительно второго международного стандарта, полученного из лаборатории биологических стандартов (Дания, г. Копенгаген). Результаты исследований убедительно свидетельствовали о возможности применения полученного штамма ВБ для промышленного изготовления инактивированных культуральных антирабических вакцин с иммуногенностью, не уступающей международному стандарту.

В 1980 году селекционированный штамм ВБ получил официальное наименование "Щелково-51", был depo-

нирован под №81 во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве ФГБУ "ВГНКИ" и защищен патентом (RU №890591, 12.06.1980). Контрольные исследования, проведенные через 25 лет хранения, показали, что вирус пригоден для изготовления посевного пула и обеспечивает получение высокоэффективного вакцинного сырья с иммуногенностью $7,5-11,7 \text{ ME}/\text{см}^3$ по NIH. Работа с новым штаммом ВБ была регламентирована Техническими условиями (ТУ 10-19-74-89).

Штамм "Щелково-51" был целенаправленно создан для разработки высокоиммуногенных, безвредных, экономичных, культуральных инактивированных антирабических вакцин (жидких и сухих) для иммунизации различных видов животных против бешенства. Полученный штамм обладал способностью накапливаться в высоких титрах в клеточной культуре и большой иммуногенной потенцией: при введении в организм животных индуцировал образование вируснейтрализующих, комплемент-связывающих и преципитирующих антител. Одним из основных технологических признаков этого штамма являлось то, что, репродуцируясь в культуре клеток ВНК-21/13, вирусный материал получали в виде отработанной среды.

В результате многочисленных лабораторных исследований была установлена возможность стабильного получения вирус-содержащего материала в культуре клеток ВНК-21/13 для создания культуральных антирабических вакцин (КАВ) с иммуногенной потенцией на уровне международного стандарта. Первые результаты получения вируса в промышленных масштабах были получены при монослойном культивировании во вращающихся сосудах. Для этого инженерной службой института впервые в стране были изготовлены роллерные аппараты лабораторного и промышленного типа (Свид-во на промышленный образец №12088, 13.05.1980), которые позволили создать промышленную технологию изготовления первой в мире культуральной инактивированной антирабической вакцины для животных. Эта технология по сравнению с мозговыми вакцинами из ВБ, штамм "Овечий", была более высокопроизводительной и экономичной – выход вакцинного материала из одного 5-литрового сосуда в роллерном аппарате был эквивалентен производимому из тканей мозга 3–4 овец [3].

По приказу Главветупра МСХ СССР №75 в ноябре 1984 г. началось активное внедрение КАВ в производство. Вакцина выпускалась в сухом виде с разбавителем (РКАВ) и в форме жидкого препарата с ГОА на Щелковском биокомбинате. В 1995 г. производство вакцины было налажено и во ВНИИЗЖ по патенту ВНИТИБП. К этому времени объем производства вакцины на Щелковском биокомбинате достигло 10 млн. доз в год.

По заданию ГКНТ СССР на разработку отечественного технологического оборудования для культивирования клеток, вирусов и микроорганизмов (биореакторы от 5 до 1000 л, приборы контроля, датчики и др.) в институте была создана гибкая технологическая линия, с использованием

Рисунок 1. Структурно-логическая схема разработки и внедрения культуральных антирабических вакцин из вируса бешенства, штамм "Щелково-51"

Рисунок 2. Основные критерии эффективности универсальной этанол-вакцины против бешенства животных (УНИРЭВ)

Таблица 1. Культуральные инактивированные антирабические вакцины из ВБ бешенства, штамм «Щелково-51», разработанные во ВНИТИБП

Название вакцины	Состав, технология (область применения)	НТД на препарат
РАБИКОВ	Жидкая ГОА –вакцина, роллерная, (для КРС, МРС и лошадей)	ТУ 9384-023-00482915-01
СКИАВ + РКAB	Сухая + растворитель (р-р сапонины) (для крупного и мелкого рогатого скота)	ТУ9384-025-00482915-01 ТУ9384-028-00482915-01
РАБИКАН	Сухая + растворитель (для кошек и собак)	ТУ9384-028-00482915-01
РАБАВАК	Сухая адъювант-вакцина с сапонином, на микроносителях в биореакторах, (для КРС и МРС)	ТУ 9384-035-0048915-03
Вакцина антирабическая для животных (УНИРЭВ)	Жидкая этанол-вакцина, на микроносителях в биореакторах (для КРС, МРС, собак, кошек и др. видов животных)	ПатентRU № 2366457, 10.09.2009. Опытнo-промышлeнный регламент
Сухая ГОА-вакцина	Сухая ГОА-вакцина, суспензионная (для КРС и МРС)	ПатентRU № 2402348, 27.10.2010, Опытнo-промышлeнный регламент
Референс-сыворотка из крови гиперим. быков	Сухая (национальный стандарт), нейтрализующая активность к вирусу бешенства 1серотипа ≥ 10 МЕ/мл	ТУ 9388-132-00494189-05,
Референс-вакцина	Сухая (национальный отраслевой стандарт) с иммуногенной активностью $\geq 1,8$ МЕ/мл	ТУ 10-19-58-89 СТО 00494189-0042-2010 .
Референс-сыворотка из крови гиперим. баранов	Сухая (национальный стандарт), нейтрализующая активность к вирусу бешенства 1серотипа ≥ 20 МЕ/мл	Патент RU №2609766, 02.02.2017.

которой были созданы новые высокоэффективные промышленные технологии изготовления противовирусных препаратов, в том числе антирабических вакцин. Культивирование клеток ВНК-21/13 и ВБ в суспензии и на микроносителях, в том числе ВИ-3, разработанных во ВНИТИБП (RU № 1565025, 19.04.1988), в биореакторах объемом 100 л с автоматизированной системой управления позволило увеличить производительность процесса по сравнению с роллерной более чем в 2 раза и при этом получить стандартную вирусную суспензию с активностью $\geq 1,5$ МЕ/см³. Реакторным способом была получена новая адъювант-вакцина "Рабавак" для крупного и мелкого рогатого скота, которая апробирована в хозяйствах РФ с экономическим эффектом 2,4 млн. руб. на 1 млн. доз. Позднее были разработаны еще более технологичные суспензионные вакцины: сухая вакцина "Рабикан" для кошек и собак и жидкая вакцина "Рабиков" для крупного и мелкого рогатого скота. Экономическая эффективность от внедрения основных разработок ВНИТИБП только в 2004 году (объем 10 млн. доз) составила в сфере производства 15,0 млн.руб. (1,5 руб. на дозу) за счет усовершенствования технологических процессов и в сфере применения 18,0 млн. руб. за счет повышения гарантий качества препарата [4].

С 2006 года культивирование клеток ВНК-21/13 и вируса бешенства, штамм "Щелково-51" осуществляется в суспензии в биореакторах значительно большего объема (1000 л), которые позволяют в кратчайшие сроки получать огромное количество высокоактивного вирус-содержащего полуфабриката для производства сухих и жидких КАВ [5].

В результате на основе ВБ, штамм "Щелково-51" было

разработано более 10 видов культуральных антирабических вакцин, большинство внедрены в производство (см.табл.1).

История создания антирабических вакцин связана с непрерывным их усовершенствованием. Исследования в этом направлении продолжаются более 130 лет. Однако до настоящего времени нельзя назвать антирабическую вакцину, которой можно отдать предпочтение. В связи с общим прогрессом науки и, в частности биотехнологии, а также повышением требований к качеству биопрепаратов и их производству, постоянно требуются новые решения для создания более эффективных, экономичных и безопасных препаратов [6].

В 2007–2010 гг. перед институтом была поставлена задача в целях импортозамещения разработать отечественные стабильные при хранении и высокоиммуногенные для целевых животных КАВ, которые по качественным показателям и соответствию требованиям GMP не уступали бы лучшим импортным образцам.

Для решения поставленных задач были разработаны принципиально новые препараты:

– Универсальная жидкая антирабическая этанол-вакцина "УНИРЭВ" (пат. RU №2366457, 27.02.2008) с иммуногенной активностью $\geq 2,0$ МЕ/см³ и сроком годности более 2-х лет [7]. Вакцина не содержит антибиотиков и тиомерсала. Изготовленные и успешно испытанные опытные серии "УНИРЭВ" в процессе длительного хранения сохраняли индекс иммуногенности, значительно превышающий зарубежные аналоги (табл.2). Кроме этого этанол-вакцина "УНИРЭВ" обладала и другими высокими показателями эффективности (Рис.2);

Таблица 2. Сравнительная оценка иммуногенной активности антирабических вакцин в процессе хранения

Вакцина (страна)	Заявленный срок годности, год	Иммуногенная активность, МЕ/мл	
		начальная	через 11 мес.
Rabisin (Франция)	3	3,0	1,74 - 1,83
Defensor (США)	1,5	2,0	1,45 - 1,5
УНИРЭВ (ВНИТИБП)	2	3,0	2,2 - 2,3

Таблица 3. Антителоиндуцирующая активность сухой ГОА-вакцины в опытах на крупном рогатом скоте (n=6)

Тип вакцины	Активность антител в сыворотке крови вакцинированных животных, МЕ/мл		
	до вакцинации	через 45 дней после вакцинации	через 350 дней после вакцинации
ГОА-вакцина (опыт)	0	4,28±0,45	0,51±0,09
Рабавак (контроль)	0	4,33±0,40	0,09±0,04

– Новая сухая антирабическая ГОА-вакцина для иммунизации крупного и мелкого рогатого скота (пат. RU №2402348, 27.10.2010). Впервые в мире было показано, что гидроокись алюминия, включенная в состав сухой антирабической вакцины в комплексе с адсорбированным на нем инактивированным ВБ, способствовала сохранению специфической активности препарата (ГОА-вакцина при сушке теряла $\leq 5\%$, без ГОА – около 24%) и пролонгации срока циркуляции поствакцинальных антител до уровня 0,5 МЕ/см³, что считается достаточным для защиты животных и человека от бешенства (табл.3). Вакцина предохраняла овец и коз от гибели даже при непосредственном заражении уличным ВБ в мозг в дозах, превышающих летальную. Следовательно, применение сухой ГОА-вакцины позволит с большей эффективностью защитить животных от бешенства [8].

Со времени полевых испытаний, периода внедрения и массового применения КАВ до настоящего времени не было зарегистрировано ни одного случая осложнения после вакцинации или заболевания привитых животных бешенством, не поступило ни одной рекламации.

Литература

1.Иванов В.С. Бешенство животных: экспериментально-теоретическое обоснование разработки, производства, применения культуральных инактивированных вакцин и новые подходы к проблеме экстренной

защиты ЦНС от возбудителя заболевания: докл. дис...докт.вет.наук. - Щелково, Щелково. - 2001. - 49 с.

2. Патент RU № 2558253,01.06.2015. "ВНК - 21/13-13 перевиваемая монослойно-суспензионная сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка, предназначенная для репродукции вируса ящура и вируса бешенства".

3.Кузнецов П.П., Иванов В.С., Кузнецова С.В. Антирабическая вакцина из фиксированного штамма вируса бешенства, адаптированного к перевиваемой линии клеток ВНК-21 // 21-й Всемир.вет.конгресс. - М., - 1979. - секция 7,3. - С.38.

4.Пухова Н.М., Самуйленко А.Я., Еремец В.И. и др. Основные направления разработки и внедрения антирабических вакцин из шт.Щелково-51. Ветеринарна медицина, вып.95.Міжвідомчий тематичний науковий збірник. - 2011.- С.175-177.

5.Крюкова Е.Н., Самуйленко А.Я., Мельник Р.Н. и др. Параметры суспензионного культивирования культуры клеток внк-21/13-13 в масштабах биотехнологического производства//Ветеринария Кубани. - 2016. - 3. - С.6-9.

6.Пухова Н.М., Самуйленко А.Я., Еремец В.И. Использование достижений биотехнологии в разработке антирабических вакцин // Актуальная биотехнология. - 2015. - №3 (14). - С.91-92.

7.Пухова Н.М., Самуйленко А.Я., Еремец В.И. и др. Универсальная антирабическая вакцина для животных и критерии ее эффективности // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2011. - Т.13, №5 (3). - С.175-177.

8.Пухова Н.М., Еремец Н.К. Антителоиндуцирующая активность а организме животных, иммунизированных сухой антирабической ГОА-вакциной // Ветеринария и кормление. - 2012. - №6. - С.24-25.