

# МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

## МОЛЕКУЛЯРНО–БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Г.М. Игнатъев<sup>1,2</sup>, Е.В. Отрашевская<sup>1</sup>, Л.Л. Суханова<sup>1</sup>,  
Н.А. Нетесова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва, Россия

<sup>2</sup>АО «НПО «Микроген», Москва, Россия

<sup>3</sup>ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирской области, Россия

Профилактика кори, паротита, краснухи осуществляется вакцинацией. Эффективным средством профилактики заболеваний является вакцинация. Для ее проведения были разработаны: девять вакцин на основе аттенуированных штаммов вируса краснухи - пять вакцин разработаны и производятся в Японии с использованием штаммов Matsuba, Matsuura, TCRB19, TO-336, KRT; в КНР используется штамм BRD-2, штаммы HPV-77 и Cendehill использовались для производства вакцин в США, штамм RA-27/3 используется многими производителями вакцины против краснухи, такими как, Merck & Co. Inc, GSK Biologicals, АО «НПО «Микроген», Serum Institute of India (Индия), Institute of Immunology (Хорватия); для производства вакцин кори используются штаммы – Moraten, AIK-C, Schwarz, Edmonston-Zagreb, Edmonston B - получены из исходного штамма Edmonston. штаммы CAM-70, Shanghai-191, Changhun-47 и Ленинград-16 – получены независимо. Для производства вакцины паротитной используются штаммы Urabe, Ленинград-3, Jeryl Lynn, Lenungrad-Zagreb.

Современные требования к производству вакцинных препаратов предполагают контроль генетической стабильности производственных штаммов. Данные, подтверждающие генетическую стабильность производственного и посевного вакцинных штаммов, позволяют применить молекулярно-генетические методы для контроля подлинности штаммов не только на этапах производства, но и в готовых сериях вакцин. Предлагаемые Государственной Фармакопеей РФ методы определения подлинности вакцинных штаммов, например, вирусов кори, паротита, краснухи как в моно-, так и трёхкомпонентных вакцинах не позволяют, на самом деле, подтвердить подлинность этих вакцинных штаммов. Данные методы позволяют только подтвердить наличие штамма вируса, относящегося к данному роду и семейству.

Было проведено исследование структурных последовательностей производственных и посевных банков вирусов кори, паротита и краснухи, используемых для производства вакцин АО «НПО «Микроген». На основе полученных данных был разработан метод подтверждения подлинности вакцинных штаммов методом ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией.

Материалы и методы. В работе были использованы штаммы вируса паротита генотипов А, В, D, H, С, штамм вируса краснухи «Орлов» (генотип 2с), штамм вируса кори генотипов D6, D4, производственные и посевные штаммы «Ленинград-3» (вирус паротита), «Ленинград-16» (вирус кори), RA-27/3 (вирус краснухи). Готовые формы вакцин следующих производителей: Serum Institute of India (SII) – вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная, вакцина против краснухи живая аттенуированная; GlaxoSmithKlein Biologicals (GSK) – «Приорикс» - вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная; Merck&Co., Inc (Merck) - «ProQuad» вакцина против кори, паротита, краснухи и ветряной оспы; АО «НПО«Микроген»: вакцина против краснухи

живая аттенуированная, вакцина паротитная (штамм «Ленинград-3»), вакцина против кори живая аттенуированная (штамм «Ленинград-16»), Комбинированная вакцина против кори, краснухи и паротита «Вактивир», вакцина против краснухи (штамм RA-27/3).

Выделение РНК. Для выделения РНК из образцов использовали набор «РИБО-сорб» («АмплиСенс», Россия). Все работы по выделению РНК проводили согласно инструкции прилагаемой к набору. Выделенная РНК находилась в объеме 50 мкл. Для получения кДНК, проведения ПЦР, проведения гидролиза амплифицированных фрагментов использовали ферменты и компоненты реакционных смесей производства НПО «СибЭнзим» (Россия). Получение кДНК из препаратов РНК. Реакционная смесь при проведении реакции обратной транскрипции в объеме 50 мкл содержала: ОТ-ПЦР-смесь – реакционный буфер, смесь дНТФ, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, специфические праймеры - 47,1 мкл; HS Taq полимераза (кат. №В309) - 0,4 мкл; M-MuLV ревертаза (кат. №Е317) - 0,5 мкл; РНК исследуемого образца – 2 мкл. Реакцию проводили в течение 30 мин при 45<sup>0</sup> С. Плазмиды, использованные в качестве положительного контроля, так же производства НПО «СибЭнзим».

Полногеномное секвенирование производственных штаммов «Ленинград-3» вируса паротита, «Ленинград-16» вируса кори, RA-27/3 вируса краснухи проводили на приборе Prism 310 Genetic Analyzer с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США). Анализ данных секвенирования проводили с использованием программы Chromas 2.22 (“Technelysium Pty Ltd”, Австралия). Последовательности представлены в GenBank. Плазмиды, использованные в качестве положительного контроля, так же производства SibEnzyme Ltd. Готовые серии вакцин кори, паротита и краснухи GlaxoSmithKlein Biologicals (GSK), Merck&Co., Inc, «Microgen» и Serum Institute of India использовали для сравнения.

Результаты. Получены полногеномные последовательности штаммов «Ленинград-3», «Ленинград-16», RA-27/3 используемых АО «НПО Микроген» для производства вакцин кори, паротита, краснухи. Показана оригинальность штаммов «Ленинград-3» и «Ленинград-16» и полное соответствие штамма RA-27/3 аналогичному штамму, используемому GSK и Merck&Co. Inc. Показаны структурные отличия между штаммами вируса паротита «Ленинград-3» и «Leningrad-Zagreb», а также индийского штамма RA-27/3 от аналогичных штаммов других производителей.

Осуществлен выбор фрагментов штамма краснухи RA-27/3, кори «Ленинград-16», паротита «Ленинград-3» (и Leningrad-Zagreb) пригодных для подтверждения подлинности штамма методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Выбор фрагментов вакцинных штаммов для дальнейшего использования RFLP (Restriction fragment length polymorphism - RFLP) осуществлялся по следующим критериям:

А- анализ множественного выравнивания референсных последовательностей всех генотипов вируса, включая вакцинные штаммы;

В – существование доступной отечественной эндонуклеазы рестрикции, узнающей сайт, содержащий нуклеотидную замену;

С - отсутствие сайта узнавания подобранной рестриктазы в окрестности выявленной замены, так как дополнительный сайт может затруднить выявление нужного фрагмента после гель-электрофореза;

Д - уникальность замены, что проверяется при помощи программы BLAST с учетом всех неполных последовательностей из геномов вируса краснухи, кори, паротита внесенных в базу данных GenBank.

Для амплификации выбранных фрагментов каждого из штаммов рассчитаны пары праймеры, позволяющие провести ПЦР.

Продемонстрирована высокая специфичность и, соответственно, пригодность метода ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией для подтверждения подлинности используемых вакцинных штаммов в готовых формах коревой, паротитной, краснушных вакцин.

Исследование структуры гена белка протеиназы p150 штамма вируса краснухи RA-27/3 готовых серий вакцины различных производителей.

Для штаммов вируса краснухи, используемых в Японии, показано, что изменение их биологических свойств в ходе аттенуации, может быть связано с изменениями аминокислот в гене p150. Сравнение последовательностей гена p150 готовых серий краснушной вакцины АО «НПО «Микроген», полученных при проведении данного исследования, продемонстрировало совпадение структур между собой и их гомологичность последовательностям штамма RA-27/3 GSK и Merck (по данным GenBank). Поскольку данные о последовательности штамма RA-27/3 SII в GenBank отсутствуют, было проведено изучение структуры гена p150 в готовых формах вакцин разных производителей - АО «НПО «Микроген», GSK, Merck и SII. Результаты секвенирования гена p150 готовых серий АО «НПО «Микроген», GSK и Merck продемонстрировали полное совпадение последовательностей между исследованными образцами и их гомологичность структурам, представленным указанными производителями для штамма RA-27/3 в GenBank. Для готовых серий SII выявлена замена в позиции 1691 – G→A. Данная замена приводит к изменению кодона GCG в кодон ACG и, соответственно, к изменению аминокислоты аланин (неполярная) в аминокислоту треонин (полярная). При расщеплении этого предшественника, аминокислотная замена аланин→треонин унаследуется белком p150, содержащим протезазный домен и домен кэпирования. Эта замена не располагается в каком-либо из функциональных доменов белка p150 и, таким образом, ее роль в изменении структурных и биохимических характеристик белка p150 на данном этапе не ясна. Тем не менее, полученные результаты позволяют говорить о не полной гомологии штамма RA-27/3, используемом индийским производителем, со штаммом RA-27/3, используемым GSK, Merck и АО «НПО «Микроген».

Таким образом, в результате проведенного исследования продемонстрированы: генетическая стабильность штамма вируса краснухи RA-27/3, используемого АО «НПО «Микроген» для производства вакцин, как моно-, так и комбинированной вакцины; гомологичность этого штамма со штаммами RA-27/3, используемыми GSK и Merck; возможность использования метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для подтверждения подлинности вакцинного штамма в готовой форме вакцины против краснухи.

Штаммы вирусов кори, паротита, краснухи, применяемые АО «НПО Микроген», генетически стабильны. Для подтверждения подлинности вакцинных штаммов вируса паротита «Ленинград-3», вируса кори «Ленинград-16», вируса краснухи RA-27/3 в готовых формах вакцин, как моно- так и трех-компонентных, возможно применение ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией с использованием реактивов российского производства.