

БЕССЫВОРОТОЧНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ЖИВОЙ ВАКЦИНЫ

SERUM-FREE CULTURE MEDIA FOR CULTURED INFLUENZA LIVE VACCINE

**N. Dumchenko
E. Nechaeva**

Summary. Serum-free culture media VectorVac-PS2 and GPS-1 were constructed for the cultivation of the MDCK cell culture and the creation of a live cultural influenza vaccine. It has been proven that the culture media VectorVac-PS2 and GPS-1 have a high proliferative activity, and the production of viral strains of the influenza virus is comparable to the production of these strains in a commercial serum-free medium. Culture media VectorVac-PS2 and GPS-1 can be used in the production of live influenza vaccine.

Keywords: nutrient media, cell cultures, vaccines, influenza.

Думченко Наталья Борисовна

Н.с., ФБУН «Государственный научный
центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область
dumchenco@vector.nsc.ru

Нечаева Елена Августовна

К.б.н., ФБУН «Государственный научный
центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область
nechaeva@vector.nsc.ru

Аннотация. Сконструированы бессывороточные питательные среды ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 для культивирования культуры клеток MDCK и создания живой культуральной гриппозной вакцины. Доказано, что питательные среды ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 обладают высокой пролиферативной активностью, а также продукция вирусных штаммов вируса гриппа сравнима с продукцией этих штаммов в коммерческой бессывороточной среде. Питательные среды ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 могут быть использованы в производстве живой гриппозной вакцины.

Ключевые слова: питательные среды, культуры клеток, вакцины, грипп.

Введение

Питательные среды являются наиболее важным фактором в технологии получения культуральных живых вакцин. Среда поддерживает выживание и пролиферацию клеток, а также клеточные функции, это означает, что качество среды напрямую влияет на результаты исследований, скорость производства биофармацевтических препаратов. Поэтому важно выбрать подходящую среду, которая необходима для этих целей. В настоящее время синтетические среды можно разделить на несколько групп в зависимости от типа добавок: среды, содержащие сыворотку крови животных, среды без сыворотки и среды определенного химического состава. Среда, содержащая сыворотку, естественным образом содержит различные вещества, полученные из сыворотки, которые делают состав среды не ясным, а их концентрации могут колебаться от партии к партии. Эта ситуация снижает воспроизводимость результатов и создает риск микробного заражения. Среда, не содержащая сыворотки, напротив, имеют определенный состав, что обеспечивает высокую воспроизводимость результатов, а процесс выращивания может быть подтвержден. Бессывороточные среды химически определенных составов (не содержат неопределенных ингредиентов) обеспечивают дополнительную стабиль-

ность и воспроизводимость систем культивирования и снижение риска микробного заражения. В настоящее время составы базовых (основных) вирусологических питательных сред (MEM, DMEM, 199, F-12, RPMI, 199 и др.) известны и приводятся в каталогах большинства коммерческих компаний, а прописи специализированных бессывороточных сред являются предметом собственности компаний (Gibco, JRH biosciences, HyClone, др.) и недоступны для широкого использования. Существует несколько подходов к созданию бессывороточных питательных сред. Первый — к известной базовой питательной среде добавляют различные компоненты, в том числе смесь аминокислот, неорганических соединений, микро- и макроэлементов, сахаров, жирных кислот, инсулина, трансферрина для получения полностью химически определенной питательной среды [1–5]. Прописи питательных сред отличаются процентным соотношением компонентов среды и их составом, могут добавляться или исключаться различные компоненты, но это влияет, в конечном счете, на стоимость среды. Второй — при использовании сыворотки велика вероятность попадания пирогенов и остаточных элементов сыворотки в конечный продукт [6]. В настоящее время проведен ряд исследований для выявления альтернативы заменителя сыворотки, вместо сыворотки используют различные компоненты, такие как гидролизаты, смесь факторов

роста, гормонов и витаминов, их добавляют в определенной концентрации к известной питательной среде. Поэтому подбор гидролизатов для конкретной культуры клеток является на сегодняшний день одной из актуальных проблем клеточной биотехнологии [7].

Авторами разработана бессывороточная питательная среда определенного химического состава для культивирования клеток MDCK и вакцинных штаммов вирусов гриппа ВекторВак-ПС2 [8]. Также была разработана бессывороточная питательная среда с добавлением гидролизатов ГПС-1, отвечающая всем нормативным требованиям по культивированию клеток MDCK и вакцинных штаммов вирусов гриппа.

Целью работы являлось конструирование питательных сред для оптимизации технологии производства живой культуральной гриппозной вакцины

Материалы и методики исследования

Питательные среды. В работе проводили исследование питательных сред SFM4MegaVir (HyClone, США), ВекторВак-ПС2, ГПС-1 и Игла МЕМ (производство ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Культивирование клеток. В качестве клеточного субстрата применяли перевиваемую линию клеток почки самки коккер-спаниеля MDCK из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Клетки культивировали в культуральных флаконах объемом 25 мл (TPP, Швейцария), в качестве ростовой питательной среды использовали среду Игла МЕМ (производство ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) с 1–5% сыворотки крови плодов коровы (Gibco, США). После прикрепления клеток проводили смену среды на питательные среды SFM4MegaVir (HyClone, США), ВекторВак-ПС2, ГПС-1 и Игла МЕМ (производство ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) и продолжали культивировать клетки в течение 72 часов.

Определение жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью ХТТ-теста [9]. Культуру клеток MDCK в концентрации 5×10^4 в 1 мл помещали в 96-луночный планшет (Costar, США) в среды Игла МЕМ, содержащей 5% сыворотки крови плодов коровы, SFM4MegaVir (HyClone, США), ВекторВак-ПС2, ГПС-1 и инкубировали 72 ч при 37 °C с 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе. Затем в каждую лунку с исследуемыми питательными средами вносили по 50 мкл рабочего раствора соли тетразолия ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5- карбоксанилид) (Sigma, США). Использование ХТТ приводило к образованию растворимого красителя оранжевого цвета. В живых клетках митохондрии способны уменьшать количество растворенно-

го ХТТ с формированием водорастворимого оранжевого красителя, а концентрация красителя прямо пропорциональна количеству метаболически активных клеток. Инкубировали еще (2–4) часа в условиях CO₂-инкубатора. Определяли жизнеспособность клеток по интенсивности окраски раствора, измеряли его оптической плотностью в лунках на микропланшетном ридере Tecan Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 492 нм.

Пролиферативная активность клеток. Изучение пролиферативной активности клеток проводили при культивировании в различных питательных средах с добавлением и без добавления сыворотки крови плодов коровы. Клетки культивировали во флаконах вместимостью 25 мл (TPP, Швейцария). Посевная концентрация составляла $1,0 \times 10^5$ клеток в 1 мл, кратность посева 1:3–1:4. Для пересева культур клеток в качестве диспергента применяли 0,25%-ный раствор трипсина и 0,02%-ный раствор Версена (производство ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) в соотношении 1:2. Культуры клеток инкубировали при температуре 37°C в течение (72–96) ч. Оценивали морфологию клеток, индекс пролиферации, сроки формирования и состояние клеточного слоя [10].

Культивирование вакцинных штаммов вируса гриппа в клетках MDCK. Культуру клеток MDCK культивировали в культуральных флаконах объемом 25 мл (TPP, Швейцария), в качестве ростовой питательной среды использовали среду Игла МЕМ (производство ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») с 5% сыворотки крови плодов коровы (Gibco, США). После прикрепления ростовую среду сливали, клетки заражали вакцинными штаммами вируса гриппа A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1), A/17/Швейцария/2010/1 (H3N2) и B/60/Пхукет/2013/26 с множественностью заражения (0,01–0,001) ЭИД50/0,5 мл и далее продолжали культивирование клеток в питательной среде SFM4MegaVir (HyClone, США), питательной среде ВекторВак-ПС2 и питательной среде ГПС-1. Ежедневно оценивали морфологию клеток, выход клеток [10] и отбирали пробы вирусосодержащего материала для определения специфической активности вируса гриппа методом титрования на куриных эмбрионах [11], которую выражали в Ig ЭИД50/0,2 мл. Через 1–5 сутки проводили учет специфической активности вируса гриппа по цитопатическому действию (ФС.3.3.1.0027.15 «Вакцина гриппозная живая») [12], полученную вирусосодержащую жидкость освобождали от клеточного детрита фильтрованием через нитроцеллюлозные мембраны с размером пор 0,2 мкм, 0,45 и 0,65 мкм (Миллипор, США), добавляли стабилизаторы, разливали в ампулы по 0,2 мл и подвергали лиофилизации (установка лиофильного высушивания TG 16–50 (Германия)). После высушивания материала ампулы заполняли аргоном и запаивали. Вакцину контролировали на специфическую и гемагглютинирующую активность [11], стерильность, физико-химические свойства, pH [12].

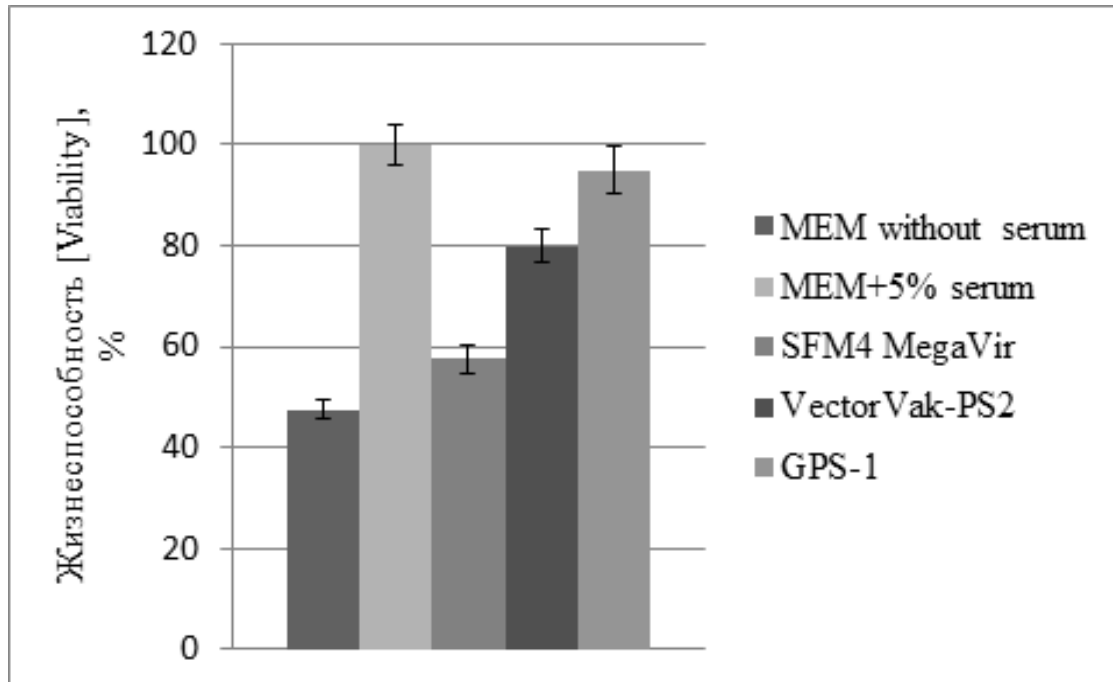


Рис. 1. Влияние различных питательных сред на жизнеспособность культуры клеток MDCK

Статистическая обработка результатов проведена по стандартным методикам [13]. Данные в таблицах приведены в виде средней арифметической со стандартной ошибкой ($M \pm m$). Оценка различий выборочных средних проведена при значении доверительной вероятности 0,95.

Результаты исследования и обсуждение

Во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора были разработаны бессывороточные среды ВекторВак-ПС2 и ГПС-1. Питательная среда ВекторВак-ПС2, состав которой отражен в Технических условиях № 20.59.52-084-05664012-2019 «Питательная среда для культур клеток бессывороточная жидкая ВекторВак-ПС2» представляет собой полностью определенную бессывороточную питательную среду, состоящую из неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозы, микроэлементов и других компонентов, растворенных в воде очищенной, простерилизованной фильтрованием через систему мембранных фильтров с конечным размером пор не более 0,22 мкм. Среда ВекторВак-ПС2 — прозрачная жидкость красновато-оранжевого цвета, без опалесценции и осадка, pH среды варьирует от 7,1 до 7,5, буферная емкость не менее 3,0 мл, содержание хлор-ионов колеблется в пределах 4,60–5,62 г/л, глюкозы — в пределах от 3,0 до 5,1 г/л, количество аминного азота не менее 0,08 г/л. Питательная среда стерильна, антибиотиков и консервантов не содержит.

В состав питательной среды ГПС-1 входят неорганические соли, аминокислоты и витамины что и в состав базовой питательной среды Игла MEM, но с добавлением соевого гидролизата НуПер 2209, содержащего дополнительные факторы роста. Бессывороточная питательная среда ГПС-1 — прозрачная жидкость красновато-бордового цвета, без опалесценции и осадка, pH среды варьирует от 7,2 до 7,4, буферная емкость не менее 3,0 мл, содержание хлор-ионов колеблется в пределах 4,60–5,62 г/л, глюкозы — в пределах от 1,0 до 3,0 г/л, количество аминного азота не менее 2,2 г/л. Питательная среда стерильна, антибиотиков и консервантов не содержит.

Сравнительное изучение жизнеспособности клеток MDCK в питательных средах ВекторВак-ПС2, ГПС-1 и Игла MEM оценивали с помощью ХТТ-теста. В качестве контроля использовали питательную среду Игла MEM, содержащую 5% сыворотки крови плодов коровы, и бессывороточную питательную среду SFM4 MegaVir. Проводили измерение оптической плотности интенсивности окраски субстрата в лунках. Рассчитали процент жизнеспособных клеток в каждом опытном образце относительно лунок контроля. Было показано, что бессывороточные среды ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 превосходят по жизнеспособности питательные среды Игла MEM и SFM4 MegaVir. (Рис. 1.)

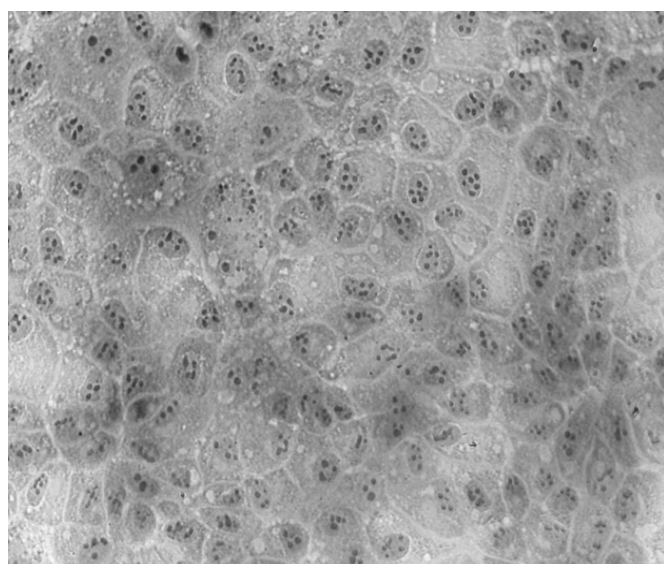
Была проведена оценка пролиферативной активности клеток MDCK в питательных средах Игла MEM, SFM4

Таблица 1. Влияние состава ростовой питательной среды на пролиферативную активность MDCK

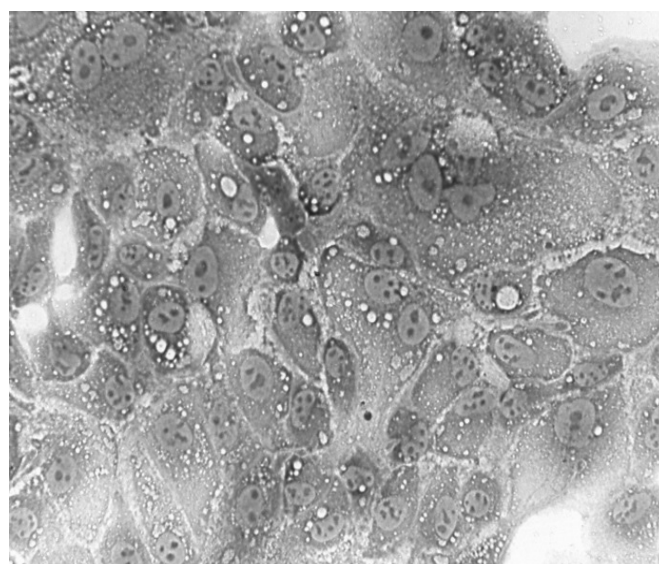
Nutrient medium	MEM without serum	MEM+5% serum	SFM4 MegaVir	VectorVak-PS2	GPS-1
Proliferation index, ($\chi \pm \sigma$)	0	4,3±0,4	2,3±0,2	3,2±0,3	3,8±0,4

Таблица 2. Продукция вакцинных штаммов вируса гриппа в культуре клеток MDCK

Nutrient medium	The specific activity of the influenza virus, Ig EID50/0,5 ml, ($\chi \pm \sigma$)		
	A/17/California/2009/38 (H1N1)	A/17/Switzerland/2010/1(H3N2)	B/60/Phuket /2013/26
MEM+5% serum	7,0±0,5	6,3±0,5	6,0±0,5
SFM4Mega Vir	9,0±0,5	8,5±0,5	8,5±0,5
VectorVak-PS2	8,5±0,5	8,5±0,5	8,5±0,5
GPS-1	8,5±0,5	9,0±0,5	8,5±0,5



а



б

Рис. 2. Световая микроскопия. Окраска азур-эозином. Увел. 40: а — клетки культивируемые на средах Игла MEM, ВекторВак-ПС2, ГПС-1; б — клетки культивируемые на среде SFM4 MegaVir

MegaVir, ВекторВак-ПС2 и ГПС-1. В качестве контроля применяли питательную среду Игла MEM с добавлением 5% сыворотки без сыворотки и бессывороточную среду SFM4 MegaVir, используемую в производстве гриппозной вакцины. Разработанные бессывороточные среда ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 при культивировании клеток MDCK обеспечивают рост клеток, клетки имеют типичную для данной культуры морфологию, формируют монослой на 2–3 сутки роста, сохраняют высокую пролиферативную активность (индекс пролиферации культуры клеток составляет 3,2 и 3,8 соответственно)

(табл. 1) (Рис. 2.а). В культуре клеток MDCK, культивируемой в среде SFM4 MegaVir, наблюдается изменение морфологии клеток, клетки увеличиваются в размерах, образуют тяжи, пролиферативная активность культуры снижена (Рис. 2.б).

При культивировании вакцинных штаммов вируса гриппа в клетках MDCK показано, что продукция вируса гриппа в бессывороточных средах ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 сравнима с продукцией вируса гриппа в среде SFM4MegaVir и составляет (8,5–9) Ig ЭИД50 (табл. 2)

Заключение

Разработаны бессывороточные питательные среды ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 для культивирования клеток MDCK и вакцинных штаммов вируса гриппа для создания гриппозных вакцин. Среда сконструированы на основе

базового состава Игла MEM с дополнительными компонентами, такими как, аминокислоты и микроэлементы для ВекторВак-ПС2 и соевый гидролизат, содержащий дополнительные факторы роста — для ГПС-1. Питательные среды ВекторВак-ПС2 и ГПС-1 могут быть использованы в производстве живой гриппозной вакцины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Merten O.-W., Kallel H., Manuguerra J.-C., Tardy-Panit M., Crainic R., Delpeyroux F., Van der Werf S., Perrin P. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses // *Cytotechnology*. — 1999.-V. 30. — P. 191–201.
2. Merten O.-W., Wu R., Couve R. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactor // *Cytotechnology*. — 1997.-V. 25.-P. 35–41.
3. Райтер М., Мундт В., Дорнер Ф., Грильбергер Л. Среда, не содержащая белков и сыворотки, и способ культивирования клеток млекопитающих в такой среде: Патент Ru 238412. — 2010.
4. Hossler P., Racicot C., McDermott S., Fann J. Efficient and effective supplement screening for the development of chemically defined media in cell culture: Patent USA US2010/0129727. — 2012.
5. Kallel H., Perrin P., Merten O.-W. Evaluations of the new medium (MDSS2N) free of serum and animal proteins, for the production of biologicals // In: *New Development and New Applications in Animal Cell Technology*. Kluwer Academic Publishers. -1998.-P. 561–568.
6. Нечаева Е.А., Радаева И.Ф., Думченко Н.Б., Сумкина Т.П., Богрянцева М.П., Сенькина Т.Ю. Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток и вирусов // *Вестник пермского национального исследовательского политехнического университета Химическая технология и биотехнология* — 2018. — № 4. — С. 85–97.
7. Думченко Н.Б., Радаева И.Ф., Нечаева Е.А., Руденко Л.Г. Использование различных гидролизатов при получении гриппозной вакцины // *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики Естественные и технические науки* — 2019 — № 11–2. — С. 6–9
8. Технические условия № 20.59.52–084–05664012–2019 «Питательная среда для культур клеток бессывороточная жидкая ВекторВак-ПС2».
9. Scudiere D.A., Shoemaker R.H., Paul K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines // *Cancer research* — 1988.—V.48 — P. 4827–4833.
10. Фармакопейная статья ОФС.1.7.2.0011.15 «Требования к клеточным культурам-субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов». Государственная Фармакопея 14. — 2018.-Т.2. — С. 2835–2851.
11. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. МУК 3.3.2.1758–03.
12. Фармакопейная статья ФС.3.3.1.0027.15 «Вакцина гриппозная живая». Государственная Фармакопея 13. — 2015. — Т. 3. — С. 993–1008.
13. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. — Пер. с англ. — 1999. — М. — 459 с.

© Думченко Наталья Борисовна (dumchenco@vector.nsc.ru), Нечаева Елена Августовна (nechaeva@vector.nsc.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»