

Игнатъева Г.А., 2016  
УДК 616-092

Игнатъева Г.А.

## **Технологии получения вакцинных препаратов: движение от биотехнологических платформ к химическому синтезу антигенных эпитопов, современный взгляд**

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24, Россия

**Цель:** представить краткий обзор истории практики вакцинаций и истории развития технологий производства вакцинных препаратов, привлечь внимание современной медицинской науки к обозначенной проблеме, в первую очередь в отношении вакцинных препаратов, предназначенных для применения на детях. **Методика:** в обзор включен материал нескольких монографий, выпущенных солидными издательствами (WILEY; Academic Press, etc.). Особый интерес представляют материалы по биотехнологическим платформам производства вакцин, опубликованные сотрудниками фирм-производителей, таких, как Merck & Co; Sanofi Pasteur; Dynavax Europe/Rhein Biotech GmbH; Latham Biopharm Group; Aridis Pharmaceuticals LLC; Genentech; Amgen; Shamir Biologics LLC; Biopharm Services US; Novartis Pharma AG, а также исследовательских центров и контролирурующих администраций: Laboratory of Bacterial Polysaccharides, Center for Biologics Evaluation and Research; Purdue University, West Lafayette, IN, US; Department of Pharmaceutical Chemistry, Univ. Of Kansas; Max Planck Institute for dynamics of Complex Technical Systems; Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology; US Dep. of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service, etc. **Результаты:** сведения о практиках прививок против контагиозных болезней встречаются в исторической литературе о средневековых Китае, Персии, Византии, американских индейцах, индийских и африканских народов. Со времени возникновения современной иммунологии как нормативной науки в последнем десятилетии XIX в платформы производства вакцинных препаратов «двигались» в следующей последовательности: in vivo (выращивание и аттенуация микробов в организмах животных); in ovo (с 1931 г. по предложению E. Goodpasture вакцинные штаммы вирусов стали выращивать в яйцах птиц); в 1949 г. J.F. Enders разработал систему массовой наработки вируса полиомиелита в первичной культуре клеток почек обезьян in vitro. В первичных культурах in vitro фибробластов куриных эмбрионов выращивают вирусы кори, паротита, бешенства. **Заключение:** кроме позитивной цели вакцинаций — профилактики нескольких заболеваний, приводимый материал дает возможность задуматься о таком явлении как межвидовая трансмиссия «не титульных» инфекционных патогенов, происходящих из биотехнологических платформ. Примеры инфекционных заболеваний человека, в том числе новых, пришедших по путям межвидовой трансмиссии от животных, известны. С 2000-х годов в целях повышения экономической рентабельности массового производства вакцин в США и других т.н. западных странах в качестве платформ для производства вакцинных штаммов возбудителей стали использовать перевивные опухолевые линии клеток. В обзоре приведены примеры конкретных линий клеток и вакцин, на них выращиваемых. Мы предлагаем не забывать вирусную теорию этиологии онкологических заболеваний, сформулированную Л.А. Зильбером в 1960-х годах и получившую мировое признание, а также более ранние работы Пейтона Рауса по инфекционности сарком у кур, и работы других исследователей по онкогенным вирусам. В обзоре рассмотрены также биотехнологические платформы производства рекомбинантных белков и вирусоподобных частиц в качестве субъединичных вакцин. Кроме исторически первых одноклеточных платформ E. Coli, S. albicans упомянуты и новые платформы «опережающего развития» — растения, водоросли, неодноклеточные грибы, а также синтетические пептиды.

**Ключевые слова:** вакцинация, межвидовая трансмиссия, инфекционные патогены, рекомбинантные белки, биотехнологические платформы.

**Для корреспонденции:** Игнатъева Г.А., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ГНЦ «институт Иммунологии ФМБА России gaiti2007@mail.ru

**Для цитирования:** Игнатъева Г.А., Технологии получения вакцинных препаратов: движение от биотехнологических платформ к химическому синтезу антигенных эпитопов, современный взгляд. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 143–147.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

**Поступила:** 13.05.2016

Ignateva G.A.

## ***Vaccine manufacturing and technology: from biotechnological platforms to syntethic epitopes, current viepoint***

State Research Center «Institute of Immunology», Federal Medical and Biological Agency of Russia, 115478 Moscow, Kashirskoe shosse, 24, Russia

**The Purposes:** the review take into account short history of vaccination practice and development of vaccine technology. **Methods.** In the review we include data from several monographs about manufacturing of vaccines published by authors from such companies as Merck & Co; Sanofi Pasteur; Dynavax Europe/Rhein Biotech GmbH; Latham Biopharm Group; Aridis Pharmaceuticals LLC; Genentech; Amgen; Shamir Biologics LLC; Biopharm Services US; Novartis Pharma AG, and several research centers: Laboratory of Bacterial Polysaccharides, Center for Biologics Evaluation and Research; Purdue University, West Lafayette, IN, US; Department of Pharmaceutical Chemistry, Univ. Of Kansas; Max Planck Institute for dynamics of Complex Technical Systems; Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology; US Dep. of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service, etc. **Results.** In historic literature there are data about inoculation practices in antique China, Persia, India, Byzantium, native Americans, some African population. In modern immunology since the end of XIX century the vaccines were produced at the in vivo platforms — in animals (rabbits, mice, cows). Since 1931 due to E. Goodpasture' elaboration most virus vaccines were and are produced at the in ovo platform. In 1949 J.F. Enders elaborated large-scale polio virus production in the primary culture of monkey kidney cells in vitro. Up to day primary culture of chicken embryo fibroblasts are used to large-scale production of vaccine viruses of measles, mumps, rabies. Since 2000-th in Western countries most part of virus vaccines were began to produced via a cultivation in continuous tumor cell lines. The last technology is the most low cost for large-scale production of vaccines. We review several new biotechnological platforms for the production of the recombinant protein or virus-like particles as subunit vaccines: plant system, algae, mushrooms, insect cells, etc. **Conclusion.** Beside of good purpose of vaccination — prophylactic of several infectious deseases, doctors must take into account possibility of inter-species transmission of unknown pathogens (retroviruses, prions, etc) from biotechnological platforms — animals, cell cultures — into human population, and don't ignore L.A. Zilber' the-ory of virus' etiology of cancer diseases.

**Keywords:** inter-species transmission, infectious pathogens, recombinant protein, biotechnological platforms.

**Subject terms:** Vaccines technology; platform evolution; inter-species transmission

**For citation:** Ignateva G.A. Vaccine manufacturing and technology: from biotechnological platforms to syntethic antigenic epitopes, current viepoint. *Patologicheskaya fiziologiya I eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60 (4): 143–147 (In Russ.).

**For correspondence:** Galina A. Ignateva, Doctor of Medical Sciences, Professor, State Research Center «Institute of Immunology», Federal Medical and Biological Agency of Russia, 115478 Moscow, Kashirskoe shosse, 24, Russia; e-mail: gaiti2007@mail.ru

**Conflict of interest:** The author declare no conflict of interest.

**Funding:** federal budget.

**Received** 13.05.2016

Практика вариоляций — прививок от оспы — пришла в Европу из Византии с 1722 г. и до настоящего времени имеет характер «трансляционной медицины», хотя такой термин появился недавно. Это означает, что к вакцинации (пусть сначала под названием вариоляции, термин «вакцина» ввел Э. Дженнер в 1796 г.) людей приступали незамедлительно после опытов, подчас единичных, на животных, без каких бы то ни было клинических испытаний [1]. О необходимости разработки правил доказательной медицины, т.е. двойных слепых плацебо-контролируемых и проспективных исследований безопасности и эффективности препаратов, предназначенных для введения в организм человека, впервые задумались только с 60-х годов XX века после трагической истории с талидамидом. Вакцинация по целеполаганию —

это моделирование инфекции, но с использованием микроба со сниженной патогенностью (аттенуированного) или искусственного биотехнологического конструктора (рекомбинантных белков, VLP — вирусоподобных частиц), или синтетических пептидов и их производных.

Будем дальше говорить только о вирусных инфекциях и вакцинах против них, имея в виду, что принципиальные вопросы относительно бактериальных и токсинных вакцин те же, каждый со своей спецификой.

Ближе всего к естественной инфекции оказываются аттенуированные цельновирусные вакцины. В этих случаях не стоит задача исследований по поиску протективных эпитопов патогенов и работа по созданию вакцинного препарата в целом оказывается относитель-

льно быстровыполнимой. Но две проблемы «лежат на поверхности». Первая: аттенуированный, но живой микроорганизм, попадая *in vivo* во множество тел, будет эволюционировать и, вероятно, «в свою пользу», что может быть сопряжено с возрастанием его патогенности и/или формированием очагов латентной инфекции [2—4]. Вторая: технологии массового производства вакцин с «начала времен» и до настоящего времени были и продолжают оставаться биотехнологическими, что обязывает иметь в виду присутствие в вакцинных препаратах сопутствующих микробных патогенов и/или векторов экспрессии, происходящих из биолатформ. Ниже мы приводим фактическую информацию, опубликованную сотрудниками крупных международных фирм-производителей вакцин (Merck&Co.; Sanofi Pasteur; Dynavax Europe/Rhein Biotech GmbH; Genentech; Lab. of Bacterial Polysaccharides; Ardis Pharmaceuticals; Amgen; Biopharm Services US; Novartis Pharma AG, et al ) [5]. На сегодня используют следующие биотехнологические «платформы» для производства вирусных вакцин или вирусоподобных частиц:

- 1) *in vivo* (в организмах животных);
- 2) *in ovo* (в птичьих яйцах);
- 3) первичные культуры клеток из тканей животных;
- 4) перевивные трансформированные (опухолевые) культуры клеток животных и человека. Для получения рекомбинантных белков и их производных используют бактериальные клетки, одноклеточные грибы, клетки растений.

Из небиотехнологических методов получения вакцин нам известен только химический синтез пептидных препаратов антигенов и их производных.

При выращивании массы патогенов для производства вакцин *in vivo* в тех или иных животных главный и неустраняемый риск технологического происхождения — межвидовая трансмиссия сопутствующих патогенов животных в человеческую популяцию. Тем не менее по технологиям *in vivo* до настоящего времени производят, например, вакцину от японского энцефалита JE-VAX®, которую выращивают в мозге мышшей. В 2007 г. лицензия на эту вакцину приостановлена в США, но действует в Ю. Корее, Тайване, Тайланде, Вьетнаме.

С 1931 г. по предложению E. Goodpasture ряд вирусных вакцин начали выращивать *in ovo* — в куриных или других птичьих яйцах. Так выращивают, например, вирусы гриппа, желтой лихорадки и другие.

Выращивание массы патогенов в первичных культурах клеток из тканей животных освоили с середины XX века. С 1949 г. по предложению J.F. Enders в первичных культурах клеток почки обезьян начали выращивать вакцинный вирус полиомиелита. В неко-

торых странах в культурах клеток почки обезьян выращивали вирус оспы. В первичных культурах фибробластов куриных эмбрионов выращивают вакцинные вирусы кори, паротита, бешенства.

И содержание животных, и организация инкубаторов для многих тысяч яиц весьма затратны при массовом производстве вакцин. По заключениям производителей легче и выгоднее оказалось выращивать массовые количества микробных патогенов в перевивных трансформированных линиях клеток, к чему и приступили с начала 2000-х годов производители вакцин в США и Европе.

В открытых публикациях называют клетки Vero — трансформированные клетки почки зеленой африканской обезьяны, которые используют в производстве вакцинных штаммов вирусов полиомиелита и ротавирусов: Ixiaro®, Imojev®, Ipol®, Rotateq®, Rotarix®.

Используют в технологиях производства ряда вакцин перевивные клетки линий WI-38 (диплоидные клетки легкого человека, США), MRC-5 (диплоидные клетки легкого человека, Англия). Клетки WI-38 используют для производства вакцинных штаммов вируса краснухи в составе комплексного вакцинного препарата M-M-R II. Клетки MRC-5 используют для производства вакцинных штаммов вирусов варицеллы, гепатита А, полиовируса и вируса бешенства (Varivax®, Vaqta®, Havrix®, Imovax®, Poliovox®, FRhL-2 для Rotashield®). В банках перевивных клеток для производства вакцин есть также предложение линии MDCK из клеток почки собаки. Эти клетки используют в производстве противогриппозных вакцин Optaflu®, Celtura®, Flucelvac®.

Продолжают работы по созданию в качестве субстратов (платформ) для производства вакцин перевивных рекомбинантных клеточных линий, представляющих собой не спонтанно трансформированные клетки человека и животных, а целенаправленно трансфицированные вирусными или клеточными онкогенами клетки в целях их иммортализации. В качестве примера приводят линии клеток PER.C6®, AGEL1.CR®, CAP®, EB66®.

Обратим внимание только на то, что в отношении вакцин, производимых по вышеназванным технологиям, невозможно ни знать точный состав вакцинных препаратов, включая неустраняемые технологические примеси в виде онковирусов, ретровирусов и др., ни отделить искомым вакцинный патоген от технологических примесных потенциальных патогенов.

Технологии наработки рекомбинантных белков и их производных в качестве субъединичных вакцин или вирусоподобных частиц вначале базировались на биотехнологических платформах бактерий, в первую

очередь *E. coli*. В качестве эукариотических клеточных платформ начали использовать одноклеточные грибы. Прототипной рекомбинантной вакциной, нарабатываемой в грибах *Saccharomyces cerevisiae*, стал белок вируса гепатита В — HBsAg, представляющий собой гидрофобный липопротеин из 226 аминокислот, самособирающийся в клетках грибов в вирусоподобные частицы — VLP. Разработаны и системы экспрессии заданных антигенов в одноклеточных грибах *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*. Создание рекомбинантных микроорганизмов сопряжено с риском их неуправляемого распространения в биосфере и, соответственно, инфицирование ими людей и животных, на которое никто не рассчитывал. По-видимому, главным образом по этой причине биотехнологи разрабатывают и иные платформы, не инфекционные по природе. Исследуют возможности наработки вакцинных препаратов в неодноклеточных грибах *Agaricus bisporus*, в водорослях *Chlamydomonas reinhardtii*, в растениях, например в водяной *Lemna* и др. В качестве векторов экспрессии в растениях используют растительные РНК-содержащие вирусы: *Tobacco mosaic virus*; *Potato virus X*; *Alfalfa mosaic virus*; *Cowpea mosaic virus*. Вакцинные препараты из растительных платформ в настоящее время находятся только на стадии экспериментальных исследований. На эту тему опубликованы работы по рекомбинантным антигенам энтеротоксигенной *E. coli* (Lt-B Ag), *Bacillus anthracis*, *Norwalk virus capsid protein*, HBsAg, RSV и ряд других, включая полиовирус и вирус гепатита С.

Без использования биотехнологических платформ получить вакцинные препараты в виде отдельных молекул и, соответственно, без неустраняемых технологических биопримесей можно химическим синтезом. Главная и самая большая трудность такого направления — поиск протективных эпитопов, а также эффективных и безопасных адъювантов. Но и полученных по уже внедренным вышеназванным биотехнологиям число лицензированных вакцин в мире составляет всего 25—30, причем далеко не все лицензированные вакцины предназначены для массового применения.

В любом варианте число вакцин несопоставимо меньше числа инфекционных болезней. Во многих странах и в настоящее время национальные календари прививок включают всего 4—6 традиционных вакцин от «детских инфекций» (вирусов кори, паротита, краснухи, экзотоксинов дифтерийной и столбнячной палочек). Относительно недавно предложенные вакцинные препараты — полисахаридные компоненты *Haemophilus influenzae* и *Neisseria meningitidis*, конъюгированные с белковыми молекулами-носителями, рекомбинантные антигены двух субтипов HPV (*Hum*

*man papillomavirus*) (Gardasil®), VLP, содержащий HBsAg антиген HBV не являются пока что повсеместно признанными. Более существенно, что никому не удастся до сих пор получить протективные вакцины против так называемых социально-значимых эпидемических, и даже пандемических заболеваний, таких, как ВИЧ-инфекция, туберкулез и малярия. Нет вакцин ни против одной из венерических инфекций, против лейкозов вирусной этиологии, т.е. болезней, затрагивающих большое число людей и которые, в первую очередь ВИЧ-инфекцию, ВОЗ в последние 30 лет классифицирует как глобальный кризис здоровья человечества.

В заключение скажем, что вакцинация — это моделирование инфекции в предполагаемо безопасном варианте. При инфекциях «дикого типа» у человека, конечно, возможны и бывают осложнения инфекционного заболевания. Однако вакцины содержат нечто новое по сравнению с инфекциями «дикого типа». При вакцинации специфического инфекционного заболевания не ожидают, но в отличие от «дикой инфекции» вакцинные препараты могут содержать (или не могут не содержать) неидентифицируемые технологические примесные, в том числе и инфекционные патогены, привносимые из производственных биоплатформ. Межвидовая трансмиссия инфекций с животного материала человеку — это природное, распространенное и давно известное явление. Цель этого краткого обзора — привлечь внимание современной медицинской науки к обозначенной проблеме, в первую очередь в отношении вакцинных препаратов, предназначенных для применения на детях. Фундаментальная иммунология — наука молодая, не канонизированная, наши знания — «капля в море незнания» и уже, казалось бы, имеющиеся знания довольно быстро меняются. Есть немало примеров прикладных внедрений, опережающих формирование научных представлений о природных механизмах развития иммунного ответа, иммунологической памяти, иммунопатогенетических механизмах развития многих видов заболеваний. Стратегия в отношении вакцинации детей подразумевает особую ответственность, поскольку сами дети не принимают решения, они целиком в руках взрослых. Из детей вырастают все взрослые — производительные и демографические силы страны и всего человечества. Предложения по применению для введения детям продуктов опухолевых клеток, в том числе и вакцин, требуют серьезного обдумывания. Вакцинация взрослых, как правило, имеет другие цели и задачи, главным образом потому, что взрослые сами принимают решения, как например, в случае запланированной работы в регионах, где зафиксированы случаи особо опасных инфекционных заболеваний.



### References

1. Khaitov R.M., Ignateva G.A., Sidorovich I.G. Immunology: in normal physiology and in pathology. Textbook for medical students, 3rd ed., Moscow: Meditsina; 2010. 751 pp. (in Russian)
2. Miller N.Z. Vaccines: are they really safe and effective. Santa Fe, New Mexico: New Atlantean Press; 2015. 127 p.p.
3. Largent M.A. Vaccine. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2012, 222 p.p.
4. B.R. Bloom, P-H Lambert, eds. The Vaccine Book. San Diego, London: Academic Press; 2003. 436 pp.
5. P.Wen, R. Ellis, N.S. Pujar, eds. Vaccine Development and Manufacturing. Hoboken, New Jersey: WILEY; 2015. 523 pp.
6. Ignateva G.A., Maksutov A.Z., Lvov V.L. Experimental research the vaccines to fast modifying pathogens: multi-epitope antigens and new adjuvants. Экспериментальное исследование кандидатных вакцин против изменчивых или множественных патогенов: мультиэпитопные антигены и новые рецептор-направленные адъюванты. Ж-л Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2011; № 3: 5-9 (in Russian)
7. Ignateva G.A., Ignatev T.I. Biological properties of immunoadjuvants: historical and modern knowleges. Physiology and pathology of the Immune system Биологические свойства иммуноадъювантов: история вопроса и современные представления. Physiology and pathology of the Immune system. 2010; № 1: 15-21 (in Russian)