



**Original Article: CREAZIONE DI UNA CULTURA VIVENTE VACCINI CONTRO
L'INFLUENZA PANDEMICA**

Citation

Nechaeva E.A., Radaeva I.F., Sen'kina T.Yu., Nechaeva Yu.S., Rudenko L.G. Creazione di una cultura vivente vaccini contro l'influenza pandemica. *Italian Science Review*. 2014; 9(18). PP. 69-75.
Available at URL: <http://www.ias-journal.org/archive/2014/september/Nechaeva.pdf>

Authors

E.A.Nechaeva, The State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Russia.
I.F.Radaeva, The State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Russia.
T.Yu.Sen'kina, The State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Russia.
Yu.S.Nechaeva, The State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Russia.
L.G.Rudenko, Institute of Experimental Medicine, Russia.

Submitted: August 25, 2014; Accepted: September 5, 2014; Published: September 21, 2014

Infezione influenzale è unica tra le malattie virali e rimane una sfida importante per la maggior parte dei paesi del mondo. L'influenza è molto diffusa, e la prevalenza è stimata varia ogni anno dal 5 al 10% degli adulti e il 20 al 30% dei bambini. La prospettiva di combattere il vaccino antinfluenzale è riconosciuto dagli esperti di tutto il mondo, che si riflette nelle decisioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), le raccomandazioni degli Stati Uniti della commissione per le pratiche di immunizzazione ed i documenti ufficiali del Ministero della Salute della Russia. Oggi in Russia, registrato, prodotto e applicato nella pratica, vivere e vaccini antinfluenzali inattivati. Negli ultimi anni, l'interesse è cresciuto nel vaccino antinfluenzale dal vivo. Prima di tutto, questo è dovuto al fatto che l'OMS ha riconosciuto i vantaggi di vaccino influenzale vivo per inattivato in caso di una situazione pandemica. Vaccini antinfluenzali vivi sono compresi nel piano globale dell'OMS per prepararsi ad una pandemia, perché stimolano tutte le parti del anti-influenzale immunità [1, 2]. Altri

vantaggi di vaccini vivi - via intranasale di somministrazione, la possibilità di rapidi sviluppi di grandi quantità di materiale virale, la velocità di vaccinazione di massa a causa della semplicità della sua applicazione, e la capacità di proteggere contro le varianti deriva antigenica del virus dell'influenza [3].

In Russia registrato due vaccini pandemici vivi: A / 17 / anatra / Potsdam / 86/92 (H5N2) e A / 17 / California / 2009/38 (H1N1) [4, 5]. In Russia e negli Stati Uniti per la produzione di vaccini vivi utilizzando embrioni di pollo, e questo farmaco non è raccomandato per le persone con sensibilità alle proteine dell'uovo, che riduce significativamente il numero di persone da vaccinare contro l'influenza. Quando si utilizza il vaccino influenzale vivo prodotta in linee cellulari MDCK con un mezzo privo di siero sono esclusi reazione allergica alle proteine di uova di gallina, come la possibilità di infezioni e agenti stranieri perché la cultura di cellule MDCK è stato certificato secondo i requisiti dell'OMS [6].

L'obiettivo principale della ricerca è stato quello di sviluppare una tecnologia di produzione pilota di cultura dal vivo del vaccino contro l'influenza pandemica basato sul ceppo adattato a freddo del virus dell'influenza A / H1N1, l'ottenimento di lotti di produzione sperimentali del vaccino e la loro certificazione in conformità con i requisiti per i preparati immunobiologici mediche.

SPERIMENTALE

Freddo adattato reassortant ceppo del vaccino è stato preparato A / 17 / California / 2009/38 (H1N1) presso il Dipartimento di Virologia. A.A.Smorodintsev FGBI "Istituto di Medicina Sperimentale" RAMS nello sviluppo di embrioni di pollo (SEP) di riassortimento classica. La fonte dei geni interni utilizzando adattato freddo (ca) e sensibili alla temperatura (TS) attenuazione donatore A / Leningrad / 134/17/57 (H2N2) [7] ha permesso per la preparazione di ceppi vaccinali di vaccino influenzale vivo (VIV) per tutte le età in Russia che vanno dai 3 anni di età. Come un genitore "selvaggio" ceppo usato pandemico A / California / 07/2009 (H1N1), raccomandato dalla OMS per la preparazione di vaccini contro la nuova influenza pandemica da virus A (H1N1) 2009 [8]. Che la composizione del genoma vaccino reassortant formula genoma 6: 2 e stabilità delle mutazioni attenuanti è stata determinata con il metodo di [9] e confermato mediante sequenziamento. La formula del genoma del ceppo del vaccino / 17 / California / 2009/38 (H1N1) soddisfa i requisiti dei ceppi di vaccino influenzale live: i geni che codificano per proteine di superficie di emoagglutinina non glicosilata (HA) e neuraminidasi (NA), appartengono al virus pandemico e dei geni che codificano proteine interne (PB2, PB1, PA, NP, M, NS), appartengono attenuazione dei donatori. [5]

Per lo sviluppo della tecnologia di produzione vaccino utilizzato ceppo produzione del virus dell'influenza ottenuto dopo un passaggio del ceppo del vaccino A

/ 17 / California / 2009/38 (H1N1) in coltura cellulare MDCK. Il ceppo di produzione è stato caratterizzato da autenticità e l'attività emoagglutinanti specifica, la sterilità e la mancanza di tossicità. L'attività specifica del ceppo produzione di virus influenzale è stato determinato secondo la procedura [10] è stato calcolato dalla Reed e Muench metodo [11] ed espresso come $lg\ DIU_{50} / 0,2\ ml$.

Come il substrato cellulare utilizzato trapiantato linea di cellule di rene di adulto normale cocker spaniel femmina dalla collezione di colture cellulari MDCK FBUN SRC VB "Vector". [12]

Usato per la crescita media di coltura cellulare MEM di Eagle (Stato unitario Enterprise ". Istituto di poliomielite e Viral Encefalite Chumakov" RAMS, Russia) e siero fetale bovino (Invitrogen, USA); virus utilizzato per la produzione di terreno privo di siero cultura per la coltivazione di cellule MDCK e Vero ("Vector" FBUN SRC VB, Russia); tripsina (Sigma, USA); microcarrier da polistirene modificato (Solohill, USA); stabilizzatore (MP Biomedicals, Stati Uniti d'America, Panreac, Spagna) [13].

Coltura di cellule è stata effettuata in bioreattori del recipiente di coltura con un volume di 2 litri ("Multigen", USA) e 10 l ("Biostat", Germania). Concentrazione cellulare Seeding era $(3-4) \cdot 10^5$ cellule in 1 ml di terreno di coltura. Le cellule sono state coltivate in bioreattori in un mezzo MEM nutriente Eagle supplementato con 5% di siero fetale bovino e concentrazione microcarrier in (10-14) g / l, il tempo di funzionamento del virus - senza siero medio in presenza di tripsina ad una concentrazione di (2-4) mg / ml [13]. Morfologia cellulare giornaliera è stata valutata, il materiale cella uscita [14], il materiale contenente il virus è stato campionato per determinare l'attività specifica del virus dell'influenza. L'attività specifica di cariche virali contenenti determinate mediante titolazione in embrioni di pollo [10] ed espressi come $lg\ DIU_{50} / 0,2\ ml$. Dopo 3-5 giorni. spese di

virus contenenti derivati da bioreattori è stato liberato dai detriti cellulari mediante filtrazione attraverso membrana di nitrocellulosa c 0,65 micron dimensione dei pori, è stato aggiunto uno stabilizzatore, pieno in fiale da 0,2 ml e sottoposto a liofilizzazione (liofilizzazione installazione TG 16-50, Germania) in uno standard modalità per 48 h. Dopo l'essiccazione, il materiale della fiala è stato riempito con argon e sigillato.

La serie risultante della formulazione del vaccino, noto come "Vector-Flu", è stata monitorata l'autenticità e l'attività specifica emoagglutinanti [10], sterilità, assenza di tossicità anormale, proprietà fisico-chimiche, pH [15], il DNA cellulare residua [16], contenuto solfato di gentamicina [17], la perdita all'essiccamento [18]. Per determinare l'autenticità del siero specifico tipo omologo utilizzato per simil-influenzali HAI TU da 938941-00-44429427-2008 e il kit diagnostico per l'influenza HAI (OOO "Azienda produttrice di prodotti diagnostici, San Pietroburgo, Russia).

Risultati e discussione

Il ceppo del vaccino è stato depositato in FGBI "NTSESMP" Russian Ministero della Salute. Secondo il passaporto, l'attività specifica del ceppo vaccino liofilizzato A / 17 / California / 2009/38 (H1N1) era 6,5 lg DIU50 / 0,2 ml, attività emoagglutinanti - 01:32 con 1% eritrociti di pollo, emoagglutinina e neuraminidasi del virus erano identici A / California / 07/2009 (H1N1) [9]. Innocuità reassortant dimostrato per somministrazione sottocutanea e intraperitoneale a topi e cavie mediante iniezione intraperitoneale, nonché i risultati di studi clinici [5].

Vivere la cultura influenza vaccino "Vector-Flu" è stato preparato sulla base di coltura cellulare MDCK. In precedenza FBUN SRC VB "Vector" sono stati creati calcolato e conservato a temperatura di semina azoto liquido e banche di cellule MDCK lavoro. Le banche sono qualificati in conformità con i requisiti

nazionali e internazionali che hanno ricevuto la decisione del Comitato preparati immunobiologici MoH per usarli nella produzione di preparati immunobiologici [12].

Cellule MDCK sono state coltivate in bioreattori ad una temperatura di $(37 \pm 0,5) ^\circ$. Deposizione delle celle microcarrier è stata condotta per 12 ore in un lotto di agitazione (5 min di agitazione, 10 min pausa) poi inclusi costante agitazione. Entro 12 ore, le cellule stabilirono, appiattimento e fissati sulla superficie di microcarriers in 2-3 giorni formate un monostrato su ogni singola particella. Quando inoculato nel bioreattore $(3-4) \cdot 10^5$ cellule / ml dopo 2-3 giorni il numero di cellule aumentato di 2-3 volte. Il metodo utilizzato nella cultura bioreattore su microcarriers combina gli elementi del monostrato e sospensioni crescita delle cellule, in cui le condizioni di coltura sono uniforme su tutto il volume del recipiente con una popolazione di cellule ad alta densità.

Dopo 2-3 giorni di media nave bioreattore è stato rimosso, le cellule sono state lavate tre volte con terreno privo di siero cultura, sono stati aggiunti tramite l'inoculazione di materiale contenente il virus basata, 01-,001 DIU₅₀ di virus per cellula. Virus adsorbimento è stata eseguita per 1 ora con agitazione occasionale, poi la coltura è stata pompata nel recipiente bioreattore senza siero medio, e tripsina ad una concentrazione di (2-4) ug / ml, incluso agitazione costante e continuo coltura delle cellule infette per 3-5 giorni, mantenendo velocità rotazione dell'agitatore (70 ± 2 giri / min), il pH (7,0-7,4) e temperatura ($33 + 1) ^\circ$. 3-5 di notte è stata ricevuta la quantità massima di virus, l'attività specifica degli oneri virus contenenti era 7,8-8,8 lg DIU50 / 0,2 ml, attività emoagglutinanti - 1: 64-1: 128. Oneri contenente il virus raccolti in un contenitore sterile nel recipiente di coltura è stata caricata con una porzione di mezzo fresco pari al volume di fusione del liquido contenente il virus. 3-5 di notte raccolte seconda raccolta contenente il virus.

Per ottenere una forma liofilizzata degli oneri virus vaccino contenente ottenuti da fermentatori sono stati raggruppati in un contenitore sterile, sottoposti a filtrazione attraverso filtri di nitrocellulosa con dimensione dei pori di 0,65 micron, sono stati aggiunti stabilizzatore [19] e dispensati in fiale, 0,2 ml, e liofilizzato in una modalità standard, per 48 h. Dopo l'essiccazione, il materiale della fiala è stato riempito con argon e sigillato. In questo lavoro, si è riscontrato che l'introduzione dello stabilizzatore consente di mantenere l'attività specifica del virus dell'influenza sia durante la liofilizzazione e stoccaggio. Stick-sull'etichetta sul flacone con il nome e la dose di fiale di vaccino sono stati collocati in una confezione di cartone, poi passò allo stoccaggio modale.

In precedenza è stato dimostrato che i virus influenzali isolati in origine CEE non richiedono un adeguamento supplementare per coltura cellulare MDCK, come ceppi vaccinali reassortant sono preparati sulla base del donatore attenuazione locale - A / Leningrad / 134/17/57 (H2N2) e B / URSS / 60/69. Questo è vantaggioso in quanto la coltura cellulare MDCK come substrato per la coltura e ceppi del vaccino [20]. Nel nostro lavoro è stato anche accertato che il virus rapidamente adattato alle nuove substrati cellulari e ha raggiunto i titoli massimi uguali 7,8-8,8 lg DIU₅₀ / 0,2 ml in 1-2 passaggi. Molteplicità ottimale di infezione è stato pari a 0,01-0,001 DIU₅₀ di virus per cella, che è coerente con i dati ottenuti in precedenza [21].

Sulla base del progetto di ricerca sono stati sviluppati Farmacopea articolo aziendali e prova regolamenti Oda № 05664012-005-10 la produzione di vaccini contro l'influenza cultura viva (Vector-Flu), liofilizzato per soluzione per somministrazione intranasale, che sono state esaminate da FGBI "NTSESMP" russo Ministero della Salute e utilizzato in futuro per la produzione di lotti di

produzione sperimentali di vaccino contro l'influenza pandemica "Vector-Flu".

Secondo la tecnologia sviluppata è stata ottenuta sperimentalmente-3 lotti di produzione di un vaccino basato sul virus dell'influenza vaccino A / 17 / California / 2009/38 (H1N1), che si è svolta nel controllo del laboratorio di produzione e OPF SRC VB "vettore" per la conformità con i requisiti normativi. Caratteristiche di produzione sperimentale di lotti vaccino è indicato nella tabella 1 vaccino ha la forma di una massa amorfa di colore giallo pallido al marrone chiaro, sciolto entro 30-36 secondi. quando incorporato in una fiala da 0,5 ml (una dose) di acqua distillata agitando. Allo scioglimento del vaccino ha la forma di una luce marrone giallo o luce liquido trasparente di colore senza sedimenti e inclusioni, il pH era 6,90-6,94. Perdita all'essiccamento del vaccino è stata dello 0,3%. Nel determinare l'autenticazione è stato dimostrato che il vaccino ha interagito con il siero omologa specifico e non interagire con sieri eterologhi di altri tipi e sottotipi di virus influenzale. I campioni di vaccino contro l'influenza della cultura dal vivo erano sterili, micoplasma e virus estranei. L'attività specifica del virus influenzale nel vaccino è stato (6,63 - 6,8) lg DIU₅₀ / 0,2 ml. Nel test di "invecchiamento accelerato" rispetto al titolo del virus nel vaccino e dei campioni iniziali dei campioni riscaldati per 7 elementi ad una temperatura di (35-37) ° C, rientrano in attività è stato meno di 1 lg DIU₅₀ / 0,2 ml, che conferma la stabilità termica del vaccino [22]. Il DNA cellulare residua è inferiore a 10 nanogrammi per dose di vaccino che soddisfa i requisiti dell'OMS per i medicinali, in cui le cellule animali, produzione di un substrato cellulare immortalato usando [23]. Serie vaccini sono stati in controllo FGBI "NTSESMP" Russian Ministero della Salute, che sono state confermate dai dati ottenuti in precedenza sotto il controllo dei lotti di vaccino nel OPF SRC VB "Vector".

Più tardi ha ricevuto la serie vaccino sono stati utilizzati per studi

preclinici, che hanno mostrato la sicurezza, l'immunogenicità del farmaco.

Così, come risultato della ricerca è stato sviluppato in Russia vaccino contro l'influenza pandemica cultura della ricerca e la tecnologia di produzione industriale "Vector-Flu". Ricevuto 3 lotti di produzione sperimentali del vaccino, che ha reagito con il siero specifico tipo omologa erano sterile, aveva una specifica attività di (6,33-6,80) lg DIU₅₀ / 0,2 ml, il contenuto di DNA cellulare residua, e altri. Indicatori studiati conformità con i requisiti normativi.

Utilizzando la tecnologia di vaccino coltura cellulare di produzione certificata ha un innegabile vantaggio, in primo luogo a causa della loro capacità di mantenere stabile durante i passaggi genetici e caratteristiche biologiche intrinseche nella cultura originale. Si è anche dimostrato che il virus vaccino influenzale A / 17 / California / 2009/38 (H1N1) in in 1-2 passaggi adattati ai nuovi substrati cellulari ed è in grado di replicare in titoli elevati in coltura cellulare MDCK in terreno privo di siero in presenza di tripsina. Sostituzione nella produzione di vaccino influenzale nella cultura cellule embrionali di pollo per evitare reazioni allergiche a immunizzazione di persone che sono allergiche alle proteine di uova di gallina. Inoltre, la cultura produzione di vaccini è autonomo e più conveniente, poiché con un solo embrione può ottenere 10 dosi di vaccino antinfluenzale dal vivo, e per la produzione di 70 mila dosi di vaccino, 7000 embrioni di pollo. La stessa quantità di vaccino può essere ottenuto da un singolo 10 litri bioreattore a operare su tecnologia vaccino sviluppato da noi.

Utilizzare per la produzione del virus dell'influenza in libera-siero di media cultura bioreattori che non contengono prodotti animali o per ridurre le possibili reazioni allergiche al vaccino e per evitare la contaminazione da parte di virus estranei, micoplasma e prioni che possono essere presenti nel siero dei feti bovini. L'uso di sementi certificate e le cellule del funzionamento delle banche si sono

impegnati allo stoccaggio alla temperatura dell'azoto liquido nella raccolta di colture cellulari FBUN SRC VB "Vector", consentirà per un paio di decenni per garantire la produzione di materiale standard cell vaccino contro l'influenza della cultura dal vivo. Inoltre, la produzione del vaccino sarà più stabile e tecnologicamente avanzati dovuto al passaggio al ciclo chiuso di produzione.

References:

1. 2012. Influenza vaccines: WHO position paper, November 2012. p. 461-476.
2. World Health Organization. Initiative for Vaccine Research (IVR). Options for Live Attenuated Influenza Vaccines (LAIV) In the Control of Epidemic and Pandemic Influenza 12-13 June 2007.
3. Grigorieva E.P., Drinevsky V.P., Doroshenko E.M., Desheva Yu.A., Erofeeva M.K., Maksakova V.L., Rudenko L.G. 2009. Effectiveness of live influenza reassortant vaccine in the circulation of drift variants of influenza virus. P.45-53.
4. Rudenko L., Desheva J., Korovkin S., Mirinov A., Rekestin A., Grigorieva E., Donina S., Gambaryan A., Katlinsky A. 2008. Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant H5 vaccine (phase I -II clinical trials). Influenza and other Respiratory viruses. P.203-209.
5. Rudenko L., Kiseleva I., Mironov A., Naikhin A., Larionova N., Bushmenkov D. 2011. Live attenuated pandemic influenza vaccine: Clinical studies on A / 17 / California / 2009/38 (H1N1) and licensing of the Russian-developed technology to WHO for pandemic influenza preparedness in developing countries. V.29.
6. Hendon Yu.Z., Markushin S.G., Akopova I.I., Koptyaeva I.B., Nechaev E.A., Mazurkova N.A., Radaeva I.F., Kolokoltsov T.D. 2005. Further development of the culture (MDCK) live cold-adapted influenza vaccine: the cultivation of vaccine strains in industrial fermenters. Problems of Virology. P. 4-9.
7. Alexandrova G.I., Klimov A.I. 1994. Live vaccine against influenza. 151p.

8. World Health Organization. Characteristics of the emergent influenza A (H1N1) viruses and recommendations for vaccine development.
9. Kiseleva I.V., Voeten J.T.M., Teley L.C.P., Larionov N.V., Dubrovin I.A., Berdygulova E.A., Heldens J.G.M., Rudenko L.G. 2011. Analysis of the genome composition of strains of seasonal and pandemic influenza vaccine live. P.29-36.
10. Methods for determination of quality of immunobiological preparations for the prevention and diagnosis of influenza.
11. Reed L.J., Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Vol. 27. P. 493-497.
12. Radaeva I.F., Kolokoltsov T.D., Nechaev E.A., Mazurkova N.A., Ilina T.V., Getmanova T.N., Boltueva L.S., Graphodatsky A.S., Hendon Yu.Z., Petrushuk E.M. 2005. Creation and certification of continuous banks of MDCK cells for the production of influenza vaccine. Problems of Virology. P. 43-46.
13. E.A. Nechaeva, Senkina T.Yu., Radaeva I.F., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Zilina N.V., Drozdov I.G. 2011. A method of producing a live culture influenza virus vaccine.
14. L.A.Tarasevicha. 2011. Certification of continuous cell cultures. Guidelines. "Health Ministry of Russia, p.65.
15. 2007. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 697 p.
16. 1998. Methods of control of medical immunobiological preparations administered to people. Information and Publishing Center Russian Ministry of Health, 128p.
17. 1990. State Pharmacopoeia of the USSR. Physico-chemical, chemical, physical and immunochemical methods to control medical immunobiological preparations.
18. Sandakhchiev L.S., E.A. Nechaeva, Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Kolokoltsov T.D., Mazurkova N.A., Vilesov A.D., Stankevich R.P., Isidorov R.V. A method of producing a microencapsulated form of the live virus vaccine.
19. Alexandrova G.I., Kiseleva I.V., Naumenko Z.S. 1999. Madin-Darby canine kidney cell line is a suitable substrate for manufacturing live influenza vaccine. P.215.
20. Nechaeva E.A., Mazurkova N.A., Gendon Yu.Z., Kolokoltsova T.D. 2004. New Technology for Producing Live Influenza Vaccine. Bioprocess International. P. 52-55.
21. 2003. Guidelines: determination of stability of industry standard samples (CCA) and other MIP accelerated method. 8p.
22. 2005. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biological.

Tabella 1

Caratteristiche dei lotti di produzione sperimentali di vaccino cultura live "Vector-Flu"

Vaccino di controllo dei parametri	Номер серии вакцины		
	1	2	3
Numero di flaconi in serie	1506	853	846
Attività specifica, lg DIU ₅₀ / 0,2 ml	6,80	6,63	6,63
autenticità	interagisce con il siero specifico tipo omologa	interagisce con il siero specifico tipo omologa	interagisce con il siero specifico tipo omologa
sterilità	sterile	sterile	sterile
Nessun virus, micoplasmi stranieri	corrisponde	corrisponde	corrisponde
Perdita per essiccamento,%	0,3	0,3	0,3
Tempo Dissolution, min	0,5	0,5	0,6
Il cellulare DNA ng / dose di residuo	<10	<10	<10
Tossicità anormale negli animali da laboratorio	non tossico	non tossico	non tossico
Il contenuto di solfato di gentamicina	non rilevato	non rilevato	non rilevato
zione restaurato pH del farmaco	6,90	6,91	6,94