(ІНФОРМАЦІЙНИЙ ЛИСТ) МОДЕЛЬ ЗНЕЗАРАЖЕННЯ ВІРУСІВ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ВАКЦИННИХ ПРЕПАРАТІВ

Світлана Калініченко, Артур Мартинов, Христина Мелентьєва, Тетяна Антушева

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України»

Затверджено Вченою Радою ДУ «ІМІ НАМН», Протокол № 6 від 30.05.2024

Рецензент : Джораєва С.К., завідуюча лабораторно-експериментального відділу ДУ «Інститут дерматології та венерології Національної академії медичних наук України», доктор медичних наук, старший дослідник

Пропонується для використання в науково-дослідній та практичній роботі профільних установ МОЗ та НАМН України (НДІ, кафедр медичних та фармакологічних вузів, лабораторій клінічних відділень та біотехнології) модель отримання антигенних препаратів, в основі якої застосовується уніфікований новітній спосіб фотодинамічної інактивації вірусів-збудників, що дозволяє без змін антигенного складу білок-вмісних компонентів віріона стабільно руйнувати їх РНК та ДНК. Як модель для дослідження ступеню інактивації використовували бактеріофаги.

Останнім часом у нашій країні ситуація щодо керованих інфекційних хвороб як бактеріального так і вірусного ґенезу значно загострилась та набуває ще більшої актуальності, оскільки масштабні бойові дії в нашій країні супроводжуються погіршенням санітарних умов, значними міграційними процесами серед населення України, скупченням біженців в приміщеннях, руйнуванням водогонів, великою кількістю поранених військовослужбовців та мирних жителів, які потребують термінової медичної допомоги в польових умовах. У всьому світі, для зниження інфекційних захворювань широко застосовується система заходів, які здійснюються з метою попередження, обмеження розповсюдження та елімінації інфекційних хвороб. Одним з цих засобів є вакцинопрофілактика.

Вакцини – медичні імунобіологічні препарати, що призначені для створення специфічного імунітету до інфекційного захворювання. Їх виробляють із ослаблених або інактивованих мікроорганізмів, продуктів їх життєдіяльності або з їх антигенів, у тому числі з антигенів, одержаних генно-інженерним або хімічним шляхом.

При розробці вакцинних препаратів виникають певні проблеми. Так, при застосуванні живих вакцин, незважаючи на генетично закріплену втрату патогенних властивостей вакцинних штамів, за певних умов, вони можуть розмножуватися в місці введення, лімфовузлах і внутрішніх органах. Також не можна не пам’ятати про здатність до реверсії атенуірованих штамів мікроорганізмів, що може стати причиною захворювання (спалах поліомієліту на Закарпатті у 2015 році, який був викликаний циркулюючим вакциноспорідненим вірусом типу 1). Крім того, живі вакцини можуть містить до 95 % баластних білків, що підвищує їх реактогенність.

Інактивовані вакцини є менш ефективними, ніж живі, але при повторному введенні створюють досить стійкий імунітет. Для підвищення антигенності таких вакцин використовують ад’юванти (хімічні чинники), що помітно підвищує їх ефективність. Інактивовані вакцини не потребують строгих умов зберігання і транспортировки тому є більш привабливими для фарміндустрії. При виробництві інактивованих вакцин збудників позбавляють вірулентних властивостей шляхом нагрівання, обробки формаліном чи пропіолактоном, ацетоном, спиртом, мертіолятом і ін., таким чином забезпечуючи з однієї сторони надійну інактивацію, а з іншої – мінімальне пошкодження антигенної структури збудника. Але при застосуванні хімічних чинників, особливо при виробництві анатоксинів, утворюються ковалентні зв’язки між білками токсинів і хімічним чинником, що призводить до утворення нових аномальних антигенних детермінант, які є небажаними, оскільки сприяють збільшенню реактогенності і алергенності таких вакцин.

Субодиничні і спліт-вакцини мають низьку реактогенність, високу ступінь специфічної безпеки і достатню імуногенну активність завдяки використанню ад’ювантів при їх виробництві, які є хімічними чинниками що підвищують реактогенність і алергенність таких вакцин.

Застосування генно-інженерних позволило створити рекомбініантні вакцині, які є достатньо безпечними та ефективними. Проте, швидка мутація інфекційного чинника в природі призводить до втрати їх ефективності, що ми наблюдаємо на прикладі пандемії коронавірусної інфекції. До того ж рекомбінантні вакцини потребують дуже строгих температурних умов збереження та транспортування.

Виходячи із вищезазначеного, найбільш економічно привабливими є інактивовані вакцини. Саме тому пошук сполук та методів для інактивації патогенів, які б не утворювали з антигеном ковалентних зв’язків, збільшуючи таким чином їх реактогенність та алергенність, вкрай необхідно.

На цей час встановлено,що системи інактивації патогенів (СІП) в препаратах крові є ефективними проти численних бактерій, вірусів і паразитів та широко застосовуються в технологіях обеззаражування продуктів крові в трансфузіології. Ці передумови дали нам ідею про екстраполяцію досвіду трансфузіологів з фотодинамічної інактивації препаратів крові на вакцинологію з метою заміни інактиваторів/консервантів та нетоксичні метаболітні засоби фотоінактивації, від яких не потрібно очищувати вакцину та які не утворюють ковалентних зв’язків з антигенами вакцин.

DOI: 10.5281/zenodo.11638880

Перед впровадженням інактиваторів, які не утворюють з антигеном ковалентних зв'язків, необхідно, окрім синтезу найбільш активних речовин, ще й дослідити фундаментальні закономірності фотоінактивації мікроорганізмів-мішеней. Наприклад, вплив часу опромінення на зміни інфекційності патогенів. Без такої інформації, в подальшому для ефективної інактивації продуцентів вакцин неможливо ефективно розрахувати співвідношення інактиватора, інтенсивності опромінення та кількості самого інфекційного чинника. Окрім того, невідомими є метаболіти після руйнування самого інактиватора. Вказані дослідження дозволять зрозуміти прогнозованість і перспективність заміни ковалентних інактиваторів на засоби фотодинамічної інактивакції бактерій в вакцинології з метою подальшого впровадження при розробці нових класів нетоксичних та неалергенних вакцин.

Для одержання таких імунопрепаратів необхідно отримати якомога чисту суспензію вірусу (в нашому випадку – модель полівалентного бактеріофагу Піофаг®) у якості кандидата для знезараження і отримання антигенного комплексу. Встановлюють концентрацію білку та інші параметри матричної біомаси з віріонами згідно затвердженої аналітично-нормативної документації. До суспензії бактеріофагів (вірусів) послідовно додають фотосенсибілізатори : від $2*10^{-4}$ % до $2*10^{-6}$ % рибофлавіну, від $2*10^{-4}$ % до $2*10^{-6}$ % рибофлавіну менадіону сульфат натрію та від $2*10^{-4}$ % до $2*10^{-6}$ % піридоксину гідрохлоридом з таким розрахунком. Розчин витримують із фотосенсибілізаторами по 5 хвилин при кімнатній температурі для інтерколяції речовин у РНК/ДНК, після чого опромінюють 2-15 хвилин ультрафіолетовим (λ = 210-360 нм) та/ або синім світлом (λ = 450 нм). По краплі зразків (дозатором 10 мкл) інактивованих бактеріофагів (вірусів) наносять у чашці Петрі на добову культуру *P.aeruginosa*, яка проявила високу чутливість щодо дослідного бактеріофагу, інкубують добу. Потім фіксують наявність чи відсутність зони затримки росту бактерії навколо краплі з інактивованим фагом (Рис.)

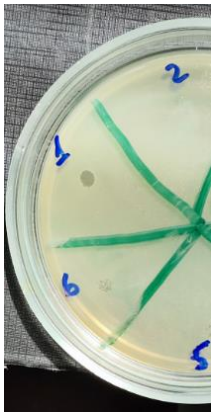

Рис. Контроль ступеню інактивації бактеріофагів (1- зона затримки росту присутня в контролі, 6- не повна інактивації бактеріофагу, 2- повна інактивація бактеріофагу.

При повній інактивації бактеріофагів у суспензії на чашці Петрі не спостерігається а ні яких слідів нанесення зразку (зона № 2 на рис.), зон затримки росту (як на рис. – зона № 1 контроль із зоною затримки росту та зона № 6 із неповною інактивацією бактеріофагу). Зразок із зони № 2 з рисунку повністю відповідає повністю інактивованій фаговій (вірусній) вакцині.

Враховуючи той факт, що для знезараження вірусів застосовуються ендогенні повністю нешкідливі речовини рибофлавін, менадіон та пірідоксин і зовсім відсутні хімічні добавки, токсичні суміші, тощо, отримані антигени не потребують додаткового очищення чи, навіть, вивчення кожного отриманого зразка на наявність токсигенності та реактогенності, що забезпечує значні переваги фотодинамічного способу у порівнянні з іншими. Дана технологія спрощує та робить більш доступною і недороговартісною саму можливість отримання вакцин з вірусів та мікроорганізмів, скорочує час для їх приготування, оскільки ліквідує необхідність використання хімічних домішок з наступним очищенням готового препарату.

Експериментальне вивчення оптимальних параметрів застосування уніфікованого способу фотодинамічної інактивації різних бактеріофагів (стафілококового, синьогнійного, полівалентного) підтвердило повноту інактивації вірусів: нездатність до «реверсії» та збереження життєздатності віріонів.

Відпрацьований на моделі бактеріофагів спосіб отримання корпускулярних вакцинних вірусних кандидат-вакцин без втрати структури антигенів із збереженням імуногенності може бути успішним для отримання аналогічних препаратів для створення вітчизняних противірусних вакцин.

(Information letter) A model of virus decontamination for vaccine production

Svitlana Kalinichenko, Artur Martynov, Khrystyna Melentyeva, Tetiana Antusheva

To obtain such vaccinal antigen, it is necessary to obtain the purest possible virus suspension (in our case, the model of the anti-pyogenic bacteriophage PioFag) as a candidate for inactivation and production of the antigenic complex. Photosensitizers are added sequentially to the bacteriophage (virus) suspension: from $2*10^{-4}$ % to $2*10^{-6}$ % riboflavin, from $2*10^{-4}$ % to $2*10^{-6}$ % riboflavin menadione sodium sulfate and from $2*10^{-4}$ % to $2*10^{-6}$ % pyridoxine hydrochloride according to the following calculation. The solution is incubated with photosensitizers for 5 minutes at room temperature to intercalate the substances in RNA/DNA, and then irradiated for 2-15 minutes with ultraviolet (λ = 210-360 nm) and/or blue light (λ = 450 nm). One drop of samples (10 μL) of inactivated bacteriophages (viruses) is applied in a Petri dish to a daily culture of *P. aeruginosa* that has shown high sensitivity to the test bacteriophage, incubated for a day. Then, the presence or absence of a zone of bacterial growth inhibition around the droplet with the inactivated phage is recorded. With complete inactivation

DOI: 10.5281/zenodo.11638880

of bacteriophages in the suspension on the Petri dish, there are no traces of sample application, no growth retardation zones. Taking into account the fact that endogenous completely harmless substances riboflavin, menadione and pyridoxine are used for virus disinfection and there are no chemical additives, toxic mixtures, etc., the obtained antigens do not require additional purification or even the study of each sample for toxicity and reactivity, which provides significant advantages of the photodynamic method compared to others. This technology simplifies and makes more accessible and inexpensive the very possibility of obtaining vaccines from viruses and microorganisms, reduces the time for their preparation, as it eliminates the need for chemical additives with subsequent purification of the finished product. Experimental study of the optimal parameters for the use of a unified method of photodynamic inactivation of various bacteriophages, staphylococcal, antiseptic, and pyophage, confirmed the completeness of virus inactivation: inability to "reverse" and preservation of virion viability. The method of obtaining viral vaccine candidates without loss of antigenic structure and preservation of immunogenicity, tested on the bacteriophage model, can be successful in obtaining similar preparations for the development of domestic antiviral vaccines.

Keywords: viruses’ inactivation, vaccines, photosensitive vitamins, photodynamic method

DOI: 10.5281/zenodo.11638880