

Список использованной литературы

1. Красочко, П.А. Изучение эффективности применения гипериммунной сыворотки крови для лечения и профилактики вирусных пневмоэнтеритов у телят / П.А. Красочко, В.А. Машеро // Ветеринарная наука – производству: научные труды; редкол.: А.А. Гусев [и др.]. – Минск, 2007. – Вып. 39. – С. 160 – 168.
2. Красочко, П. Специфическая профилактика вирусных энтеритов телят / П. Красочко, М. Понаськов // Ветеринарное дело (Минск). – 2019. – № 7. – С. 22-25. – EDN SUUYSI. Сравнительная эффективность инактивации вирусов-возбудителей пневмоэнтеритов телят / П.А. Красочко, И.А. Красочко, В.А. Машеро [и др.] // Ученые записки / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2003. – Т. 39, ч. 1. – С. 63 – 64.
3. Сывороточные и вакцинные препараты для профилактики и терапии инфекционных болезней животных / Е. В. Сусский, П. А. Красочко, А. П. Медведев, А. А. Вербицкий. – Армавир, 2013. – 338 с. – EDN YIQELL.
4. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней : практическое пособие / П. А. Красочко, В. В. Максимович, В. А. Журба [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 368 с. – ISBN 978-985-7205-56-1. – EDN XWRHGX.

УДК 619:615.371

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ВАКЦИНЫ «БЕЛКОВИДВАК» ПРОИЗВОДСТВА ЦЕХА МЕДИЦИНСКИХ ВАКЦИН ОАО «БЕЛВИТУНИФАРМ»

Кулешов Д.Б., Машеро В.А., Чижевский В.С.

ОАО «БелВитунифарм», г. Витебск, Республика Беларусь

Аннотация. В статье приведены этапы создания отечественной вакцины является знаковым для Республики Беларусь. В итоге в нашей стране, появился свой инактивированный цельновиральный препарат для профилактики коронавирусной инфекции «БелКовидВак».

Ключевые слова. Валидация, монослой, БелКовидВак, вирус.

IMPROVEMENT OF THE MANUFACTURING TECHNOLOGY OF THE BELKOVIDVAK VACCINE PRODUCED BY THE MEDICAL VACCINE WORKSHOP OF JSC BELVITUNIFARM

Kuleshov D.B., Mashero V.A., Chizhevsky V.S.
JSC "BelVitunifarm", Vitebsk, Republic of Belarus

***Abstract.** The article describes the stages of creating a domestic vaccine, which is a landmark for the Republic of Belarus. As a result, our country has its own inactivated whole-virion drug for the prevention of coronavirus infection "BelKovidVak".*

***Keywords.** Validation, monolayer, protein quake, virus.*

Введение. ОАО «БелВитунифарм» – высокотехнологичное предприятие по производству ветеринарных препаратов, занимающее одну из лидирующих позиций в биологической промышленности Беларуси и странах СНГ. На предприятии открыт первый в своем роде цех по выпуску опытно-промышленных серий вакцины против COVID-19 в Республике Беларусь. Основываясь на первоначальный опыт в производстве ветеринарных препаратов специалистами ОАО «БелВитунифарм», удалось спроектировать цех согласно техническому заданию, учитывая опыт коллег из ближнего зарубежья таких как Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова и др. Приходилось самостоятельно принимать технические решения в соответствии с требованиями GMP.

Основная часть. Сложность которую пришлось решать – работа с 3-й группой риска патогенности. В Республике Беларусь есть опытные лаборатории с данной группой риска патогенности, но отсутствуют таковые производства.

Было проведено обучение персонала работы 3-й группой риска патогенности в соответствии с GMP. Опыт работы на ветеринарном производстве помог быстро и эффективно освоить данную сферу работы;

Проведена адаптация лабораторной технологии по выпуску медицинских вакцин на производстве, сохранив повторяемость технологического процесса и качество данного препарата, местами его улучшив.

По результатам, полученным в ходе наработки технологии, которая получена путем передачи от РНПЦ эпидемиологии и микробиологии на ОАО «БелВитунифарм» и РУП «Белмедпрепараты» отработана технология производства современного биопрепарата. На производственной площадке, в цехе по выпуску медицинских вакцин ОАО «БелВитунифарм», провели работы по адаптации технологического процесса по части производства и контроля

качества, (цех по выпуску медицинских вакцин) и выпустили 3 опытно-промышленные (валидационные) серии.

Произведена разработка и адаптация требований стандартных операционных процедур и ТИ, в части процесса производства и контроля качества на производственной площадке, каждый из которых заслуживает отдельного внимания.

Перед производством инженерных опытно-промышленных (валидационных) серий были проведены работы по квалификации оборудования, помещений и других инженерных систем, а также валидация технологического процесса на опытно-промышленных сериях. Уже в январе 2023 года была выпущена первая инженерная серия вакцины против коронавирусной инфекции вызываемой вирусом SARS-Cov-2, цельновирионная, инактивированная, а в марте этого года первая опытно-промышленная серия. К концу 2023 года в Республике Беларусь завершились клинические испытания отечественной вакцины против COVID-19.

Создание отечественной вакцины является знаковым для Республики Беларусь. В итоге в нашей стране, появился свой инактивированный цельновирионный препарат для профилактики коронавирусной инфекции «БелКовидВак». Вакцина зарегистрирована в Республике Беларусь ведомственным Центром экспертиз и испытаний в здравоохранении.

При трансфере технологии с РНПЦ «Эпидемиологии и микробиологии» производства отечественной вакцины «БелКовидВак», специалистами предприятия было адаптировано производство лекарственного препарата для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-COV-2, цельновирионной, инактивированной. Сохранив повторяемость и качество данного препарата, местами его улучшив. Специалисты получили колоссальный опыт, при накоплении вирусного материала SARS-COV-2 в биоферментёрах на микроносителях. Накопление вирусного материала дало толчок не только сотрудникам цеха, но и всему предприятию, взглянуть на свою работы с другой стороны, что привело к усовершенствованию технологии выпускаемого продукта. В настоящее время существуют следующие виды клеток по способу культивирования.

Монослойные (адгезивные) могут расти только прикреплённые к какому-нибудь субстрату. Их делят на стационарные и роллерные.

Суспензионные растут в виде суспензии одиночных клеток в жидкой питательной среде.

Псевдосуспензионное культивирование-комбинация двух способов культивирования (поверхностно-зависимые клетки выращивают с помощью технологии суспензионных культур).

Сотрудниками предприятия была предложена технология псевдосуспензионного культивирования - «микроносителей».. Суть ее заключается в том, что клетки прикрепляются и размножаются на поверхности полимерных шариков-частиц «микроносителей» (МН), которые содержатся в суспензии с помощью перемешивающего устройства, например мешалки. На одной частице МН диаметром 160—230 мкм может поместиться 350-630 (или в среднем 460) клеток. В одном мл среды можно суспензировать несколько тысяч частиц микроносителя. Клетки прикрепляются к поверхности частиц МН и размножаясь, образуют сплошной монослой на каждом отдельном МН.

Культивирование на микроносителях делает возможным практическое получение высокоурожайного культивирования клеток, зависящих от закрепления. Cytodex 1 был специально разработан для культивирования широкого спектра клеток животных в культуральных объемах от нескольких мл до более чем 6000 Л. Использование Cytodex в простых системах для культивирования суспензий обеспечивает выход нескольких миллионов клеток на мл. Микроноситель полученный путем замены сшитой декстрановой матрицы положительно заряженными группами DEAE (Диэтиламиноэтилцеллюлоза), распределенными по всей матрице, являются микроносителями общего назначения. Культивирование вируса проводилось на современном биоферментёре компании BioTechno Group на 15 литров.

Каждое производство начинается с подготовительных работ, которым нужно относиться с особым вниманием. Стеклоянная и пластиковая посуда, используемая в производстве, не должна содержать бактериальные эндотоксины в количествах, превышающие определённые показатели предъявляемых требований согласно спецификациям. На предприятии ОАО «БелВитунифарм» разработаны методы контроля качества, сотрудниками ОКК и работниками РНПЦ «Эпидемиологии и микробиологии», как промежуточной продукции, так и поступающей на склад сырья и материалов на наличие отклонений от спецификаций. Перед началом технологического процесса микробиолог ОКК осуществляет отбор проб с поверхностей оборудования, смывы с рук и одежды персонала для проведения микробиологического контроля. Проводится ежедневный отбор технологических сред и мониторинг чистых помещений на наличие частиц в воздухе согласно графику.

Используется питательная среда Д2мем, которая лишена посторонних контаминантов (бактерий, грибов). Содержит L-глутамин, феноловый красный. Содержание глюкозы 4,5 г/л. Раствор Версена применяют для промывки монослоя и трипсинизации культуры клеток, используют раствор Версена производства ОАО «БелВитунифарм» согласно ТИ. Раствор Хенкса – представляет собой прозрачную жидкость красного цвета, без опалесценции и

осадка, нетоксичная по отношению к клеточным культурам, рН $7,2\pm 0,3$. Применяют для ополаскивания монослоя культуры клеток от остатков белков сывороточного происхождения.

Реконсервирование культуры клеток линии Vero E6 проводили с использованием питательной ростовой среды ДМЕМ, содержащей 10 % эмбриональную телячью сыворотку, с последующим масштабированием культуры клеток Vero E6, на роллерных флаконах в течении 3-5 суток, до образования сплошного монослоя. Рассев культуральной клеточной суспензии линии Vero E6 осуществляли путем внесения необходимого объема суспензии в культуральную посуду с питательной ростовой средой ДМЕМ с 10 % фетальной сывороткой крупного рогатого скота (КРС). При передачи культуру клеток на заражение отбирали роллеры с сформированным монослоем на 90% и выше.

Подготовленные микроносители загружали в биоферментер (1-5 г/л). Посевная концентрация клеток, а также условия культивирования на МН в первые часы в значительной степени определяют оптимальные параметры для пролиферации и максимального накопления клеток. Суспензию культуры клеток линии Vero E6 (концентрация от 50 – 200 тысяч клеток на мл), ростовую питательную среду через порты биоферментера в таком количестве, чтобы покрылись нижние лопасти мешалки. Параметры культивирования: температура 37,0 °С, 80 об/мин, 50% O₂, рН 7,0-7,2. Скорость оборота мешалки зависит от объема биореактора, количества микроносителей, количества культуры клеток, и площади лопастной мешалки. Проводили 4 цикла перемешивания и адсорбции после достижения температуры 37,0 °С. Далее доводили объем в биоферментере до 50 – 60% от окончательного объема питательной средой ДМЕМ. Через 24-48 часов добавляли в биоферментер оставшуюся питательную среду ДМЕМ.

Отбирали пробу через пробоотборник для микроскопического исследования в количестве не менее 1 мл. При микроскопическом исследовании оценивали степень формирования монослоя, морфологическое состояние клеток, равномерность распределения клеток на микроносителях.

В результате культивирования культуры клеток Vero E6, на микроносителях Cytodex 1, в биореакторе BioTechno Group, разработали технологическую цепочку культивирования культуры клеток, на микроносителях при 90%-ном поражении монослоя культуры клеток на микроносителях. В процессе культивирования культуры клеток пришли к выводу, что увеличенная посевная концентрация клеток, не сказывается на выходы вирусного материала. Проведенная работа с увеличением заражающей дозы, в результате изменения не наблюдались, лизогенный цикл проходил одинаково с заражающей дозой 0,001 и 0,01 ТЦД исходя из этого сделан вывод

о том, что количественное содержание вируса вирусном материале не влияет на время культивирования вируса SARS-COV-2 на монослой культуры клеток. Лизотический цикл вируса наступал на конец вторых или начало третьих суток.

При очистки вирусного материала была усовершенствована технология фильтрации вирусного материала от белков сывороточного происхождения. В результате увеличения объема фильтруемого материала и её качества.

Инактивация очищенного вирусного материала проводится химическим способом β -пропиолактоном. Поместив очищенный вирусный материал в холодильную камеру (температура – 2-8 °С) на 18 ч для инактивации вируса, а далее переместить в термальную комнату (температура – 37 °С) на 2 ч для деградации β -пропиолактона.

Получение первичного концентрата вирусного антигена SARS-CoV-2, проводится при помощи системы тангенциальной ультрафильтрации.

В очистке вирусного первичного концентрата, при гель-фильтрации или эксклюзионной хроматографии, специалисты ОАО «БелВитунифарм» получили первичный опыт сотрудников РНПЦ «Эпидемиологии и микробиологии». В дальнейшем смогли воссоздать и адаптировать технологию очистки от примесных белков к масштабному производству, усовершенствуя накопления вирусного материала. При анионообменной хроматографии, наблюдалось отсутствие остаточных нуклеиновых кислот, что доказывает качество получаемого очищенного первичного концентрата и выполняемых работ.

Заключение. Очищенный вирусный материал, первичного концентрата концентрируем при помощи системы тангенциальной ультрафильтрации до содержания белка 1,2 мг/мл. Контроль содержания вирусного антигена осуществляется сотрудниками РНПЦ «Эпидемиологии и микробиологии». Транспортировка концентрата вирусного антигена SARS-CoV-2 осуществляется, в транспортной таре FLEXBOY BAG 500 ml, согласно разработанной документации «Транспортировка промежуточной продукции».

Список использованной литературы

1. Al-Tawfiq J. A., Memish Z. A. Update on therapeutic options for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) // *Expert review of anti-infective therapy*. — 2017. — № 3. — P. 269-275.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Coronavirus (COVID-19).
3. Junqiang L., et al. CT Imaging of the 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia // *Radiology*. — 2020. — № 1. — P. 18.