

Применение эндонуклеазы при производстве инактивированной вакцины против SARS-CoV-2

Василенко Владислав Евгеньевич

Выпускник (магистр)

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Факультет инженерной химии (ФИХ), Москва, Россия

E-mail: vasilenko_ve@chumakovs.su

Актуальность. При разработке современных инактивированных вирусных вакцин в качестве культуры-продуцента используют перевиваемые клеточные линии, в частности, культуру клеток Vero. В случае цитопатогенного вируса, например, SARS-CoV-2 или вируса полиомиелита, клеточная ДНК в большом количестве присутствует в вирусной суспензии и её концентратах. Содержание остаточной клеточной ДНК в конечном фармацевтическом продукте строго регламентировано, и по рекомендации ВОЗ не может превышать 10 нг в дозе вакцины. Снижение количества этого балластного компонента возможно при использовании ионообменной хроматографии или ферментативной очистки с помощью эндонуклеаз. Отработка процесса использования эндонуклеаз для очистки полуфабриката вакцин от клеточной ДНК позволит получать более качественный фармацевтический продукт без существенного удлинения технологического процесса, повышения трудозатрат и снижения выхода целевого продукта.

Цель. Определить оптимальные условия использования эндонуклеазы для снижения содержания остаточной клеточной ДНК в полуфабрикате вакцин на примере вирусной суспензии SARS-CoV-2 полученной в клетках Vero.

Материалы и методы. Клеточную линию Vero культивировали на микроносителях Cytodex 3 в биореакторе в питательной среде Игла MEM с добавлением 7% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМоль/л глутамин. Полученную культуру клеток заражали вирусом SARS-CoV-2 с множественностью заражения 0,03 ТЦД₅₀/кл, полученную вирусную суспензию инактивировали с помощью β -пропиолактона. Далее проводили осветляющую и тангенциальную фильтрацию, в результате чего получали концентрат инактивированного вируса SARS-CoV-2. Эндонуклеазу добавляли в концентрат и вирусосодержащую жидкость. Реакцию проводили при различной концентрации эндонуклеаз Benzonase и Dreamnase (2,5 и 1,0 ед/мл), времени и температуре инкубирования. После завершения реакции проводили эксклюзионную хроматографию. Анализировали содержание ДНК с помощью ПЦР в режиме реального времени и электрофореза в агарозном геле.

Результаты. Добавление эндонуклеазы в вирусосодержащую жидкость не целесообразно, в виду большого расхода фермента и низкой эффективности его работы в этих условиях. Наиболее эффективно удаление остаточной клеточной ДНК происходит при добавлении эндонуклеаз в концентрации 2,5 ед/мл в концентрат вирусной суспензии и инкубации в течение 14 часов при температуре 2-8 °С. Концентрация балластной ДНК клеток Vero снизилась в 7-10 раз.

Выводы. Метод очистки от ДНК клеток Vero с помощью эндонуклеаз может быть использован при производстве инактивированной вакцины против SARS-CoV-2. Ферментативная очистка может осуществляться на стадии получения концентрата вирусной суспензии перед хроматографической очисткой.