

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ІННОВАЦІЙНИХ  
ОСВІТНІХ ТЕХНОЛОГІЙ  
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ  
Завідувач випускової кафедри  
\_\_\_\_\_ М.М. Барановський  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

## ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА  
ЗА СПЕЦІАЛІЗАЦІЄЮ «ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

**Тема: «Удосконалення технології отримання протигрипозної вакцини «Грипол»»**

Виконавець: студент групи 204м Матюхін Іван Володимирович

\_\_\_\_\_ (підпис)

Керівник: к.т.н., доцент Решетняк Людмила Расулівна

\_\_\_\_\_ (підпис)

Консультант з розділу «Охорона праці»:

\_\_\_\_\_ (підпис)

Павлиш В. Д.

Консультант з розділу  
«Охорона навколишнього середовища»:

\_\_\_\_\_ (підпис)

Бовсуновський Є. О.

Нормоконтролер:

\_\_\_\_\_ (підпис)

Лазарєв В. Г.

Київ 2020

# НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Навчально-науковий інститут інноваційних освітніх технологій

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Напрямок (спеціальність, спеціалізація): 162 «Біотехнології та біоінженерія»,  
(шифр, найменування)

«Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач випускової кафедри

\_\_\_\_\_ М.М. Барановський

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

## ЗАВДАННЯ

**на виконання дипломної роботи**

Матюхін Іван Володимирович

(П.І.Б випускника)

1. Тема роботи «Удосконалення технології отримання протигрипозної вакцини «Грипол» затверджена наказом ректора від «16» листопада 2019 р. № 2390/ст.
2. Термін виконання роботи: з «14» жовтня 2019р. по «29» грудня 2019 р.
3. Вихідні дані роботи: основні вимоги до фармацевтичної розробки лікарських засобів; особливості технології отримання вакцин; вплив технології отримання лікарського засобу на його якість.
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового ілюстративного матеріалу: **5 таблиць, 2 рисунки.**

## 6. Календарний план-графік

№ з/п	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Літературний огляд та збір інформації за темою дипломної роботи	14.10.19–28.11.19	
2	Написання основної частини	29.11.19–13.12.19	
3	Формулювання висновків та рекомендацій	13.12.19–17.12.19	
4	Оформлення роботи	24.12.19–14.01.20	
5	Перевірка дипломної роботи керівником	15.01.20–20.01.20	
6	Кінцеве оформлення роботи	20.01.20–31.01.20	
7	Захист дипломної роботи	03.02.2020	

## 7. Консультація з окремих розділів:

Назва розділу	Консультант (посада, П.І.Б.)	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	ст. викладач Павлиш В.Д.		
Охорона навколишнього середовища	к.т.н., доцент Бовсуновський Є. О.		

8. Дата видачі завдання « 20 » листопада 2019 р.

Керівник дипломної роботи:

\_\_\_\_\_  
(підпис керівника)

Решетняк Л. Р.

(П.І.Б.)

Завдання прийняв до виконання:

\_\_\_\_\_  
(підпис випускника)

Матюхін І. В.

(П.І.Б.)

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Удосконалення технології отримання протигрипозної вакцини «Грипол»: 101 с., 2 рис., 5 табл., 77 літературних джерел.

Об'єкт дослідження: технологія отримання протигрипозної вакцини «Грипол».

Предмет дослідження: протигрипозної вакцини «Грипол» у суспензійному стані.

Мета дипломної роботи: удосконалити технологію отримання протигрипозної вакцини «Грипол».

Методи дослідження: під час виконання роботи використовувалися фізико-хімічні, фармако-технологічні, математичні, мікробіологічні.

Результати магістерської роботи рекомендується використовувати під час промислового виробництва лікарського засобу.

ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ, ЛІКАРСЬКИЙ ПРЕПАРАТ, ТЕХНОЛОГІЯ, АКТИВНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ІНГРЕДІЄНТ, ДОПОМІЖНА РЕЧОВИНА, ВОЛОГЕ ГРАНУЛЮВАННЯ, МЕТОД ВОЛОГОГО ГРАНУЛЮВАННЯ У ВСЕВДОЗРІДЖЕНОМУ ШАРІ

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ.....	7
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	11
1.1 Аналіз стану проблеми.....	11
1.1.1 Відкриття збудників грипу, мінливість та еволюція грипозних вірусів.....	11
1.1.2. Структура та властивості вірусів грипу.....	16
1.1.2. Походження збудників епідемії.....	19
1.1.3 Особливості сучасної епідемії.....	21
1.1.4. Епідеміологія.....	21
1.1.5. Патогенез.....	22
1.1.6. Клінічна картина.....	23
1.2. Грипозні вакцини і профілактика щеплення ними.....	27
1.2.1. Порівняльна характеристика сучасних грипозних вакцин.....	31
1.2.2. Технологія та розуміння спліт вакцини.....	32
1.2.3. Технологія та розуміння субодиночних вакцин.....	33
1.2.4. Порівняльна характеристика спліт-вакцини та субодиночної вакцини.....	33
1.2.5. Антигенний (штамовий) склад вакцин.....	35
1.2.6. Вікові категорії прищеплений, загальна схема вакцинації.....	36
1.3. Системи культивування вірусів.....	38
1.3.1. Апаратура, що використовується при промисловому культивуванні вірусів.....	38
1.3.2. Клітини як основа для культивування вірусів.....	39
1.3.2.1. Ролерні та моношарові культури клітин.....	42
1.3.2.2. Гетерогенні системи культивування моношарових клітин....	45
1.3.2.3. Перфузійні системи.....	46
1.3.2.4. Суспензійні культури клітин.....	46
РОЗДІЛ 2. Технологічна частина.....	57

2.1. Характеристика вакцини Грипол.....	57
2.2. Методи контролю.....	60
2.3. Створення штаму для приготування вакцини Грипол.....	68
2.4. Технологія одержання вакцини Грипол.....	71
Висновки.....	94
Список використаної літератури.....	95

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ**

GMP (Good Manufacturing Practice) – Належна виробнича практика

АНД – аналітично-нормативний документ

ДФУ – Державна фармакопея України

ЛЗ – лікарські засоби

ЛП – лікарський препарат

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

ГЛЗ – готовий лікарський засіб

ЛС – лабораторна серія

ЛФ – лікарська форма

ДПС – дослідно-промислова серія

ПС – промислова серія

МКЯ ГЛЗ – методи контролю якості готового лікарського засобу

НД – нормативний документ

СЗ – стандартний зразок

## ВСТУП

Міжнародні експерти в галузі біотехнологічних наукових досліджень, інтелектуальної власності та економічної політики на Всесвітньому біотехнологічному форумі одноставно визначили, що людство в ХХІ ст. завдяки сучасним біотехнологіям отримало надзвичайні можливості щодо вирішення соціальних проблем, пов'язаних з харчуванням зростаючого населення планети, підтримкою здоров'я людини і навколишнього середовища, поповненням джерел енергії та природних ресурсів.

В наш час стрімко розвивається біотехнологія як джерело отримання лікарських засобів. Спектр препаратів, які отримують біотехнологічним шляхом досить великий. Це антибіотики, ферменти, гормони, вітаміни, пробіотики, а також вакцини.

Вакцини застосовуються для профілактики та лікування багатьох інфекційних захворювань. Вакцини – це імунобіологічні препарати, що застосовують для створення активного специфічного імунітету. Діючою речовиною вакцин є специфічний антиген. Як антигени використовують живі або інактивовані мікроорганізми (бактерії, віруси); виділені з мікроорганізмів специфічні, так звані протективні антигени; утворювані мікроорганізмами антигенні речовини (вторинні метаболіти) – токсини; хімічно синтезовані антигени, аналогічні природнім; антигени, одержані методами генної інженерії. Вакцини можуть бути з успіхом використані для лікування та профілактики гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ), зокрема грипу.

Протягом тривалого часу грип залишається серйозною проблемою для більшості країн світу. Під час епідеміологічного сезону на грип хворіють близько десяти відсотків населення земної кулі, тобто більше 500 млн. чоловік [9].

Під час пандемії це число може зростати в 4-5 разів. Якщо порівняти всі інфекційні хвороби по відношенню до грипу, порівнявши збиток, що заподіюється грипоною інфекцією за 100 %, то з даного аналізу, проведеного в США видно, що збиток заподіяний цією інфекцією значно вищий, ніж від будь-якого іншого



інфекційного захворювання. Тому важливе значення має не лише лікування грипу, а й профілактика цього захворювання серед населення міст, яке належить до групи підвищеного ризику захворювання за рахунок щільного контакту.

Високий рівень скупчення людей сприяє швидкому поширенню інфекції, в зв'язку з чим знижується рівень навчального та виробничого процесу. Саме тому досить актуальною є розробка оптимальної тактики вакцинопрофілактики грипу серед школярів та студентів, військовослужбовців.

В даний час в світі існує великий набір грипозних вакцин. Так, у нашій та багатьох країнах світу випускаються і постійно удосконалюються живі (ЖГВ) і інактивовані (ІГВ) – вакцина Грипол. За кордоном застосовуються як субодиночні – Інфлувак, так і спліт-вакцини – Ваксигрип, Флюарикс та Бегривак [4].

В полімер-суб'єдинична вакцина Грипол, яка є об'єктом нашого дослідження, на практиці реалізовано принцип створення кон'югованих антиген-полімерних вакцин, що полягає в структурному об'єднанні антигенних детермінант з високомолекулярним носієм-імуномодулятором. У механізмі розвитку поствакцинального імунітету при грипі саме антитіла до гемаглютиніну і нейрамінідази забезпечують захист, мають віруснейтралізуючою активністю, перешкоджають поширенню вірусу в інфікованому організмі і послабляє гостроту захворювання. Також у вакцині реалізована модифікація поверхневих білків гемаглютиніну і нейрамінідази, а також використання високомолекулярних імуностимуляторів для посилення імуногенної активності субодиночок протективних антигенів та наближення презентації антигенів до природної за рахунок утворення багатокомпонентних сполук віріоноподібних полімер-антигенних структур. У цій вакцині вирішена проблема подолання проблеми зниження опірності організму до гетерологічних антигенів в період формування специфічного імунітету проти грипу.

Вакцина Грипол являє собою стерильний очищений від домішок невіріонного походження кон'югат-поверхневих протективних білків гемаглютиніну і нейрамінідази трьох вірусів грипу підтипів А(Н1N1), А(Н3N1) і типу В, з високомолекулярним носієм – імуностимулятором та імуномодулятором поліоксидонієм. У прищепної дозі вакцини міститься по 5 мкг гемаглютиніну кожного

з трьох штамів вірусів грипу та 500 мкг поліоксидонію. Наявність в препараті поліоксидонію забезпечує більшу стабільність антигенів, підвищення імуногенності при зниженні прищепної дози антигенів в 3 рази, більш ефективне формування імунологічної пам'яті до антигенів вірусів грипу, безпека при застосуванні.

Категорія осіб підвищеного ризику захворювання на грип та ГРВІ, зокрема повторне, це 10-20 % людей, щільно контактуючих в соціумі. З них більше 50 %, від сумарної захворюваності та втрати працездатності, мають ускладнення. Спеціальні дослідження природи цієї виборчої схильності розкрили зв'язок її з особливостями гено- і фенотиповою імунорезистентністю людей, переважно з дефіцитністю Т-лімфоцитарної ланки і факторів протівірусної резистентності [25]. Перспективною стратегією боротьби з грипом та іншими ГРВІ є поєднання планової імунізації полівалентною інактивованою вакциною з динамічним лікарським наглядом за категорією високого ризику захворювання на ГРВІ та проведенням оздоровчих заходів відносно до них у міжепідемічний період. Природно, було б нереально припускати, що грип може бути ліквідований за допомогою вакцинації, однак при правильній стратегії боротьби з грипом збиток, що заподіюється цією інфекцією для здорових людей і економіки суспільства в цілому, може бути істотно знижений.

У зв'язку з викладеними даними залишаються актуальними дослідження та удосконалення спрямовані на розробку тактики імунізації учнів та військовослужбовців різними вакцинами проти грипу, виходячи з типів препаратів, їх нешкідливості, реактогенності, ефективності в рамках індивідуальних або масових щеплень проти грипу.

**Метою даної** роботи є реалізація технології одержання вакцини Грипол. Дана вакцина, порівняно спліт-вакцинами, має низьку реактогенність, цілком безпечна, викликає високий імунологічний відповідь до 3-х штамів вірусів грипу і забезпечує захист від грипу більше 70 % щеплених, при цьому відзначено зниження захворюваності ГРВІ та інших інфекцій верхніх дихальних шляхів серед щеплених цією вакциною.

**Новизна роботи** полягає в тому, що розроблений штам вірусу грипу А/17/Потсдам/86/92, що дозволяє одержувати полімер-суб'єдиничну вакцину Грипол,

яка має меншу шкідливість та ректогенність в наслідок очищення від домішок невіріонного походження кон'югат-поверхневих протективних білків гемаглютиніну і нейрамінідази трьох вірусів грипу підтипів. Також до складу вакцини входить високомолекулярний носій – імуностимулятор та імуномодулятор поліоксідоній [31].

## РОЗДІЛ 1

### ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

#### 1.1 Аналіз стану проблеми

##### 1.1.1 Відкриття збудників грипу, мінливість та еволюція грипозних вірусів

Назва хвороби — «грип» — походить від французького слова «*grippe*» (нападати, охоплювати) і відбиває епідеміологічні особливості цієї інфекції. У побути цю інфекцію називали інфлюенцою, що латинською мовою означає — вливатись, вторгатись.

Грип – інфекційна хвороба, що протікає з переважаючим враженням слизової оболонки дихальних шляхів і явищами загальної інтоксикації з підвищенням температури тіла, слабкістю, головним болем, м'язовими і суглобовими болями.

Віруси грипу відносяться до ортоміксовірусів і підрозділяються на серологічні типи А, В і С.

Вірус типу А відрізняється значною антигенною мінливістю, що призвело до появи нових підтипів (А1, А2) і штамів викликаючих епідемії кожних 2-3 роки та пандемії один раз в 10-30 років [3].

Віруси типу В і С характеризуються більшою стабільністю. Вірус типу В може зумовити епідемію через 3-4 роки. Вірус типу С – лиш поодинокі захворювання або обмежені спалахи.

Стійкість вірусів грипу в навколишньому середовищі невелика. Висока температура висушування, сонячне світло швидко вбивають їх. Більш стійкі ці віруси до низьких температур [3].

**Історичні аспекти.** Збудником грипу є вірус, вперше відкритий групою англійських вчених: В. Смітом, К. Ендрюсом та Лейд-Лоу — під час епідемії хвороби в Англії.

Один з дослідників В.Сміт захворів на грип, його колеги взяли з носоглотки хворого змив, профільтрували через фільтр і заразили фільтратом рідкісних піддослідних тварин — білих африканських тхорів.

Через 1-2 дні тварини захворіли: втратили апетит, почали чхати, у них підвищилась температура, заявився нежить. Від хворих тхорів заразилися здорові, і серед тварин почалася епідемія грипу [6].

Із виділень трахеї хворих тхорів дослідники виділили збудника, якого за ім'ям Вільсона Сміта було названо вірусом грипу WS, що увійшов в історію розвитку науки.

Згодом рідкісних африканських тхорів із експериментів витіснили білі миші, що виявилися не менш чутливими до вірусу грипу. Саме на мишах в 1936-1937 рр. О.О. Смородінцев у Ленінграді та Л.А. Зільбер у Москві виділили перші вітчизняні штами вірусів грипу. Остаточні висновки про походження грипу було розроблено лише після того, як О.О. Смородінцев матеріалом від хворих тхорів і мишей заразив добровольців і в них розвинулись ознаки грипу [3].

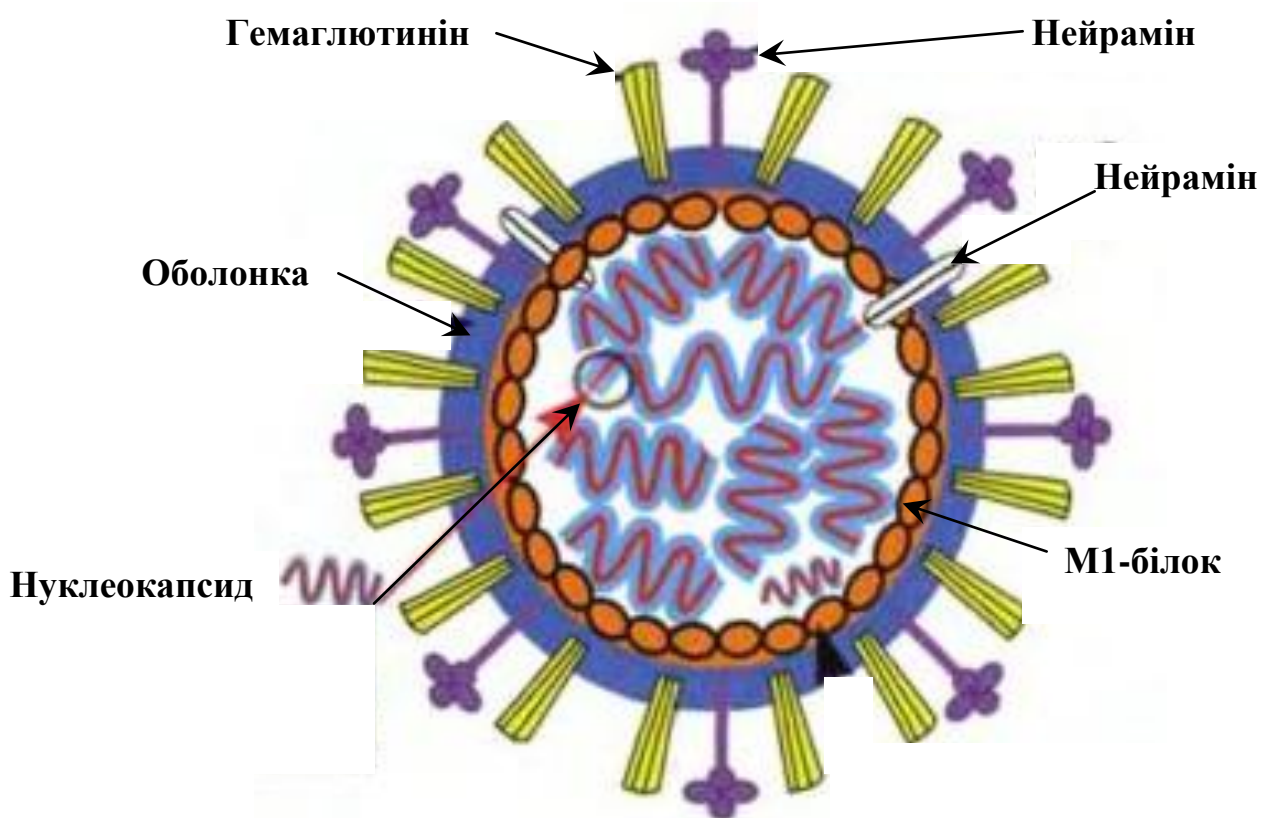
У наступні роки віруси грипу були виділені від хворих людей у різних країнах і містах. Більшість із них одержали назву міста, де їх вперше виділили.

Історія відкриття збудника грипу відбиває етапи розвитку вітчизняної біології. У період мікробіології, науки про мікроби, бактерії, двоє вчених – М.І. Афанасьєв та Р. Пфейфер — майже одночасно із слизу носоглотки хворого на грип виростили на живильному середовищі бактерію у формі палички і класифікували її як збудника грипу. Її було названо паличкою інфлюенци Афанасьєва — Пфейфера. Протягом 10 років паличку інфлюенци вважали збудником грипу [6,3].

Ще довгі роки (до 1933 р.) паличку Афанасьєва-Пфейфера вважали збудником грипу.

У 1940 р. під час епідемії грипу від хворої людини було виділено вірус, дуже схожий на вірус грипу, але дещо відмінний від нього. Назвали його вірусом грипу В. Пізніше, через 7 років, Р. Тейлор відкрив ще один вірус, подібний до збудника грипу, що відрізнявся від вірусів, виділених у 1933 і 1940 рр., і назвав його вірусом С.

Отже, існують три самостійні типи вірусів грипу — А, В, С. Вони утворюють родину ортоміксовірусів і мають характерну структуру, тобто всі вони збудовані за єдиним принципом [11].



**Рис. 1.1. Будова вірусу грипу**

Зовні вірусна частинка вкрита білковою оболонкою, яка складається головним чином із випнутих шипів, що утворюють своєрідний паспорт вірусу. Це так звані оболонкові антигени вірусу грипу гемаглютинін та нейрамідіназа. Співвідношення між ними на поверхні вірусу становить 3:1. Тепер науково доведено, що вирішальна роль у розвитку інфекції та епідемічному її поширенні належить білку гемаглютинін (Рис 1.1.).

Зовнішня оболонка захищає центральну частину вірусу — нуклеокапсид, представлений скрученим у спіраль ланцюжком рибонуклеїнової кислоти (РНК) і покритій внутрішнім шаром білкових молекул. Це геном вірусу, його відтворюючий механізм, який передає за спадковістю всі властивості вірусу збудника хвороби [11,10].

Незважаючи на таку складну будову, вірус грипу надзвичайно малий за розміром, його можна побачити лише під електронним мікроскопом при збільшенні в 300-500 тисяч разів.

Здавалось, будова вірусу і функції окремих його складових частин вивчені достатньою мірою. Що відбувається в організмі після проникнення вірусу в клітини — також відомо, однак таємниць, пов'язаних з природою вірусу грипу, не зменшилось. Справа в тому, що цей вірус має одну, надзвичайно унікальну властивість — він постійно змінюється. Змінюються не всі його компоненти, а лише поверхневі білки-антигени гемаглютиніни та нейрамін [12].

Щоб краще зрозуміти природу мінливості вірусу грипу, розглянемо схему його еволюції за роки, що минули з часу відкриття збудника.

У 1933 р. був виділений перший вірус грипу, позначений символами своїх антигенів — білків: вірус А(Н0N1), де Н0 — гемаглютинін нульового типу, N1 — нейрамінідаза першого типу.

Наступне поглиблене вивчення збудників, виділених у різні роки в різних країнах, виявило, що віруси грипу відрізняються за складом гемаглютиніну і нейрамінідази [11].

Існує 11 типів гемаглютиніну та 8 типів нейромінідази. Віруси грипу людини містять гемаглютинін першого, другого та третього типів, нейромінідазу тільки першого і другого типів. Віруси грипу птахів мають гемаглютинін четвертого — шостого, восьмого — одинадцятого типів, а нейромінідазу — третього — шостого типів; віруси грипу тварин мають гемаглютинін сьомого типу, нейромінідазу — сьомого і восьмого типів.

Тепер доведено, що зміна типу гемаглютиніну чи нейромінідази (з першого на другий чи третій) супроводиться розвитком пандемії. Саме явище такої різкої зміни антигену має назву «шифт».

Отже, перша пандемія ХХ сторіччя була зумовлена вірусом А(Н0N1), друга (1947-1948 рр.) мала вже зміненого збудника, у якого гемаглютинін нульового типу був замінений на гемаглютинін першого типу; третя пандемія (1957-1958 рр.) була викликана новим типом вірусу, що мав нові обидва антигени: і гемаглютинін, і нейромінідазу — А (Н2N2); остання пандемія (1968-1969 рр.) була спричинена знову новим збудником — вірусом А(Н3N2) [12,11].

Таким чином, за 50 років, які минули від дня відкриття вірусу грипу, відбулося 4 повні зміни збудника грипу. З появою нового його покоління всі попередники, як правило повністю зникали з епідемічного циклу, але залишалися у вигляді так званих «реліктових» форм, які викликали поодинокі захворювання або невеликі спалахи хвороби.

У період між пандеміями майже щорічно зароджувалися й згасали епідемічні хвилі грипу, викликані вірусом, який був причиною пандемії. Проте помічено, що кожен епідемію обумовлює вірус, який частково відрізняється від свого попередника, але в цілому не виходить за рамки шифтового варіанту, названого серотипом вірусу.

### **1.1.2. Структура та властивості вірусів грипу**

Грип та ГРВІ займають провідну роль у структурі всієї інфекційної патології. Однак, їх питома вага є неоднаковим і за окремими групами населення і за різними епідсезонами складає наступні показники:

- 1) віруси грипу типу А - 10-20 %,
- 2) віруси грипу типу В - 10-15 %,
- 3) віруси грипу типу С - 1-2 %,
- 4) парагрипозні віруси - 10-12 %,
- 5) респіраторно - синцитіальна інфекція - 8-10%,
- 6) аденовіруси - 10-12%,
- 7) коронавіруси - 3-5%,
- 8) риновіруси - 10-20 %,
- 9) ентеровіруси - 5-10 %,
- 10) реовірус - 1-2 %,
- 11) мікоплазми пневмонії та інші мікоплазмози дихальних шляхів - 15-20 %.

Серед ГРЗ і ГРВІ значне місце займають змішані мікс-інфекції.

Епідемічне значення вірусів групи ГРВІ також неравнозначно. Найбільше значення мають віруси грипу типу А через здатність до розвитку епідемічних та пандемічних форм захворювання, типу В, як збудника спалахів та епідемій, а так само РС-віруси, що викликають епідемічні підйоми і осередкові захворювання в



осінньо-зимовий період, у той час як для інших вірусів групи ГРВІ характерна захворюваність у формі локальних спалахів в організованих колективах або спорадичних випадків [1, 43].

Така структурна організація визначає різноманіття вірусів грипу та особливості епідеміології викликаних ними інфекцій. Віруси грипу відносяться до сімейства ортоміксовіруси і класифікують за трьома біологічно подібним, але різним за антигенною структурою типам А, В і С. Вони не володіють загальними антигенами і, таким чином, не викликають перехресний імунітет, не викликають змішаних рекомбінантів і мають різне епідеміологічне поширення.

Віруси грипу А на відміну від вірусів грипу В і С представлені великим різноманіттям: у тварин віруси грипу А представлені типами гемаглютиніну від 1 до 15, а нейрамінідази від 1 до 9, відомих у даний час. У той же час у людини спектр циркулюючих вірусів грипу А обмежений тільки трьома підтипами - Н1Н1, Н2Н2, Н3Н2.

Характери розвитку епідемічного процесу в групах сприйнятливих господарів до вірусів грипу А, В і С так само є відмінними один від одного.

Так, віруси грипу типу А можуть викликати пандемічні, епідемічні і ендемічні форми у всіх вікових групах людей, військовослужбовців строкової служби та військовослужбовців за контрактом, а також викликати великі епізоотії у птахів і ссавців.

Віруси грипу типу В викликають епідемічні і ендемічні форми захворювання тільки у людей, частіше у дітей, підлітків та військовослужбовців строкової служби.

Віруси грипу типу С діагностуються набагато рідше, ніколи не викликали великих епідемій, зустрічаються в основному в спорадичних випадках і при локальних спалахах у дітей [ 23].

Геном вірусу складається з 8 фрагментів, окремих ділянок РНК, котрі програмують утворення вірусної частинки. Кожен ген відповідає за синтез відповідного білка. Гени і білки вірусу мають однакові назви і позначаються латинськими літерами, тому в спеціальній науковій літературі оперують такими

символами: гени PB1, PB2, NA, NP, HA, M, NS. Кожен з них виконує певну функцію, пов'язану з будовою РНК та білків.

Явище часткової зміни гемаглютиніну та нейромінідази носить назву «дрейф».

Виявилося, що вірус грипу в епідемічному процесі змінює антигенну будову гемаглютиніну та нейромінідази, щоб вижити як біологічному виду.

Оскільки вірус грипу одночасно вражає величезну кількість населення і в перші роки після пандемії, як правило, у кожного формується імунітет, тобто в крові з'являються антитіла, які захищають організм від дії вірусу.

Тому збудникові грипу доводиться пристосуватися до антитіл таким чином, щоб вони не перешкоджали розвитку інфекції в організмі людини. Для цього йому досить дещо змінити будову своєї оболонки. Незважаючи на наявність у крові антитіл, збудник знову стає здатним викликати хворобу.

Механізми дрейфу до кінця не вивчені, тому передбачити кожен наступну зміну вірусу поки що неможливо, через що й боротьба з грипом до цього часу не дала бажаних наслідків [5].

Серед усіх вивчених збудників грипу вірус А — найбільш активний, вірус С — найменш активний (викликає хворобу переважно у дітей молодшого віку).

Природа мінливості вірусу грипу стала, по суті, однією з найактуальніших у проблемі боротьби з цією хворобою, і її вирішення дасть ключі до розгадки основної таємниці збудника грипу — механізму, який призводить до часткової чи повної зміни поверхневих антигенів його оболонки [6].

Невідомо також, де зберігаються віруси грипу в період між епідеміями (навесні, влітку, восени), коли немає хворих на грип. Це питання давно хвилює епідеміологів, бо відповідь на нього дасть змогу з'ясувати й інші, не менш важливі питання: як утворюються пандемічні віруси грипу, чому формуються нові варіанти збудника.

Сьогодні існують дві точки зору вчених щодо місця зберігання вірусу грипу. Одні вважають, що тільки людина може бути постійним джерелом (резервуаром) його. При безпосередній взаємодії вірусу і людини, в крові якої містяться проти-

грипові антитіла, відбувається відбір, селекція тих вірусів, які, пристосувавшись, змінили якість своїх антигенів і знову стали агресивними. І все це відбувається тільки в організмі людини. Прихильники цього погляду вважають, що віруси грипу людини являють собою самостійну родину вірусів, споріднених за своїми властивостями з вірусами грипу птахів та тварин [12].

Виявилось, що віруси грипу мають багато «родичів» і найближчий з них — вірус грипу свиней. В період, коли ще невідомий був вірус грипу, паличці інфлюенци Афанасьєва — Пфейфера приписували здатність викликати грип у свиней. Докладне вивчення епідемій грипу серед цих тварин показало спорідненість вірусу грипу свиней і вірусу А (H0N1) людини, хоча це й окремі, самостійні штами вірусу грипу. Вони відрізняються своїм гемаглютиніном, тому збудник грипу свиней увійшов в науку як окремий серотип А(HSWN1), де позначення SW походить від латинського слова «*swine*» — свиня.

### **1.1.2. Походження збудників епідемії**

Епідемічні штами вірусів грипу постійно змінюються. Новий збудник може викликати масові захворювання людей різного віку і в різних країнах, призводячи до розвитку пандемії, або ж він вражає порівняно невеликий прошарок населення: епідемія спалахне і швидко згасне. Така поведінка вірусу грипу пояснюється будовою його поверхневої оболонки.

Сучасні методи молекулярної біології дали змогу дослідити всі гени вірусів грипу людини, тварин і птахів. Встановлено, що антигенний дрейф відбувається внаслідок накопичення так званих точкових мутацій, тобто найдрібніших змін у молекулах амінокислот гена. У період епідемії популяцію циркулюючих вірусів складають варіанти, що відрізняються один від одного саме внаслідок виникнення мутацій. Незначна зміна малої частинки антигена може спонукати нечутливість вірусу до нейтралізуючої дії антитіл і розвитку хвороби [3]. Отже, точкові мутації в генах можна розглядати як один з основних еволюційних шляхів дрейфу.

Висловлюється припущення, що повна зміна одного або обох генів поверхневих антигенів, яка призводить до виникнення пандемії грипу, може бути

наслідком рекомбінації (пересортування) генів різних вірусів людини, а можливо, тварин чи птахів. Деякі вчені вважають, що шляхом рекомбінації вірус H2N2 утворюється від вірусу H1N1, тоді як H3N2 є нащадком вірусу H2N2.

Висока мінливість вірусів грипу дає підставу стверджувати, що переміщення генів між окремими варіантами вірусу А постійно відбувається в природі. Незважаючи на те що більшість підтипів вірусу грипу А знайдено у птахів, все ж їх участь у виникненні нових підтипів вірусу грипу людини не доведено [9].

В експерименті на клітинах, вирощених у пробірках, а згодом на тваринах було доведено, що: вірус грипу здатний довгий час перебувати у клітинах, не руйнуючи їх.

Білі миші, що перенесли грипозну інфекцію і видужали, через 2-4 місяці повторно були обстежені. У багатьох з них розвинулась хронічна пневмонія. Спеціально розробленими методами у них вдалося виділити вірус грипу через 2, 4, 6 місяців після перенесеної інфекції.

Отже, вірус може довго жити в організмі і постійно підтримувати в ньому хворобливий стан. Цікаво, що при цьому організм не реагує активно на збудника, вони взаємодіють, не вбиваючи один одного [12].

Вченими було здійснено спробу виділити вірус грипу від хворої на пневмонію людини. Завдання було надзвичайно складним. Минали роки, змінювали один одного методи дослідження і наукові підходи, а бажаних результатів не було. Нарешті прийшов успіх. Від хворих на хронічну пневмонію, які виникли внаслідок перенесеного грипу, виділили віруси грипу і довели, що вони вже довгий час знаходились у тілі людини, а не випадково потрапили туди під час обстеження чи напередодні.

Одержані факти пояснили причину розвитку таких грізних ускладнень грипу, як пневмонія, порушення діяльності нервової системи та ін. Вона полягає в персистенції збудника [8,3].

Отже, вірус грипу не має потреби в пошуках якогось сховища, місця для переховування від епідемії до епідемії, де він вибирає собі нові гени. Збудник грипу може перебувати в нас самих, у клітинах нашого організму, очікуючи слушного часу

для атаки. Час від часу він переходить в активний стан і спричиняє поодинокі випадки захворювання, утворює епідемічний ланцюжок з окремих незначних спалахів хвороби. В цей час відбувається селекція найбільш агресивних варіантів збудника, вірус поступово набирає силу, охоплюючи дедалі більшу кількість сприйнятливих до нього людей. І ось спалахує епідемія.

Поки що такий шлях розвитку інфекції — припущення, але вчені всебічно вивчають цю можливість.

### **1.1.3 Особливості сучасної епідемії**

Науково-технічний прогрес позначився на характері грипозних епідемій. Якщо раніше вони чергувались, змінювались збудники хвороб, то останнім часом під тиском багатьох причин, серед яких на перше місце виступають різке зростання контактів між людьми, швидкий розвиток транспорту, урбанізація населення тощо, віруси не зникають після завершення пандемічного циклу і довше, ніж раніше, залишаються в людському суспільстві. Про це свідчать епідемії останніх років, у розвитку яких брали участь одночасно кілька серотипів вірусів грипу А і В. Вперше це було помічено наприкінці 1976 р., коли на сході нашої країни з'явився вірус грипу А(Н1N1) і не витіснив із циркуляції поширений тоді вірус А(Н3N2). З цього часу обидва віруси разом чи поодиноці викликають епідемії грипу.

В останні роки значно зросла активність вірусу грипу В, який став навідуватись до нас кожні 2-3 роки [6].

### **1.1.4. Епідеміологія**

Джерелом збудників інфекції грипу є хвора людина, особливо в перші 5 днів хвороби. Зараження людей відбувається частіше повітряно-крапельним шляхом.

Вірус виділяється хворим в повітря з вражених клітин епітелію дихальних шляхів, з каплями слини, слизу, мокротиння, при диханні, розмові, кашлі, чханні, рідше передача вірусу відбувається через предмети побуту, (носову хустку, посуд), забруднені виділення хворого, що містять вірус.

Сприйнятливість до грипу дуже висока. Періодичність епідемій залежить від рівня імунітету населення і мінливості антигенних властивостей вірусів. Епідемії грипу, викликана вірусами типу А і В можуть протікати в один і той же час.

Однією з особливостей сучасних грипозних епідемій стало переважне охоплення захворюванням дітей віком до 14 років — саме такого контингенту, який вперше зустрічається з епідемічним варіантом вірусу. Дорослі хворіють рідше і значною мірою цьому ми завдячуємо систематичній вакцинації населення грипозною вакциною [6].

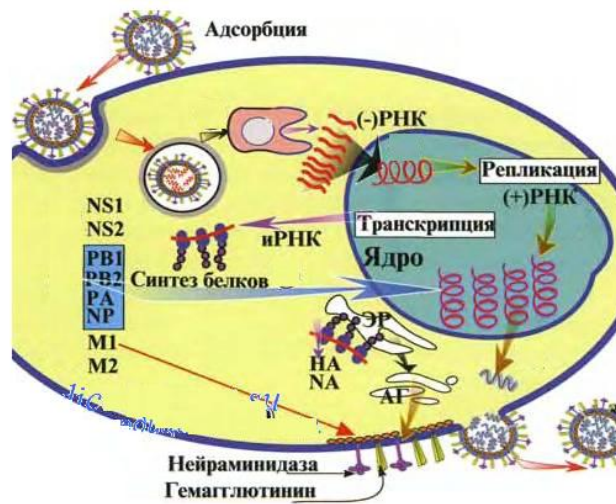
### **1.1.5. Патогенез**

Унікальною властивістю такого виду живих істот як віруси, є те, що вони існують і розмножуються лише в середині живої клітини, але не будь-якої, а тільки тієї, в якій умови для розвитку їх найбільш сприятливі. Для вірусу грипу воротами проникнення в організм людини стали клітини слизової оболонки верхніх дихальних шляхів [6].

Вірус грипу проникає в організм через верхні дихальні шляхи, проникаючи тут в клітини покривного епітелію.

Внутрішньоклітинне розмноження вірусу викликає дистрофічні і некротичні зміни. Клітини епітелію при цьому гинуть, а звільнений вірус проникає в нові клітини, вражаючи їх. Патологічний процес поширюється зверху вниз по ходу дихальних шляхів. Токсичні речовини що виділяються в результаті гибелі вірусів і розпаду епітелію, потрапляють в кров викликаючи пошкодження судинної системи, особливо капілярів [5].

Цикл розвитку вірусу може бути представлений наступною схемою (Рис. 2.2.):



**Рис. 2.2. Цикл розвитку вірусу грипу**

Ступінь пошкодження судин визначає важкість циркуляційних розладів під час грипу, що проявляються кровотечами, а також крововиливами в тканини різних органів (легень, головного мозку), слизові оболонки верхніх дихальних шляхів. Активуюча при зниженні захисних сил організму бактеріальна мікрофлора верхніх дихальних шляхів зумовлює виникнення запальних процесів в різних органах, особливо в легенях.

Імунітет у перехворілих грипом А зберігається 1-3 роки, грипом В – 3-6 років [6].

### **1.1.6. Клінічна картина**

Інкубаційний період триває від 12 год до 3 днів, частіше 1-2 дні. Клінічні прояви хвороби не залежать від типу вірусу, але найважче протікає грип, що викликаний вірусами підтипів А1 і А2.

В типових випадках захворювання починається раптово. Підвищується температура до 38-40 °С. У хворих починається сильний головний біль при русі очей, ломоту у всьому тілі, розбитість, нежить, сльозливість, в'ялість, сонливість, запаморочення голови. В ряді випадків можливе безсоння іноді блювота, втрата свідомості. Можливі крововиливи в шкіру і слизові оболонки носові, маточні, легеневі, шлунково-кишкові кровотечі, виражена задуха, приглушенні тони серця [3].

У більшості хворих спостерігається кашель внаслідок розвитку трахеїту і бронхіту, причому явище трахеїту переважає, тому кашель при грипі болючіший, сухий, мокрота з'являється через декілька днів.

Іноді грип протікає без підвищення температури або без ознак враження верхніх дихальних шляхів. Найбільш частішим ускладненням є пневмонія, яка може бути раннього (перші дні хвороби) і пізнього. Розвиток пневмонії супроводжується погіршенням загального стану, підсиленням задухи, ціанозу, підвищенням температури тіла. Нерідко з'являється біль в грудній клітці, кашель з мокротинням.

Грип часто призводить до загострення хронічних захворювань, наприклад ревматизму.

Діагноз ставиться на даних епідеміологічного аналізу, клінічній картині і результатах лабораторних досліджень. В крові виявляється лейкопенія з відносним лейкоцитозом і моноцитозом ШОЕ – в межах норми або помірно підвищена. При ускладненнях викликаних бактеріальною флорою, спостерігається лейкоцитоз, значно збільшується ШОЕ. Для виділення вірусу з виділень носових шляхів і зіву хворих, беруть мазки з носа або змиви з носоглотки хворого. Для ретроспективної діагностики проводять серологічні дослідження: реакцію зв'язування комплекта з парними виворотками [3].

Під час розмови, чхання чи кашлю з краплинами слизу вірус грипу від хворої людини потрапляє в дихальні шляхи здорової, поверхня яких вкрита шаром клітин, що називається епітелієм. Через оболонку епітеліальної клітини за допомогою спеціальних пристосувань він проникає у внутрішнє середовище клітин. При цьому вірус на поверхні клітини залишає свою оболонку, ніби роздягається. Його білки - антигени гемаглютиніни в клітину не проникають, але тільки з їх участю вірус, як ключем, відмикає «замок» вхідних воріт клітини.

Ферментами клітини розчиняються вірусні білки, що захищають РНК, і вірус починає розмножуватися в клітині. Передусім РНК розпадається на окремі частинки — гени, і кожен з них включається в роботу по розмноженню вірусу [7].

Вірусні гени синтезують білки й нові гени. З цього матеріалу складаються нові віруси. Все відбувається, як у складальному цеху великого заводу, де на конвеєрі



поступово з окремих деталей виростає машина. Так у клітині з окремих білків та генів утворюються віруси. Нарешті вони проривають оболонку, клітина гине, а новонароджені збудники готові заражати нові клітини.

Увесь процес побудови вірусної частинки займає 3 год. Через 5-6 год. їх уже тисячі, а через 24 год. — мільйони. Таким чином, від моменту зараження до появи перших ознак хвороби минає 24-48 год. За цей час вірус накопичується в такій кількості, що вражає усі чутливі клітини. Заражені клітини гинуть, їх залишки та отруйні речовини вірусу потрапляють у кров, це й призводить до розвитку клінічних проявів хвороби, яку ми називаємо грипом [11].

Як свідчать стародавні літописи та наукові спостереження, протягом останніх 45 років, що минули з часу відкриття збудника грипу, клінічні ознаки його не зазнали помітних змін. Усі збудники цієї хвороби (віруси А, В і С) викликають подібні клінічні прояви, хоча й тривалість окремих із них та тяжкість перебігу під час різних епідемій дещо відрізнялись.

Джерелом інфекції при грипі є хвора людина протягом усього періоду, що супроводжується високою температурою, і навіть за кілька годин до появи перших ознак захворювання. Хворий найбільш заразний у перші три дні хвороби. У міру одужання кількість вірусу в організмі з кожним днем зменшується, і з 5-7 -го дня хвороби людина перестає бути заразною. Проте у хворих з ускладненнями вірус може ще виявлятися на слизових оболонках верхніх дихальних шляхів, у крові та харкотинні. Вірус грипу знаходили також у сечі та випорожненнях [11].

У переважної більшості хворих грип починається раптово. Хворий може вказати не лише день, а й час захворювання. Короткочасний озноб змінюється значним підвищенням температури (до 38-40 °С і більшим). З самого початку хвороби виникають загальна кволість, нездужання, ломота та біль у руках, ногах і м'язах тіла, головний біль, часто — біль при рухах очима. У хворих з тяжким перебігом захворювання можливі носові й інші кровотечі, нудота, блювання, запаморочення, іноді втрата свідомості, марення. В тяжких випадках у дітей раннього віку можуть бути судороги, порушення дихання та інші небезпечні прояви.

Всі згадані ознак хвороби виникають внаслідок загального отруєння організму, передусім нервової та серцево-судинної систем. Адже перебіг грипу пов'язаний не лише з впливом вірусу, а й з дією продуктів його життєдіяльності та шкідливих речовин, які утворюються внаслідок розпаду клітин, що в них розвивався вірус.

Через кілька годин, а частіше на наступний день хворий відчуває дряпання в горлі, закладення носа, а пізніше — нежить, біль у горлі, за грудиною, кашель, утруднене дихання.

У випадках легкого перебігу хвороби температура тіла може залишатись нормальною, хоч у хворого спостерігаються нежить, невелика кволість і незначний головний біль. Досить часто при такому перебігові хвороби хворий постільного режиму не дотримується і переносить хворобу, як кажуть, на ногах, прийнявши її за місцеве ураження слизової оболонки носа і глотки. Проте треба знати, що зниження працездатності та загальне нездужання часто свідчать про грип. Перенесення ж грипу на ногах може викликати тяжкі ускладнення хвороби [11,3].

У більшості випадків на третій, четвертий день хвороби, рідше на п'ятий-шостий температура тіла знижується до нормальної, всі інші явища хвороби теж згасають. Залишається лише невелика загальна кволість протягом кількох днів.

В окремих хворих з першого дня захворювання виявляються різкі порушення функцій центральної нервової системи. Хворі скаржаться на сильний головний біль, нудоту, блювання, часто повторне. В таких випадках можливі і втрата свідомості, і судороги. Такі зміни виникають внаслідок отруйної дії вірусу.

Внаслідок цього порушується циркуляція спинномозкової рідини, підвищується черепно-мозковий тиск і тоді вже йдеться не просто про грип, а про грип з ураженням нервової системи з подразненням мозкових оболонок і самого мозку. Можливі зміни нервової системи, пов'язані з запаленням мозку і його оболонок. Частіше ці явища спостерігаються дещо пізніше - на 3-4-й день захворювання. При такому перебігові хвороби температура тіла не знижується, а, навпаки, підвищується, головний біль не згасає, а посилюється, особливо при фізичному напруженні і навіть зміні положення в ліжку. Майже завжди виникають

нудота і блювання, що повторюється. Ураження тих чи інших ділянок мозку проявляється відповідним розладом мови і слуху або паралічем рук чи ніг, м'язів обличчя, тулуба. Іноді можуть виникати розлади психічної діяльності [11].

Ураження нервової системи при грипі буває головним чином у хворих, які в минулому перенесли хвороби нервової системи або мали травму черепа. Досить часто грип набуває такого перебігу у людей з хронічним запаленням тих чи інших органів, наприклад мигдаликів, пазух носа, жовчного міхура та ін. Перебіг проявів ураження нервової системи при грипі особливо ускладнюється у тих, хто зловживає алкогольними напоями або намагається «лікуватись» ними.

Визначити характер ураження нервової системи на підставі тільки огляду хворого неможливо. Для цього необхідно вдаватися до спинномозкового проколу і лабораторного дослідження спинномозкової рідини. Лише за допомогою цього методу можна встановити характер змін у центральній нервовій системі, що має важливе значення для вибору способу лікування. Адже лікування при наявності запального процесу провадиться інакше, ніж при простому подразненні нервової системи. Сам прокол має лікувальне значення, бо внаслідок нього знижується внутрішньочерепний тиск, а це сприяє поліпшенню діяльності мозку [7].

Після проколу зменшується або навіть зовсім зникає головний біль, знижується температура тіла, нормалізується сон, зникає нудота та припиняється блювання. Хворим не слід боятися цієї маніпуляції і відмовлятися від неї, бо цим вони завдають собі великої шкоди. Несвоєчасне розпізнання хвороби і її ускладнень призводить до неправильного лікування, а надмірний черепно-мозковий тиск може спричинити тяжкі ускладнення і навіть раптову смерть від набряку мозку і стиснення життєво важливих центрів: серцево-судинної системи та органів дихання.

## **1.2. Грипозні вакцини і профілактика щеплення ними**

Великі надії запобігання грипу покладаються на профілактичні щеплення. Відомо, що після перенесення багатьох інфекційних хвороб формується несприйнятливність організму до повторного зараження ними — імунітет. Проти одних хвороб імунітет триває довго, іноді все життя, проти інших — лише короткий

час. Після перенесеного грипу також виробляється на деякий час імунітет, але він не захищає від зараження новим варіантом вірусу грипу.

Ще здавна вчені намагалися розробити методи, за допомогою яких можна створити імунітет штучно. З цією метою в організм людини вводили живі ослаблені або убиті віруси. У відповідь на це в крові з'являються особливі білкові речовини — антитіла, тобто захисні тільця, які знешкоджують вірус [6].

Щеплення проводять за допомогою вакцин. Обов'язковою умовою дійовості щеплення і його захисного ефекту є масовість імунізації.

Вакцинація проти грипу передбачає одночасне проведення щеплення основних соціально-вікових верств населення з обов'язковою імунізацією близько 70 % осіб. До таких груп належать діти (школярі), дорослі люди, особи похилого віку та хворі на хронічні захворювання.

Окремо виділяють групи підвищеного ризику, до них належать передусім медичні працівники, працівники торгівлі, транспорту, громадського харчування, комунального господарства, учні ПТУ та технікумів, оскільки саме вони обумовлюють близько 40 % усіх випадків грипу А і 50 % випадків грипу В [7].

Вакцинація меншої за 70 % частини населення (припустімо, 10 або 50 %) створює незначний прошарок імунних, який швидко розчиняється в величезній масі людей, що не пройшли щеплення, і це практично не може перешкодити поширенню збудника. Якщо на шляху вірусу весь час будуть зустрічатись лише імунні (внаслідок щеплення) особи, епідемічний ланцюжок розірветься, і поширення інфекції припиниться.

Існує декілька видів грипозних вакцин, а саме: живі грипозні вакцини, корпускулярні, убиті або інактивовані вакцини; субдиничні, генноінженерні, синтетичні вакцини [12].

Перші вітчизняні вакцини проти грипу були виготовлені О. О. Смородинцевим та його співробітниками через 3-4 роки після відкриття вірусу грипу (1936-1937 рр.). Їх виготовили з ослаблених вірусів, яких назвали атетуйованими. Ефективність таких вакцин недостатня, тому технологію їх приготування весь час удосконалюють.

Ослаблення вірусів проводиться в лабораторії поступово, шляхом розмноження їх при зниженій температурі повітря.

Віруси, що входять до складу живих грипозних вакцин, викликають утворення цілого комплексу імунних реакцій, які забезпечують опірність людського організму збудникові грипу. Це і нагромадження антитіл у крові та виділеннях з носа, і розвиток клітинного імунітету.

Живі вакцини використовуються для імунізації дітей і дорослих. Дітям вакцину дають ковтнути, тобто вводять її в організм перорально, дорослим — закачують в ніс [7].

За даними радянських вчених, щеплення живими грипозними вакцинами в 1,5-3 рази зменшує кількість випадків захворювання на грип в період епідемії. Крім того, захворювання у вакцинованих протікає значно легше: скорочується період клінічних проявів хвороби, рідше розвиваються ускладнення її.

Зрідка щеплення живою грипозною вакциною може супроводжуватися легким хворобливим станом (невеликий головний біль, нежить), який швидко минає, після цього організм здатний протидіяти збудникові грипу. Однак найбільший при такому щепленні ефект спостерігається після першої імунізації, повторне введення того ж препарату, але в інший епідемічний сезон, вже припиняє захищати організм від захворювання. Таким чином, живі грипозні вакцини не виправдали надій вчених, і почались пошуки нових технологій виготовлення їх [12, 7].

Було розроблено принципово нові методи конструювання вакцин із інактивованих, убитих вірусів грипу. Дослідники вважали, що оскільки при цьому інактивовані вакцини готують із концентрованих вірусних матеріалів, то вони повинні викликати посилену імунну відповідь. Проте на практиці виявилось, що інактивовані вакцини дають іноді небажані реакції: підвищення температури тіла, погане самопочуття.

Щоб зменшити негативні наслідки щеплення, інактивовані вакцини старанно очищають від білкових домішок шляхом хроматографії (і тоді одержують так звану хроматографічну вакцину АГХ) або спеціальним центрифугуванням. Все це значно ускладнює виготовлення вакцини і підвищує її вартість.

Інактивовані вакцини вводять один раз або двічі в шкіру плеча спеціальним інструментом (інжектором), рідина з якого під тиском впорскується без голки, що полегшує і значно прискорює процес щеплення.

Послідовне удосконалення вакцини привело до створення субодиничних вакцин, їх готують із очищених поверхневих білків вірусу — гемаглютиніну і нейромінідази. Вони не викликають ускладнень, їх імунна дія не слабша, ніж в інших вакцин [1].

Сьогодні перспективними є синтетичні вакцини на полімерній основі, поєднаній з частинками гемаглютиніну. Вважають, що такі препарати матимуть посилену дію. В лабораторіях вчені проводять досліди по створенню генно-інженерних вакцин, побудованих на використанні дріжджових клітин.

На сьогоднішній день важко сказати, яка із сучасних розробок зможе забезпечити дійовий захист населення від грипу. Безсумнівно одне: з масовою інфекцією потрібно боротись «масовою зброєю», і нею повинна бути вакцинопрофілактика грипу, яка в своєму арсеналі матиме засоби проти всіх збудників грипу А і В [6].

Останнім часом ведуться пошуки синтетичних сполук, які б пригнічували розвиток вірусу в чутливих клітинах організму і не справляли шкідливого впливу на людину.

Сьогодні відомі і широко використовуються два близькі за хімічною будовою препарати — Амантадин, синтезований за кордоном, і Ремантадин вітчизняного походження. Ці препарати зарекомендували себе позитивно під час епідемій грипу. Обидві сполуки пригнічують розмноження вірусів грипу А і не діють на віруси грипу В. Тому приймання Ремантадину (Мідантану) особливо показане з метою захисту груп людей широких контактів (робітників транспорту, працівників громадського харчування, торгівлі, медичних працівників і т. п.). Курс профілактичного прийому препарату — 20-30 днів.

Нові досягнення в галузі вірусології, імунології та молекулярної біології дали практичній медицині такий ефективний засіб боротьби з вірусною інфекцією, як інтерферон.

### **1.2.1. Порівняльна характеристика сучасних грипозних вакцин**

Обов'язковою характеристикою будь-якої сучасної вакцини повинна бути її низька реактогенність.

Реактогенна вакцина - це вакцина здатна викликати побічні реакції або поствакцинальні ускладнення.

На сьогоднішній день віруси грипу для створення сучасних вакцин вирощуються на курячих ембріонах, і будь-яка вакцина вимагає дуже хорошого очищення препарату від яєчних білків, які можуть викликати серйозні алергічні реакції, особливо у осіб з алергією до білків курячого яйця.

В даний час вже створена субодинична вакцина, одержувана на основі клітин MDCK (на основі клітинних культур). Крім основного (можливості швидкого отримання) при її виготовленні не використовуються курячі ембріони і, отже, вона не містить курячого білка, і може бути рекомендована для застосування в осіб з алергією на курячий білок.

При отриманні вакцин прагнуть зменшення вмісту ліпідів зовнішньої оболонки вірусів, що володіють токсичністю. Підвищений вміст вірусних компонентів у вакцині може стимулювати вироблення значних кількостей інтерферону (відомого противірусного чинника імунітету), причому в такій же мірі, як це відбувається при зараженні «диким» вірусом. Підвищене утворення інтерферону є причиною тих ефектів, які розглядаються як загальні і системні реакції на введення вакцин - головний біль, підвищення температури, слабкість, нездужання... Такі ефекти особливо часто спостерігаються у дітей [1].

Якщо вакцина має високу реактогенність, то вакцинацію можуть супроводжувати місцеві реакції - ущільнення і болючість в місці ін'єкції. Таким чином, на високо - реактогенні вакцини накладаються обмеження на застосування. Вони протипоказані дітям і хворим на хронічні захворювання. А це ті люди, яким вакцинація показана в першу чергу!

Інший найважливіший критерій якості вакцин - їх імуногенність, тобто здатність формувати специфічний імунітет проти грипу. Від цього безпосередньо

залежить профілактична ефективність будь-якої вакцини. Слід розділити ці два поняття, незважаючи на те, що вони дуже тісно взаємопов'язані [12].

Імуногенність вакцини оцінюють за її здатності викликати синтез антитіл проти антигенів, що входять до складу даної вакцини, і по деяких інших імунологічних показниках. Існують специфічні стандарти імуногенності вакцин проти грипу, встановлені ВООЗ і Європейською Комісією.

Всі сучасні вакцини задовольняють цим стандартам. Але, імуногенність розглядається поза умов конкретної епідемії.

Профілактичну ефективність вакцин оцінюють в рамках конкретної епідемії грипу по тому, наскільки вакцина попереджає захворюваність грипом [1].

Як відомо, вірус грипу постійно змінюється. Щоб забезпечити ефективний імунітет проти нового штаму вірусу, потрібно постійно змінювати склад вакцин, включаючи в них нові вірусні антигени, за принципом: новий вірус - нова вакцина. Найбільш відомими, активно вживаними і безпечними вакцинами є: інактивовані субодиничні; інактивовані спліт-вакцини.

### **1.2.2. Технологія та розуміння спліт вакцини**

Виділені віруси (віріони) очищають і руйнують хімічною речовиною (наприклад, діетиловим ефіром). Така вакцина містить всі вірусні білки: гемоглютинін, нейрамінідазу і білки нуклеопротеїда вірусу.

За рахунок додаткового очищення в такій вакцині ще менше токсичних субстанцій, ліпідів, в порівнянні з цільновіріонною вакциною.

Отже, вона значно менш реактогенна. Оскільки білки нуклеопротеїда вірусу приймають участь в імунітеті, теоретично можна припустити, що спліт-вакцина зберігає максимальну імуногенність.

Типовими представниками спліт-вакцин є французький «Ваксигрип», німецький «Бегривак» і бельгійський «Флюарикс». Наявність у вакцині внутрішніх антигенів вірусу (нуклеокапсида і матричного білка), на думку творців вакцини «Ваксигрип», захищає не тільки від щорічних варіантів вірусу грипу, але частково і



від усіх можливих різновидів вірусу, оскільки внутрішні антигени не дуже схильні до мутацій [1, 12].

Отже, теоретично спліт-вакцини виграють у імуногенності, яка напряду пов'язана з ефективністю вакцини, за рахунок наявності внутрішніх антигенів вірусу.

Спліт-вакцини дозволено застосовувати для дітей з 6-місячного віку, а також для літніх людей, які страждають хронічними захворюваннями, в тому числі у хворих на бронхіальну астму.

### **1.2.3. Технологія та розуміння субодиничних вакцин**

Це вакцини останнього покоління, в яких досягається максимальне очищення антигенів від токсичних домішок (ліпідів). Така вакцина містить тільки поверхневі антигени вірусу - гемаглютинін і нейрамінідазу, і не містить внутрішніх вірусних білків.

Доведено, що найбільш значущими в розвитку імунітету проти грипу є саме поверхневі вірусні білки. Оскільки в таких вакцинах відсутні токсичні домішки і немає внутрішніх антигенів вірусу - вони виграють в безпеці і дають найнижче число побічних реакцій.

Представниками субодиничних вакцин є голландський «Інфлувак», німецький «Агріппол» і російський «Грипол». Це найменш реактогенні препарати, які дозволяється і рекомендується застосовувати для дітей 6 місяців і старше, у літніх осіб і людей з хронічними захворюваннями. Одним з найновітших і кращих досягнень є технологія виготовлення вакцини «Гріпол» [1].

### **1.2.4. Порівняльна характеристика спліт-вакцини та субодиничної вакцини**

На даний час в Україні не проведено незалежних досліджень з порівняння ефективності та безпеки вакцин цих класів, тому можна орієнтуватися тільки на зарубіжні роботи, де думки фахівців дещо розходяться. Але приблизні висновки можуть звучати так: «Сучасні інактивовані вакцини мало відрізняються між собою за імуногенністю, тобто здатності викликати вироблення антитіл і створювати імунітет проти грипу».

Один з основних аргументів на користь спліт-вакцин - внутрішні антигені вірусу грипу мають певне, але не основне, значення у формуванні протигрипозного імунітету. Зустрічаються твердження, що через відсутність у субодиничних вакцинах внутрішніх антигенів вірусу, захисна ефективність субодиничних вакцин трохи нижче, ніж у спліт-вакцин (на 10-15 %).

Таким чином, швидше теоретично, спліт-вакцини мають певний «запас» профілактичної ефективності в порівнянні з субодиничними вакцинами [1,12].

Дослідження, проведені в Італії, показали, що спліт-вакцин мають досить високу реактогенність у порівнянні з іншими субодиничними.

Гасло виробників спліт-вакцин: «Повний набір антигенів вірусу грипу. Максимальна ефективність при мінімумі побічних реакцій. Ніякої економії на ефективності».

Порівнюючи реактогенність, тобто переносимість спліт- і субодиничних вакцин, дослідники показали дуже хорошу безпеку для всіх порівнюваних вакцин, але результат був кращим у субодиничних вакцин (0,9-1,3 % проти 1-1,8 % для спліт-вакцин; результати дослідження Sveva, Італія).

Ймовірно, спліт-вакцини програють в безпеці, оскільки все таки містять деяку кількість ліпідів вірусу. Девіз виробників субодиничних вакцин: «Основний набір антигенів вірусу. Максимальна безпека при достатній ефективності. Ніякої економії на безпеці.»

Отже, на поставлене питання непросто відповісти, але безпека людства є головним для нас. Немає висновку за результатами незалежних контрольованих клінічних досліджень з порівняння ефективності та безпеки спліт- і субодиничних вакцин. Будь-які твердження про переваги тієї чи іншої вакцини не є на даний момент однозначно вірними, оскільки відокремлювати ефективність вакцин від їх безпеки неправильно. Але за даними найменш реактогенними та безпечними є субодиничні вакцини, а також найбільш ефективними в боротьбі з грипозним вірусом, саме тому всі зусилля сьогодні покладенні на вдосконалення технології виготовлення вакцини Грипол [1,3].

Грипозна полімер-субодинична вакцина Грипол, створена в Інституті імунології МОЗ Росії під керівництвом академіка Р.В. Петрова і академіка Р.М. Хаїтова, є першою вакциною нового покоління, яка не має аналогів у світі.

У вакцині Грипол на практиці реалізований принцип створення кон'югованих антиген-полімерних вакцин, що лежить в структурному об'єднанні антиген-детермінанту з високомолекулярним носієм імуномодулятором.

У механізмі розвитку поствакцинального імунітету при грипі, саме антитіла ГА і НА забезпечують захист, володіють вірусонейтралізуючою активністю, перешкоджають поширенню вірусу в інфікованому організмі і послаблюють гостроту захворювання.

В сучасній вакцині проведено модифікацію поверхневих білків гемаглютиніну і нейрамінідази високомолекулярними імуностимуляторами для посилення імуногенної активності субодиниць протективних антигенів і наближення презентації антигенів до природної за рахунок утворення багатокomпонентних макромолекулярних полімер-антигенних структур [1].

І нарешті, подолання проблеми зниження протистояння організму до гетерологічних антигенів в період формування специфічного імунітету проти грипу.

Вакцина Грипол являє собою стерильний очищений від домішок кон'югант поверхневих протективних білків гемаглютиніну і нейрамінідази трьох вірусів грипу підтипів А (Н1N1), А (Н3N2) і типу В, з високомолекулярним носієм - імуностимулятором і імуномодулятором [12].

### **1.2.5. Антигенний (штамовий) склад вакцин**

Всесвітня Організація Охорони Здоров'я (ВООЗ) вже протягом 20 років докладає величезних зусиль по всьому світу для досягнення максимально повного антигенного збігу прогнозованих епідемічних штамів вірусу і вакцинних штамів на кожен конкретний рік.

У сучасних інактивованих вакцин антигенний склад максимально збігається з циркулюючими штамми вірусу грипу і міняється щорічно (на справжній момент,

2010-2012 рр, вони містять три штами вірусу грипу - А (H1N1), А (H3N2) і вірус типу В).

За вказівками ВООЗ і рішенням Європейського Комітету (ЄК), щоб домогтися достатньої сили імунної відповіді, кожна доза протигрипозної вакцини повинна містити 15 мкг гемаглютиніну вірусу грипу. Саме ці обставини забезпечують високу ефективність протигрипозних вакцин [1, 3].

### **1.2.6. Вікові категорії прищеплених, загальна схема вакцинації**

У зв'язку з низькою частотою побічних реакцій, інактивовані субодичні і спліт-вакцини можуть застосовуватися у всіх вікових групах від 6-ти місячного віку (флюарикс з 1-го року, гриппол з 3-х років).

Проведення вакцинації можливе у дорослих, дітей та осіб старше 60 років, з супутніми хронічними захворюваннями.

Доза для дорослих і підлітків (старше 3-х років) становить 0,5 мл. Вакцина вводиться одноразово.

Доза для дітей з 6-місячного віку і до 3-х років становить 0,25 мл.

Дітям та підліткам, які раніше не хворіли на грип і не проходили протигрипозну вакцинацію, рекомендується вводити дві дози вакцини з інтервалом у 4 тижні. Дворазове введення вакцини забезпечує адекватну імунну відповідь у дітей, тому компетентні органи охорони здоров'я рекомендують саме такий режим дозування вакцин [6,1].

Хворим з імунодефіцитами незалежно від віку рекомендується вводити дві дози вакцини з інтервалом у 4 тижні. Наявний досвід показує, що вакцини можна застосовувати під час вагітності, починаючи з другого триместру, а також у періоді лактації (грудного вигодовування).

*Методи введення.* Вакцину вводять внутрішньо м'язово або глибоко підшкірно. При використанні вакцин в одноразових шприцах (шприц-доза) рекомендується струснути шприц безпосередньо перед ін'єкцією.

Дорослим і підліткам вакцина вводиться в латеральну область дельтоподібного м'яза. Маленьким дітям вакцина вводиться в верхню частину стегна.

Слід зазначити, що керівництва з імунізації не рекомендують введення вакцин в сідничний м'яз через небезпеку травмування нервових стовбурів і судин. Також з ін'єкцією в сідницю пов'язують зниження рівня імунної відповіді через можливість потрапляння вакцини в глибокі жирові тканини при аномальному їх розташуванні [3].

Вакцина проти грипу можна спільно використовуватися разом з будь-якими іншими вакцинами. При цьому важливо, щоб вакцини вводилися одночасно в різні ділянки тіла (у різні кінцівки), пам'ятаючи про теоретичну можливість посилення побічних дій. У хворих з уже відомими реакціями подібного роду рекомендується роздільне введення препаратів з інтервалом не менше 3 тижнів.

*Побічні дія при щепленні.* Введення вакцини (як і будь-якого іншого препарату) може призвести у деяких прищеплених до виникнення наступних побічних реакцій різного ступеня виявленості:

Місцеві побічні дія: почервоніння, припухлість і болючість, синець, ущільнення в місці введення вакцини, припухлість лімфатичних вузлів в безпосередній близькості до місця ін'єкції.

*Системні побічні дії.* Найбільш часто спостерігаються ранні нетривалі загальні реакції: відчуття втоми, нездужання, головний біль, пітливість, озноб, підвищення температури тіла, шлунково-кишкові розлади. Ці симптоми зникають спонтанно, як правило, через 1-2 дні.

*Рідкісні.* невралгії, парестезії, судоми, іноді утворення гематом, перикардит. Також іноді трапляються запальні реакції на рівні ЦНС і периферичних нервів: від висхідного паралічу до паралічу дихального центру (синдром Гієна-Барре) [1].

*Алергічні реакції,* які виключно рідко призводять до розвитку шоку. Реакції, що призводять до шоку, можуть також спостерігатися після внутрішньо-судинного введення. Є повідомлення про дуже рідкі випадки васкуліту, що розвинувся протягом 2 тижнів після імунізації. Зазначені побічні ефекти можуть супроводжуватися тимчасовим порушенням функції нирок.

*Правила зберігання вакцини, строк придатності.* Зберігати вакцини потрібно в холодному приміщенні (від +2 °C до +8 °C). Не заморожувати. Швидко нагрівання

вакцини до приблизно 20 °С безпосередньо перед введенням не впливає на якість вакцин.

Вакцини зберігають свої властивості протягом 12 місяців. Для уникнення плутанини з вакцинами старого і нового складу, строком закінчення придатності вважається 30 червня року, наступного за роком випуску [12].

### **1.3. Системи культивування вірусів**

#### **1.3.1. Апаратура, що використовується при промисловому культивуванні вірусів**

Загалом клітинні культур ссавців за рядом фізіологічних ознак поділяються на субстратзалежні моношарові і суспензійні. До перших відносять первинні клітини і лінії диплоїдних клітин, необхідною умовою життєдіяльності яких є наявність адекватної ростової поверхні для прикріплення. До других належать трансформовані клітини і клітини крові, що мають здатність до синтезу і росту при знаходженні в монодисперсному стані. Вказана відмінність лежить в основі двох основних способів культивування: поверхневого, при якому обов'язковою є наявність ростової поверхні для прикріплення, і суспензійного, який ґрунтується на використанні монодисперсних клітин, що знаходяться в зваженому стані в об'ємі поживного середовища [84, 145, 170, 165].

До основних способів організації біосинтезу клітин ссавців обох типів в умовах *in vitro* відносять:

а) циклічний (періодичний) – при цьому способі культивування поживне середовище знаходиться в культуральній системі, постійно виснажується внаслідок життєдіяльності клітин, паралельно у поживному середовищі відбувається накопичення продуктів життєдіяльності;

б) відкритий (безперервний) – при такому способі культивування відбувається постійне надходження в культуральну систему поживного середовища і водночас видаляється рівна кількість відпрацьованого середовища, яке містить продукти життєдіяльності клітин;

в) дробний (від'ємно-доливний) – у цьому випадку періодично, у міру зниження концентрації поживних речовин у культуральній суспензії і накопичення продуктів життєдіяльності клітин, замінюють відпрацьоване середовище свіжим, при підтриманні постійного робочого об'єму;

г) перфузійний – цей спосіб культивування забезпечує безперервний потік поживного середовища через зону його споживання.

Вибір того чи іншого способу культивування визначається фізіологічними потребами клітинної культури і методом керування процесом, а також способом накопичення (екзо- чи ендогенним) цільового продукту або біомаси клітин [166, 192].

Вирішальними факторами забезпечення життєдіяльності клітин ссавців звичайно вважають оптимальний температурний режим (у межах 36-37°C); рівень рН середовища (на рівні 7,2-7,5), а також забезпечення киснем ( $pO_2 = 10-50\%$ ) [165, 185]. Але умови культивування еукаріотичних клітин не вичерпуються переліченими і багато в чому визначаються типом застосованого біореактора, його геометрією, видом енергії, яка підводиться, складом поживного середовища тощо.

### **1.3.2. Клітини як основа для культивування вірусів**

Всі відомі на даний час промислові технології культивування вірусів ґрунтуються, в першу чергу, на крупномасштабному вирощуванні клітин-продуцентів в умовах *in vitro*. При цьому технології виробництва вірусів різні за походженням клітин-продуцентів, що використовуються та містять у собі загальнообов'язкові технологічні етапи.

Принципово важливими етапами процесу отримання вірусного матеріалу є, по-перше, одержання достатньої кількості клітин-продуцентів (при використанні первинних клітин – клітин крові або солідних органів від відповідних донорів, у випадку використання перещеплюваних культур клітин – напрацювання достатньої кількості клітин в умовах *in vitro* або яєчних ембріонів), по-друге, праймування клітин-продуцентів і, нарешті, внесення в суспензію клітин-продуцентів того чи іншого вірусного агента. Результатом такого внесення є інфікування культури клітин чи клітинного матеріалу та накопичення вірусних часточок у культуральному середовищі.

Подальші технологічні етапи передбачають відділення культуральної рідини від клітин-продуцентів, інактивацію у цій рідині вірусу і подальші етапи очистки імунобіологічних препаратів (зазвичай ультра- і мікрофільтрація культуральної рідини з метою концентрування і стерилізації нативного препарату), а також ампулювання та ліофілізація кінцевого продукту. Паралельно проводять визначення кількісних і якісних характеристик отриманих препаратів.

Первинною називається культура, отримана з тканини і вирощувана *in vitro* до початку субкультівірованія, тобто до першого посіву. Первинна культура позбавлена багатьох клітин, присутніх у вихідній тканини, оскільки не всі клітини здатні прикріпитися до субстрату і вижити *in vitro*.

На першому етапі отримання первинної культури проводять стерильне видалення фрагмента тканини, органу тварини і його механічну або ферментативну дезагрегацію. Тканина подрібнюється до шматочків 1-3 мм, шматочки тканини відмиваються від еритроцитів розчином Хенкса з антибіотиками. Для дезагрегації тканини використовують трипсин (0,25 % неочищений або 0,01-0,05 %) або колагеназу (200-2000 ОД/мл) та інші протеолітичні ферменти. Такий спосіб отримання культури забезпечує високий вихід клітин.

Первинні культури можуть бути також отримані з шматочків тканини, об'ємом 1 мм, які прикріплюються до поверхні субстрату завдяки власній адгезивності, наявності насічок на чашці або за допомогою згустку плазми. У цих випадках буде відбуватися ріст клітин з фрагментів. Клітини, що мігрують з експлантатів можуть використовуватися для пасерування. Фрагменти тканини (експлантатів) переносяться на нові чашки, мігруючі клітини можуть видалятися пересівом, сумішшю версії і трипсину, а позostalі експлантатів будуть утворювати нові вирости.

Як вже зазначалося вище, одним з методів отримання перещеплюваних клітинних ліній є відбір клітин з підвищеною активністю росту і розмноження з популяції первинних культур. Відбір можна здійснити при регулярній зміні середовища, що омиває моношар первинно тріпсинізованої клітинної культури. Для цього відбирають матраци з добре сформованим клітинним моношаром (самі матраци



повинні мати рівне дно і не повинні мати на стінках подряпин і матових плям). Приготовлену для систематичної зміни росту середовище розливають по невеликих судинах (щоб виключити бактеріальне забруднення) і зберігають при  $t=4$  °С.

Зміну середовища виробляють регулярно, не рідше 1 разу на тиждень. Протягом перших 3 тижнів замінюють по 20-30 % обсягу ростової середовища, протягом наступних 3-4 тижнів – 50-60 %, пізніше проводять повну зміну середовища. Свіжу середовище безпосередньо перед роботою підігривають до  $t=37$  °С.

По мірі зміни середовищ клітини міняють свою морфологію. Частина клітин заокруглюється і відпадає від скла. Більшість клітин стягується до центру, і моношар набуває зірчастий вигляд. Самі клітини при цьому кілька подовжуються. Через 7-10 зміни середовища в матрацах як правило, починають з'являтися нові клітинні елементи, причому в різних культурах вони мають різну морфологію.

У культурі клітин нирки курячого ембріона в центрі моношару або між стягнутими його ділянками з'являються заокруглені клітинні елементи, з яких поступово формуються скупчення у вигляді невеликих колоній. У культурі клітин нирки мавпи з'являються поодинокі утворення, що нагадують зерна. Клітини щільно прилягають один до одного, утворюючи дрібні прозорі колонії. Кількість таких клітин наростає повільно, розміри колоній також майже не збільшуються. Колонії з'являються не тільки на дні матрацу, а також на бічних його поверхнях, на межі поживного середовища. Тому обов'язковою умовою при зміні поживного середовища є підтримка його постійний об'єм. У культурі клітин нирок ембріона людини на фоні масової дегенерації стягнених в тяжі моношару виявляються великі полігональні клітини з довгими відростками.

Утворені, в процесі відбору, атипів клітинні елементи повинні бути відокремлені від решти ділянок моношару і перенесені в окремі пробірки або матраци. Для цього може бути використаний метод версенізації або механічний відкол атипів клітин за допомогою бактеріологічної петлі або шпателя. Останній спосіб особливо необхідний при роботі з культурою клітин нирок мавпи, де колонії атипів клітин щільно прикріплені до скла і самі від нього не відокремлюються.

При зміні поживного середовища у разі появи атипівих клітин рекомендується обережно видалити більшу частину ростової середовища, а меншою частиною енергійно промити моношар і середовище розлити по пробірках. У цьому випадку в середовищі можуть виявитися атипіві клітини, що мають здатність утворювати колонії, придатні для подальшого пересівання.

Після перенесення культури атипівих клітин в новий посуд спостереження за основною культурою доцільно продовжити, оскільки процес виведення нової клітинної лінії дуже складний і далеко не завжди відібрані атипіві елементи дають початок життєздатною лінії перещеплюваних клітин. Необхідно, щоб вся робота по отриманню нових клітинних ліній, що триває протягом багатьох місяців, проводилася з одними і тими ж поживними середовищами, сироватками тварин і серіями антибіотиків.

При одержанні вірусів для потреб ветеринарії і дослідницьких робіт використовують клітини селезінки і лімфатичних вузлів тварин [40]. Отримані у такий спосіб клітини характеризуються високими вимогами до поживних середовищ та систем культивування при біосинтезі.

Клітини перещеплюваних трансформованих ліній культур (такі, як лінія Namalva тощо) вигідно відрізняються від первинних більш високою стійкістю як до середовищ, так і систем біосинтезу. Але при використанні трансформованих клітин у якості продуцентів слід враховувати потенційну загрозу внесення до організму онкогенів, що потребує посиленої уваги до очистки отриманих препаратів. Відомі такі первинні культури, як культури клітин нирки золотистого хом'ячка (ВНК), нирки сибірського гірського козла (ПСГК), нирки зеленої мавпи (CV), фібробластів курячого ембріона, нирки теляти та лейкоцити.

### **1.3.2.1. Ролерні та моношарові культури клітин**

Культивування субстратзалежних клітин *in vitro* відомо з другої половини 19 століття. Цей спосіб використовується при отриманні більшості фізіологічно-активних сполук – продуктів біосинтезу клітин. Незважаючи на багато технологічних недоліків, які їм притаманні, культуральні системи субстратзалежних моношарових

клітин широко використовуються як в наукових дослідженнях, так і фармацевтичній промисловості [170, 132, 102].

Культивування моношарових клітин на плоских поверхнях. До недавнього часу тканинні культури застосовувалися у вірусології переважно у вигляді одношарових стаціонарних культур. У багатьох випадках цей метод вирощування клітин є незамінним. Багаторічний досвід показує, що при використанні одношарових стаціонарних культур зустрічається ряд труднощів, пов'язаних з величезними витратами робочого часу і матеріалів. З цієї точки зору, більш вигідні ролерні культури, які є більш економічні та характеризуються оптимальним відношенням корисної площі культивування до об'єму поживного середовища і відкривають сприятливі можливості для накопичення клітинної маси.

Термін «ролерні культури» означає метод культивування, при якому клітинний моношар розташовується по всій циліндричній поверхні горизонтально обертаючихся ємностей і періодично омивається поживним середовищем. В силу певних причин деяка кількість клітин може в окремих випадках бути зважене в культуральному середовищі. У подібному варіанті культуру клітин називають ролерною-суспензійний. «Врожайність» клітинної культури буде тим більше, чим більша площа, з якої збирають клітини. Дослідники використовували різні шляхи збільшення площі поверхні, на якій відбувалося прикріплення і розмноження клітин. Для цього застосовували різного характеру основи з великою питомою поверхнею: тверду, губчасту, з вовни, колагену, на скляних спіралях і т.д. Широкого поширення ці методи не отримали, так як значно ускладнювали маніпуляції з клітинами, але слід зазначити описану Л.С. Ратнером і В.А. Крикуном методику багатоярусного культивування. Клітини культивували в 1,5, 10 і 15 літрових бутлях, повністю завантажених овальними скляними трубками, розташованими паралельно поздовжній осі ємностей. Корисна площа при цьому зростала в порівнянні з стаціонарними одношаровими культурами в ємностях однакового об'єму в 20 разів. Культивування проходило в 2 етапи. На першому етапі бутлі обертали навколо горизонтальної осі з метою рівномірного розподілу клітин. Надалі, коли клітини прикріплялися до скла,

культивування тривало в стаціонарному положенні. Описана культуральна система була успішно використана для культивування вірусу ящуру.

Для задач культивування субстратзалежних моношарових клітин широко використовуються культиватори ролерного типу, принцип роботи яких полягає в обертанні розташованих горизонтально або під кутом 15-30° ємностей з культуральною суспензією [147]. При ролерному культивуванні в якості культуральних ємностей використовуються ролерні флакони, сулії або їхні пластикові аналоги. При цьому ростовою поверхнею клітинам слугує внутрішня поверхня ємностей, що як правило складає 175-200 см<sup>2</sup> при об'ємі клітинної суспензії 100-150 мл середовища. З тією ж метою використовуються пробірки, чашки Петри, імунологічні планшети та різноманітний скляний посуд, що розташовується в обертових апаратах [132].

Більш ефективним виявилось обертання ємностей, в яких відбувалося розмноження клітин. Спочатку клітини вирощували в пробірках, але з розвитком технічного оснащення зросли об'єми культуральних ємностей і від вирощування клітин в обертових пробірках дослідники перейшли до обертових бутлів. Ролерні культури стали застосовуватися як для накопичення клітин, так і розмноження вірусів.

Для ролерного культивування використовуються спеціальні стелажно-ярусні апарати для обертання бутлів або барабани. Частіше за все для культивування використовують 0,5-3 літрові бутлі. У виробничих умовах обсяг їх може досягати 20 літрів і більше. Апарати для ролерного культивування прості, надійні та обслуговування їх нескладно. Велике значення має швидкість обертання бутлів. Вона не повинна бути занадто великою, щоб не перешкоджати прикріпленню клітин, але й не занадто низькою, тому що тривале перебування клітин в газовій фазі погіршує умови їх живлення. У роботах різних авторів швидкості обертання бутлів варіювали від 8-12 об/год, до 1 об/хв. Найбільш придатною для різних клітинних культур виявилася швидкість обертання флаконів в межах 0,5-1 об/хв. Рекомендується протягом перших 30 хв після засіву клітин забезпечити високу швидкість обертання

флаконів (0,5-1,0 об/хв) для рівномірного розподілу матеріалів, потім перевести їх на низьку швидкість обертання (20-30 об/год).

Посівна концентрація в 1 мл середовища становить для клітин СНЕВ, ВНК-21, HeLa, L – 60-80 тис., для диплоїдних клітин 100-200 тис., для первинних культур – 200-300 тис. Обсяг ростової середовища повинен складати 1/10, 1/20 частину об'єму ролерного флакону. Ролерний метод культивування дозволяє отримати більшу кількість клітин. Так, наприклад, з флакона ємністю 3 л можна одержати врожай клітин HeLa у 8 разів, ВНК-21 – у 9 разів, АТ – у 11 разів більший, ніж з моношарової стаціонарної культури флакону ємністю в 1 л. Кратність економії середовищ при використанні 3 літрових флаконів становить для клітин HeLa – 2,8; ВНК-21 – 5,0, АТ – 4,0. Здатністю до зростання і розмноження в ролерних умовах мають субкультури, перещеплюваних культури і рідше первинні, а також диплоїдні штами клітин. Для кращого розмноження клітин в ролерних апаратах необхідна адаптація їх до нових умов культивування. Ролерний метод культивування дозволяє отримати великі кількості клітин. Перевагою ролерних культур порівняно з традиційними стаціонарними культурами є, зокрема, більш економічне використання поживних середовищ і більш високий вихід вірусного антигену (на 1-2 lg).

### **1.3.2.2. Гетерогенні системи культивування моношарових клітин**

Для одержання більшої кількості клітинних продуктів у біореакторах невеликого об'єму використовують гетерогенні системи, призначені для культивування субстратзалежних моношарових клітин. У таких системах використовують обертові ростові поверхні з іммобілізованими клітинами. Останнє дозволяє досягти кращого забезпечення клітинної суспензії компонентами поживного середовища і розчиненого кисню за рахунок постійного омивання клітин середовищем, що переміщується.

Гетерогенні системи можуть являти собою біореактори, у яких ростовою поверхнею є стопа круглих пластин або спіральна поверхня [7]. Типовою є конструкція апарата з горизонтальним валом, на якому вертикально попарно встановлені перфоровані диски. У зазорах між цими дисками знаходиться полімерний

капілярно-пористий матеріал [54]. При обертанні перфорованих дисків поживне середовище надходить крізь порожнину всередині валу і при цьому захоплюється пористим матеріалом, омиваючи у такий спосіб іммобілізовані на цьому матеріалі клітини.

### **1.3.2.3. Перфузійні системи**

При культивуванні субстратзалежних моношарових клітин використовують також і більш досконалі з погляду забезпечення клітин компонентами поживного середовища і видалення продуктів метаболізму системи, що отримали назву перфузійних. Перфузійний спосіб культивування передбачає безперервну рециркуляцію поживного середовища крізь зону її споживання [211].

Класичним прикладом перфузійного реактора є апарат з вертикальним валом, на якому закріплений фільтр, виконаний у вигляді конуса, який звужується донизу [147]. Клітинна суспензія завантажується в об'єм конуса, обмежений фільтром. При перемішуванні фільтр заважає видаленню клітин з культурального об'єму, не перешкоджаючи при цьому постійному надходженню свіжого поживного середовища і одночасно виходу відпрацьованого середовища. Обертання фільтра виконує як функцію перемішування культури, так і постійного очищення фільтру від закупорювання його пор клітинами.

### **1.3.2.4. Суспензійні культури клітин**

В даний час для виділення і розмноження вірусів тварин використовуються первинні культури, штами клітин і встановилися клітинні лінії.

У 1953 р. Оуенс із співробітниками вперше показав здатність клітин розмножуватися в рідкому середовищі у вільно суспендованих стані. З тих пір метод суспензійного культивування привертає увагу дослідників у зв'язку з його високою ефективністю при накопиченні великих кількостей клітин. Виявилося, що клітини перещеплюваних ліній, на відміну від інших типів клітинних культур, можуть довго культивуватися в підвішеному стані. Клітини в цих умовах розмножуються, не прикріплені до стінок культуральної ємності, перебуваючи в суспензійному стані, завдяки постійному перемішуванню середовища. При оптимальному режимі

вирощування клітини в суспензіях швидко розмножуються, мають більш високий «урожай», ніж у стаціонарних культурах.

У загальних рисах процедура виявляється однаковою для всіх вірусів: Середовище видаляють з клітинного моношару і моношар промивають збалансованими буферними сольовими розчинами (ЗБСР) або фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) для видалення інгібіторів (антитіл), які можуть бути присутніми в середовищі. Вірусні частинки суспендують у невеликій кількості ЗБСР чи ФСБ і адсорбуються клітинами протягом 30-60 хв. Після цього сольові розчини замінюються свіжою середовищем.

Зараження вірусами культивованих клітин викликає характерні морфологічні зміни клітин. Кінцеві дегенеративні клітинні процеси (Цитопатогенні ефект, ЦПЕ) виявляються тільки через кілька тижнів зростання в присутності вірусів, але в ряді випадків ЦПЕ виявляються вже через 12 год. Деталі морфологічних змін виявляються різними в разі різних вірусів.

Якщо замість продуктивної інфекції вірус викликає клітинну трансформацію, то це також супроводжується характерними змінами морфології та особливостей росту клітин.

Суспензійне культивування передбачає створення в реакторі умов, за яких клітини знаходяться в монодисперсному стані в об'ємі поживного середовища [84, 188, 221]. При цьому культивування, при якому клітини знаходяться в суспензії без струшування і перемішування, є стаціонарним (статичним) суспензійним культивуванням. Стаціонарне культивування може бути реалізоване в будь-яких культуральних системах при дотриманні загальних для клітин ссавців умов життєзабезпечення [6, 170, 132].

Суспензійні культури готують з одношарових культур. Клітини отслаивають від скла за допомогою розчинів Версену і трипсину. Осад клітин після центрифугування (1000 об/хв.) ресуспендують у свіжій поживному середовищі. Приготовлену суспензію поміщають в культуральні ємності (реактори, ферментери) і вирощують при постійному перемішуванні. У наукових дослідженнях концентрація клітин у вихідній суспензії коливається від  $0,3-1 \times 10^7$  в 1 мл. Оптимальна

концентрація клітин у вихідній суспензії повинна бути  $2-5 \times 10^6$  в 1 мл. На думку Ерла і його співробітників, концентрація клітин у суспензійних культурах повинна бути такою, щоб фаза логарифмічного росту наступала не пізніше 16-24 год після приготування культури. Суспензійні клітинні культури проходять характерні стадії: лаг-фазу, фазу логарифмічного росту, стаціонарну фазу і фазу логарифмічного відмирання. У першій стадії, як правило, кількість клітин зменшується, у другій стадії популяція клітин збільшується (логарифмічна стадія зростання), в третій стадії збільшення кількості клітин не спостерігається (стаціонарна фаза). Якщо культивування продовжити далі, то виявиться період зменшення чисельності клітин-фаза логарифмічного відмирання (фаза руйнування). Швидкість розмноження клітин у логарифмічній фазі росту висловлюють часом генерації. Під часом генерації мається на увазі період, необхідний для подвоєння популяції клітин в культурі. Для суспензійного вирощування клітин важливою умовою є перемішування рідини, яка має бути безперервним і досить інтенсивним, щоб підтримувати клітини в підвішеному стані, перешкоджати їх осадженню і прикріпленню до стінок ємностей і в той же час не викликати їх механічного пошкодження.

Перемішування суспензійних культур проводять лопатевими магнітними мішалками, а також круговими гойдалками. В даний час широко застосовують обертання флаконів і бутлів навколо поздовжньої осі (15-40 об/хв). На магнітних мішалках швидкість обертання становить 100-200 об/хв. Швидкість перемішування залежить від об'єму культури; малі об'єми культури вимагають невисокої швидкості, тоді як її необхідно збільшити при великих обсягах. Для запобігання осідання клітин на внутрішній поверхні ємностей виробляють силіконоване. Силіконове покриття в силу своєї гідрофобності перешкоджає прикріпленню клітин до стінки ємностей.

Внутрішні стінки культурального ємностей змочують 5 % або 10 %-м розчином силікону і після випаровування розчинника (бензолними, ацетонового) поємностейи витримують при 85 °С і 200 °С (протягом 30 і 60 хв відповідно). Після охолодження ємностей наповнюють гарячою бидистиллированою водою і залишають на 2 години, потім їх 3 рази обполіскують бидистильованою водою і



висушують при 100 °С. Ємності стерилізують у сушильній шафі при 170 °С протягом 2 год.

Максимальний ріст клітин у суспензії спостерігають при рН 7,0-7,2. Поживні середовища, які застосовують для вирощування клітин в суспензії, не відрізняються від середовищ, які використовуються для вирощування клітинних ліній в одношаровій культурі. Частіше за все при культивуванні клітин в суспензіях беруть середовище Ігла з дворазовою концентрацією амінокислот і вітамінів.

Суспензійні культури споживають в 2-7 разів більше глюкози, ніж моношарова. У процесі споживання глюкози клітини виділяють в середовище токсичну для них молочну кислоту. Споживання клітинами глюкози і вироблення молочної кислоти йдуть паралельно і знаходяться в прямій залежності від щільності клітинної популяції. Корисним виявилось додавання до поживного середовища інсуліну в кількості від 40 до 200 ОД на 1 л. Додавання до поживного середовища інсуліну змінює співвідношення між кількістю поглинутої глюкози та виділеної молочної кислоти. Для клітин лінії L зазначений коефіцієнт може бути знижений з 74-81 до 37-38 %.

Різні амінокислоти споживаються з поживного середовища з неоднаковою швидкістю. Відзначено, що регулярне поповнення аргініну (20-40 мг/л) і збільшення кількості глутаміну до 450 мг/л сприяють зростанню зважених культур.

Додаток інозитулу (0,4 мг/л) дозволяє прискорити зростання культур амніотичних клітин людини. Бажаним є додавання до середовища каталази (1 мг/л) і тироксину (12 мг/л).

Велику цікавість представляють роботи, присвячені отриманню зважених культур клітин у синтетичному середовищі, що не містить сироватки крові. Робляться спроби збільшити в'язкість поживного середовища за рахунок безбілкових інгредієнтів. З цією метою використовується метилцелюлоза і гіалуронова кислота.

Метилцелюлоза в концентрації 0,1-0,2 % володіє максимальним захисним дією на зважені в середовищі клітини. Протективна дія метилцелюлози полягає в тому, що молекули утворюють захисний шар навколо клітини, що запобігає пошкодженню клітин при перемішуванні середовища. Дуже важливим показником

стану суспензійної культури є парціальний тиск кисню в рідкій фазі. Концентрація кисню в газовій фазі залежить від щільності клітинної популяції і нерідко буває нижче атмосферної. Недолік кисню веде до появи грануляції цитоплазми, клітини втрачають правильну округлу форму. При невеликому надлишку кисню клітини мають добре окреслену, правильну, округлу форму, і стають дуже великими при пошкодjuвальній дії надлишку кисню. Оптимальна концентрація кисню для різних клітинних культур знаходиться в межах від 9 до 17 % або 293 мм рт. стовпа. При концентрації кисню вище 20 % відбувається інгібіція клітинного росту. Так, при концентрації кисню 24 % розмноження клітин нирок ембріона кролика (лінія ERK) знижувалося наполовину, а при 30 % зводилося до нуля. Підвищення концентрації кисню він токсично впливає на клітинний метаболізм.

Таким чином, розмноження клітин в суспензії залежить від концентрації клітин у вихідній суспензії, аерації і рН середовища, складу поживного середовища, способу перемішування, об'єму суспензії та інших факторів.

Однорідність суспензії, можливість тривалого підтримки клітин у логарифмічній фазі росту, перспективи математичного моделювання процесів клітинного росту залежно від впливу факторів зовнішнього середовища, зручність багаторазового дослідження фізіологічного стану культури клітин в суспензії, висока економічність методу-ось далеко не повний перелік переваг суспензійних культур.

Суспензійні культури широко використовується у вірусологічних дослідженнях і для накопичення великих кількостей вірусного матеріалу, при виготовленні вакцин і діагностичних препаратів.

*Лабораторні культуральні системи.* У лабораторних умовах суспензійне культивування клітин ссавців (як суспензійних, так і іммобілізованих, а також субстратзалежних інкапсульованих) здійснюється, в основному, у ємностях з магнітною мішалкою і на платформах, що хитаються [2, 15, 123]. Робочий об'єм культуральних ємностей у таких системах звичайно не перевищує 2 л. Однак повідомляється і про більш досконалі лабораторні системи культивування об'ємом 10–16 л [20, 49].

*Мембранні біореактори.* На думку багатьох дослідників найбільш перспективними системами суспензійного культивування клітин є саме мембранні біореактори. У таких реакторах поряд з ультра- і мікрофільтраційними мембранами, використовуються пристрої для культивування клітин на порожнинних волокнах, де такі волокна із селективно проникними стінками розміщені у формі джгута і поміщені в оболонку [84, 77]. Клітини культивуються в порожнині, що знаходиться між джгутом волокон і зовнішньою оболонкою, а також безпосередньо між волокнами. В цьому випадку поживне середовище, збагачене киснем, подається шляхом прокачування уздовж волокон.

*Суспензійне культивування іммобілізованих клітин.* Альтернативним способом культивування клітин, що вдало поєднує у собі елементи поверхневих і суспензійних процесів, є культивування іммобілізованих клітин, зокрема на мікроносіях [105, 160, 121]. Мікроносії (скло, сефадекс, біосилан, цитодекс тощо) являють собою сферичні частки розміром 115-200 мкм, площа поверхні яких складає близько 4600-6000 см<sup>2</sup>/мл. На мікроносіях можливе культивування клітин при концентрації носія 1-5 г/100 мл середовища і щільності  $4 \times 10^6$  клітин/мл в об'ємі до 150 л [163].

Культивування на мікроносіях відноситься до гомогенних процесів, при яких використовують, найчастіше, ті ж процеси й апарати, що і при звичайному суспензійному культивуванні.

У 1967 р. Van Werel запропонував метод культивування, що поєднує елементи моношарова і суспензійного вирощування клітин, який він назвав методом «мікроносіях». Суть його полягає в тому, що клітини прикріплюються і розмножуються на поверхні полімерних «мікроносіях» (МН), які містяться в суспензії за допомогою перемішують, наприклад мішалки. На одній частці МН діаметром 160-230 мм може поміститися 350-630 (або в середньому 460) клітин. В одному мл середовища можна суспендувати кілька тисяч частинок мікроносіїв, при цьому загальна площа їх складе від кількох до 50 см<sup>2</sup>/мл.

Інокульованої в культиватор клітини прикріплюються до поверхні частинок МН і розмножуючись, утворюють суцільний моношар на кожній окремій частці.

Основними перевагами цього методу є:

- 1) створення рівномірних умов по всьому об'єму поємностей, що робить можливим ефективно контролювати необхідні параметри (рН, рО<sub>2</sub> та ін);
- 2) отримання високої щільності клітинної популяції до 5-6 млн. клітин в 1 мл;
- 3) культивування одночасно 10<sup>10</sup> кл/мл;
- 4) ведення постійного контролю за динамікою росту клітин;
- 5) зниження зростання контамінації у зв'язку з скороченням операцій, пов'язаних з розгерметизацією культуральних ємностей;
- 6) значна економії поживних середовищ;
- 7) можливість зберігати вирости клітини безпосередньо на частинках при низьких температурах;
- 8) можливість штучно створювати різні концентрації МН з вирости на них клітинами;
- 9) можливість пасерування культури без застосування трипсину шляхом додавання свіжих порцій мікроносіях.

Мікроносії повинні мати наступні характеристики:

- невеликий позитивний заряд в межах 1,5-1,8 мекв/м<sup>2</sup> (у зв'язку з тим, що більшість клітин тварин мають слабо негативний заряд, вони легше будуть прикріплюватися до такого мікроносія);
- щільність 1,05-1,15 г/см<sup>3</sup> (зазначена щільність є оптимальною для підтримки МН в підвішеному стані);
- діаметр частинок від 100 до 250 мкм, що забезпечує площі для зростання декількох сотень клітин;
- гладку поверхню;
- прозорість;
- відсутність токсичності компонентів для клітин;
- незначне адсорбування компонентів середовища;
- універсальність, що забезпечує можливість використання їх для первинних, диплоїдних і гетероплоїдних клітин.

Важливе значення мають властивості мікроносіїв, які дозволяють використовувати їх багаторазово.

Проведено дослідження багатьох гранульованих препаратів різної хімічної природи, в тому числі з поперечно-зшитого (ПС) декстрану, ПС-агарози, ПС-полівінілпіролідон, поліакрілнітріта, пористого селикагель, полістиролу, капрону, нейлону, алюмосилікати з метою використання їх як мікроносіях. Придатними є тільки деякі з них, головним чином мають у своїй основі ПС-декстран.

Кілька зарубіжних фірм розробили комерційні препарати мікроносіях, готові до вживання: Цітодекс-1, 2, 3 (Франція, Швеція), Суперб (США, Англія), Біосілон (Данія). Вартість перерахованих препаратів досить висока, тому необхідно проводити дослідження з розробки та виробництва вітчизняних МН.

Культивування клітин на мікроносіях проводять у звичайних ферментерах для суспензійного культивування. У ферментері не повинно бути яких-небудь виступів, щоб запобігти накопиченню мікроносіїв в застійних зонах. Тому необхідно використовувати ферментери з круглим дном і гладенькими стінками. Внутрішня поверхня ферментера повинна бути силіконізована для запобігання прилипання мікроносіях до скла або нержавіючої сталі ферментера.

Для контролю за навколишніми культуру умовами такими, як рН і O<sub>2</sub>, може бути використано стандартне устаткування. Швидкість перемішування суспензії з носієм повинна бути 40-60 об/хв. Для вирощування на мікроносіях застосовуються різні типи клітин.

Концентрація цітодекса може варіювати від 0,5 до 5 мг/мл. Однак, при виробництві профілактичних вакцин, застосовують звичайно кінцеву концентрацію цітодекса, що не перевищує 1 мг/мл. Підвищення концентрації до 3 мг/мл і вище створює додаткові труднощі, пов'язані з необхідністю перфузії поживного середовища та часткової її заміни, що ускладнює технологічний процес.

Посівна концентрація клітин, а також умови культивування на МН в перші години в значній мірі визначають оптимальні параметри для проліферації і максимального накопичення клітин. Показано, що посів 10 клітин/мл перещеплюваної лінії нирок мавп (Vero) і диплоїдних клітин фібробластів ембріона людини (MRC-5) у зменшеному до 1/3 об'єму поживного середовища і при періодичному включенні мішалки (30 об/хв) на одну хвилину через щогодини

протягом 4 год, з подальшим додаванням поживного середовища до кінцевого об'єму, веде до збільшення проліферації клітин та їх кількості в порівнянні з контролем (повний обсяг живильне середовище в момент посадки клітин і безперервна робота мішалки з початку культивування).

Важливе значення для культивування клітин на мікроносіїв має живильне середовище. Правильний підбір поживного середовища також буде сприяти оптимізації процесу проліферації клітин та їх якість. Необхідно проводити підбір поживних середовищ для культивування клітин на різних типах мікроносіїв. Показано, що перещеплюваних ліній клітин нирок мавп (Vero) на цитодексе дає найбільший вихід при використанні середовища Ігла ДМЕ (посадковий концентрація клітин  $10^5$  мл) але порівняно з середою ВМЕ і 199. Якщо ж кількість клітин при посіві знизити до  $10^4$ , то кращі результати дає середовище 199. Всі випробовувані середовища містили 10 % фетальної сироватки.

*Спінерне перемішування в суспензійних культуральних системах.* Широке розповсюдження при культивуванні клітин еукаріот, як і мікроорганізмів, одержали системи зі спінерним типом перемішування [195, 76]. Однак при цьому особливості морфології і фізіології клітин ссавців обумовили розробку специфічних конструкцій імперелерів спінерного типу, що забезпечують різні гідродинамічні характеристики при перемішуванні. Так, широко вживана турбінна мішалка з плоскими лопатями забезпечує радіальне турбулентне перемішування. В даному випадку при куті нахилу лопатей  $25^\circ$  досягається оптимальне аксіальне турбулентне перемішування. Такий же ефект досягається і при використанні мішалки типу "морський гвинт", де магнітний стрижень створює радіальне ламінарне перемішування.

Різноманіття пристроїв для перемішування викликане необхідністю створення задовільних гідродинамічних умов з мінімізацією травмування клітин у процесі роботи [195, 121].

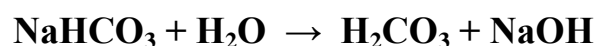
*Використання низькочастотних коливань у системах культивування клітинних культур.* Одним зі способів перемішування в суспензійних системах культивування клітин є накладення низькочастотних коливань на взаємодіючі фази [133]. Існують два способи введення низькочастотних коливань: створення зворотно-

поступального руху взаємодіючих фаз і створення коливального руху контактних елементів. Біореактори, в яких використовують перший спосіб, одержали назву пульсаційних, використання другого способу – вібраційним [165].

*Досягнення оптимальної гомогенності і газозабезпечення при суспензійному культивуванні.* При суспензійному біосинтезі клітинних культур велике значення має конструкція імелера, функція якого полягає в перетворенні прикладеної енергії в гідродинамічне перемішування в осьовому, тангенціальному і радіальному напрямках. Перемішування забезпечує створення гомогенної суміші, підтримку клітин у суспензії, оптимізацію швидкості переносу маси між біологічною, рідкою і газовою фазами, а також полегшення теплопередачі [191].

Насичення клітинної суспензії киснем залежить від швидкості обертання, конфігурації імелера і геометрії біореактора [165, 183]. З огляду на це, поліпшення постачання киснем культуральних систем проводиться в основному за принципом конструювання перемішувачів пристроїв [191]. Так, для досягнення інтенсифікації газозабезпечення, використовують поверхневий аератор, який являє собою диск з отворами або горизонтальними лопатями, розташований на центральному валу на рівні розділу фаз. Використання поверхневого аератора дозволяє значно збільшити коефіцієнт масопередачі [172].

У випадку, якщо припустимо використання барботажу як для аерації, так і перемішування клітинної суспензії, використовується бульбашкові барботажні колонки – ерліфтні біореактори [140]. Слід однак зазначити, що широке застосування ерліфтних біореакторів обмежене однією обставиною методичного характеру. У більшості середовищ для культивування клітин тварин, як і в крові, в якості компонента, підтримуючого рівень рН, використовується бікарбонатний буфер. У розчині бікарбонату здійснюється рівновага:



але вугільна кислота, будучи нестійкою кислотою, розкладається на  $\text{CO}_2$  і  $\text{H}_2\text{O}$ :



Якщо  $\text{CO}_2$  видаляється з середовища внаслідок інтенсивного барботажу, то рівновага зміщується вправо, тобто відбувається зміна рН середовища у бік

залужування. Для підтримки рН використовують збільшення концентрації амінокислот або заміну бікарбонату синтетичними органічними буферами [69]. При цьому спостерігається тенденція до максимальної автоматизації управління та контролю за процесом культивування клітин [92].



## РОЗДІЛ 2. Технологічна частина

### 2.1. Характеристика вакцини Грипол

Вакцина протигрипозна субординична концентрована очищена інактивована суха. АТС класифікація – J07B Вірусні вакцини.

Ліофілізат для приготування розчину для внутрішньом'язових ін'єкцій в ампулі по 1,0 мл (1 доза), №5 в комплекті з розчинником (вода для ін'єкцій) по 1,1 мл в ампулі, №5

Препарат являє собою вакцинний вірус грипу штаму «А/17/Потсдам/86/92 (H3N2)», вирощений у первинній культурі клітин нирок сирійських хом'ячків, інактивований ультрафіолетовими проміннями, концентрований методом ультрафільтрації з наступною очисткою методом гельхроматографії.

Таблиця 2.1

#### Речовини, що входять до складу препарату

Назва інгредієнту	Вміст на 1 дозу (1,0 мл)
<i>Діюча речовина</i> Специфічний антиген вірусу грипу штаму «А/17/Потсдам/86/92 (H3N2)»	2,5 МО
<i>Альбумін</i> (розчин для інфузій 10% ФСП 42-0359-4812-03, розчин для інфузій 20% ФС 42-3543-98) – стабілізатор	5,0 мг
<i>Сахароза</i> (фірми «Мерк», Німеччина, номер за каталогом 1.07653) – стабілізатор	75,0 мг
<i>Желатин</i> (фірми «Мерк», Німеччина, номер за каталогом 1.04078) - формоутворювач	10,0 мг

Препарат не містить консервантів та антибіотиків.

**Форма випуску.** Ліофілізат для приготування розчину для внутрішньом'язових ін'єкцій в ампулі по 1,0 мл (1 доза), №5 в комплекті з розчинником (вода для ін'єкція) по 1,1 мл в ампулі, №5.

**Призначення.** Для лікувально-профілактичної та профілактичної імунізації людини проти вірусу грипу.

Таблиця 2.2

### Специфікація

Найменування показників контролю	Встановлені значення	
Опис	Пориста маса білого кольору, гігроскопічна	За п.1 АНД, візуально
Автентичність	Вакцина повинна викликати специфічний імунітет до вірусу грипу при імунізації мишей	За п.2 АНД, біологічним методом
Час розчинення	Вакцина повинна повністю розчинятись протягом 5 хвилин при внесенні 1,0 мл розчинника (вода для ін'єкцій) на одну дозу вакцини	За п.3 АНД, ДФУ, вид. 1, р. 2.9.3, с. 153, візуально
Опис відновленого препарату	Вакцина, що була розчинена в 1,0 мл розчиннику (вода для ін'єкцій), повинна бути прозорою або слабко опалесцюючою, від безколірного до світло-жовтого кольору	За п. 4 АНД, візуально
Прозорість	Розчинена вакцина повинна бути прозорою або злегка	За п.3 АНД, ДФУ, вид. 1, р. 2.2.1, с.

	опалесцюючого, не більш ніж еталон I	15, візуально
Забарвлення	Розчинена вакцина повинна бути від безкольорової до світло-жовтої, не більш ніж еталон № 56	За п.6АНД, ДФУ, вид. 1, р. 2.2.2, с. 15, візуально
Втрата в масі при висушуванні	Не більш 2 %	За п.8 АНД,ДФУ, вид. 1, р. 2.2.32, с.49
Герметизація	Ампули повинні бути герметичні. Протягом 7 днів після запаювання пориста маса усередині ампул (таблетка) не повинна міняти свою форму та різко зменшуватися в об'ємі	За п.9 АНД, візуально
Загальний білок	Не більш ніж 5,0 мг на дозу (1,0мл)	За п. 10 АНД, ДФУ, вид. 1, р. 2.2.25, с. 36, методом Лоурі
Альбумін бичачий сироватковий	Не більш ніж 0,5 мкг на дозу (1,0 мл)	За п.АНД, методом ракетного імуноелектрофорез
Стерильність	Препарат має бути стерильним. Не повинен містити бактерій, грибів, мікоплазми	За п. 12 АНД, ДФУ, вид. 1, р. 2.6.1, с. 103, (МУК 4.1/4.2.588-96, с. 25, с. 59), методом прямого висівання або методом мембранної фільтрації
Аномальна	Вакцина має бути нетоксичною	За п. 14 АНД,

токсичність		ДФУ, вид. 1, р. 2.6.9. с. 109, (МУК 4.1/4.2.588-96)
Специфічна нешкідливість	Вакцина не повинна містити живий вірус грипу	За п. 15 АНД, біологічним методом
Специфічна активність (імуногенність)	Не менш ніж 2,5 МО в одній дозі (1,0 мл)	За п.16 АНД, біологічним методом

## **2.2. Методи контролю**

### 1. Опис

Пориста маса білого кольору, гігроскопічна. Визначають візуально.

### 2. Автентичність

Вакцина повинна викликати специфічний імунітет до вірусу грипу при імунізації мишей. Визначення проводять за методикою, викладеною в її. 16 АНД «Специфічна активність (імуногенність)».

### 3. Час розчинення

Вакцина повинна повністю розчинитись протягом 5 хвилин при внесенні 1,0 мл розчинника (вода для ін'єкцій) на одну дозу вакцини. Визначають згідно з ДФУ, вид. 1, р.2.9.3, с. 153, візуально .

### 4. Опис відновленого препарату

Вакцина, розчинена в 1,0 мл розчиннику (вода для ін'єкцій), повинна бути прозорою або слабо оплесцюючою, від безколірної до світло-жовтого кольору. Визначають візуально.

### 5. Прозорість

Розчинена вакцина повинна бути прозорою або злегка опалесцюючою, не більш ніж еталон І. Визначають згідно з ДФУ, вид. 1, р .2.2.1, с. 15, візуально.

### 6. Забарвлення

Розчинена вакцина повинна бути від безкольорової до світло-жовтої, не більш ніж еталон № 56. Визначають згідно з ДФУ, вид. 1, р. 2.2.3, с. 15, візуально.

#### 7. рН

Повинен бути в межах 7.2 - 7.8. Визначають згідно з ДФУ, вид., 1, р. 2.2.3, с. 17, потенціометрично. Контроль проводять після розчинення препарату в 1,0 розчинника.

#### 8. Втрата в масі при висушуванні

Не більш 2%. Визначають згідно з ДФУ, вид. 1, р. 2.2.32, с. 49. 0.15 - 0.20 г препарату вкладають в бюкси та сушать у вакуум-сушильній шафі при температурі  $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$  і тиску, що не перевищує 0.667кПа (5 мм рт. ст.). Бюкси з закритими кришками витримують в ексікаторі в присутності кальцію хлориду безводного протягом 30-40 х вили її до повного охолодження та зважують.

#### 9. Герметизація

Ампули повинні бути герметичні. Протягом 7 днів після запаювання пориста маса в середині ампул (таблетка) не повинна міняти свою форму та різко зменшуватися в об'ємі. Визначають візуально.

Контролю підлягає 100% ампул. У випадку розгерметизації протягом 7 днів після запаювання пориста маса змінює свою форму, при цьому зменшується в об'ємі. Поверхня таблетки обводнюється та карамелізується, пориста маса білого кольору стає напівпрозорою й краплеподібною за формою.

#### 10. Загальний білок

Не більш ніж 5,0 мг на одну дозу (1,0 мл). Визначають згідно з ДФУ, вид. 1, р. 2.2,25, с. 36, методом Лоурі.

Принцип методу. Метод базується на здатності ароматичних амінокислот давати кольорову реакцію з реактивом Фоліна у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки.

До 1 мл досліджуваного розчину, що містить 50-150 мкг білку, додають 5 мл реактиву С. Вміст пробірки перемішують і залишають на 10 хвилин при

температурі 18-20°C. Потім додають 5 мл реактиву Фоліна і пробу залишають па 30 хвилин. Оптичну щільність вимірюють на фотоелектрокалориметрі або спектрофотометрі при довжині хвилі 750 і в кюветах з товщиною шару 10 мм у порівнянні з контрольним розчином, що містить 1 мл розчиннику, 5 мл реактиву С і 0,5 мл реактиву Фоліна. Вміст білку розраховують за калібрувальним графіком.

### 11. Альбумін бичачий сироватковий

Не більш ніж 0.5 мкг на одну дозу (1.0 мл). Визначають методом ракетного імупоелектрофорезу. Для аналізу використовують вакцину, яку розчиняють в розчиннику з розрахунку 0,5 мл па дозу. В якості антисироватки використовують сироватку, преципітуючі білки сироватки крові рогатої худоби, адсорбовану кролячу діагностичну для судово-медичної мети, рідку. Чутливість сироватки визначають попередньо та використовують в такій концентрації; при якій з 0,5 мкг/мл БСА утворюється чітка ракета з висотою піка не менш 1 мм.

Принцип методу. Метод базується на здатності антигену мігрувати в електричне поле і гель, що містить антисироватку, внаслідок чого відбувається реакція преципітації. Лінія преципітації утворює пік (ракету), висота якої пропорціональна концентрації внесеного антигену.

В хімічну пробірку з 16 мл розтопленого і охолодженого до температури 56°C 1% -го гелю агарози вносять 16 мкл сироватки проти БСА з титром 1:1000 (або 32 мкл сироватки з титром 1:500) і перемішують. Вміст пробірки виливають па скляну пластину, встановлену на горизонтальній поверхні. Пластина повинна покритися агарозовим гелем рівномірно і повністю, щільність гелю (1,0-Н),1) мм. Після затвердіння гелю пластинку накладають на трафарет і пробивають лунки пробійником діаметром 4 мм.

Гель з лунок видаляють за допомогою вакуумного насосу та голки. Вкладають пластинку у прилад для електрофорезу. В камеру приладу наливають 1,5 л електродного буферного розчину. З'єднують поверхню агарози з буферним розчином за допомогою гнотів (5 шарів фільтрувального паперу

розміром 120 x 60 мм або 1 шар паперу «Ватман 3М»). Відстань від краю гноту до лунок повинна бути не менш 15 мм.

В лунки мікрошприцем або автоматичною піпеткою вносять по 15 мкл розчину бичачого сироваткового альбуміну для калібрувального графіку і досліджувані проби. Кожну пробу вносять у 2 лунки. Час від початку внесення зразків до включення приладу в мережу не повинен перевищувати 10 хвилин. Прилад включають у мережу і проводять електрофорез при напрузі 6-8 В на 1 см довжини гелю і силі струму 6 мА протягом 18-20 і годин. По закінченню електрофорезу пластинку переносять у кювету з 0,9 % розчином натрію хлориду і промивають, двічі змінюючи цей розчин. Пластинку виймають, накривають фільтрувальним папером, проколюють голкою напір над лунками і висушують при температурі 18-20 °С.

Пластинку з висушеним гелем переносять у кювету з барвником па 15-20 хвилин, потім в кювету з розчином для знебарвлення пофарбованих гелів на 1-3 хвилин, потім промивають у водопровідній воді і висушують при температурі 18-20°С. Вимірюють висоту піку (Б) за допомогою лінійки. Виміри роблять від краю лунки до зовнішнього краю піку. Концентрацію бичачого сироваткового альбуміну в досліджуваній пробі визначають за калібрувальним графіком, котрий відтворюють при кожному аналізі. Калібрувальний графік повинен проходити через початок координат.

## 12. Стерильність

Препарат повинен бути стерильним. Не повинен містити бактерій, грибів, мікоплазми. Визначення проводять згідно з ДФУ, вид. 1, р. 2.6.1, с. 101, с. 103, (МУК 4.1/4.2.588-96, с. 25), методом прямого висівання або методом мембранної фільтрації. Тест на відсутність мікоплазми проводять згідно з МУК 4.1/4.2.588-96, с. 59, мікробіологічним методом.

Відновлену в 1 мл вакцину вводять кроликам вагою 1,5-2,5 кг в ушну вену зі швидкістю 0,1 мл/сек. Тест-доза 1,0 мл (1 доза для людини) вакцини на одного кроля.

### 13. Аномальна токсичність

Препарат повинен бути нетоксичним. Визначення проводять згідно з ДФУ, вид. 1, р. 2.6.9, с. 109.

Випробування проводять на двох видах тварин: білих мишах обох статей масою 18-20 г та морських свинках обох статей масою 250-350 г. Препарат вводять внутрішньочеревно 5 мишам в дозі, яка дорівнює одній максимальній разовій дозі для людини (1 мл па мишу) та підшкірно 2 морським свинкам в дозі, яка дорівнює двом разовим дозам людини (2,0 мл) па морську свинку. Строк спостереження - 7 днів.

### 14. Специфічна нешкідливість

Вакцина не повинна містити живого вірусу грипу. Визначають біологічним методом.

Для визначення специфічної нешкідливості проводять пасаж вакцини в первинній культурі клітин нирок сирійських хом'ячків. У флакони площею 300 см<sup>2</sup> з поживним середовищем 199 з додаванням 5-10% сироватки великої рогатої худоби рідкої вносять по 200 мл клітинної зависі нирок сирійських хом'ячків, що містить 100-200 тис. кл/мл. Культуру інкубують 5-6 діб при температурі (37±1)°С . Потім відбирають флакони з повністю сформованим клітинним моношаром. Для контролю на специфічну нешкідливість від кожної досліджуваної серії вакцини відбирають по 25 ампул з ліофілізованою вакциною. В кожну ампулу вносять по 1,0 мл розчинника. Відновлену вакцину об'єднують у одну ємкість. З відібраних флаконів з первинною культурою клітин нирок сирійських хом'ячків зливають культуральну рідину. По 12,5 мл відновленої вакцини вносять у 2 флакони, 2 незаражених флакони залишають, як контрольні. Усі флакони вміщують у термостат па 90 хвилин при температурі (37±1)°С для сорбції. Після сорбції в заражені та контрольні флакони вносять по 200 мл розчину Ігла з додаванням 0,5% гідролізату лактальбуміну. У підтримуюче середовище додають 5% сироватку великої рогатої худоби та 4% розчин для ін'єкцій гентаміцин сульфату у кінцевій концентрації не більш 80 мкг/мл. Ма 7-8 добу інкубації при температурі



(32±1)°C з кожного флакону беруть пробу культуральної рідини в об'ємі 5.0 мл, змішують проби та вводять у головний мозок по 0.03 мл 10-ти безпородним мишам вагою від 6 до 7 г.

Аналогічно випробовують культуральну рідину з контрольних флаконів. За тваринами спостерігають 21 добу. При захворюванні хоча б однієї миші, починаючи з 5 доби спостереження, за клінічними ознаками грипу, підтвердженого дослідженнями мозку мишей методом імунофлюоресценції досліджувану серію вакцини бракують. При отриманні негативного результату в імунофлюоресценції проводять повторний контроль на подвоєній кількості проб з вказаною вище культурою клітин та подвоєною кількістю мишей.

При загибелі більш ніж 2 мишей без клінічних симптомів захворювання грипом дослід повторюють.

При загибелі однієї або двох мишей без клінічних симптомів захворювання, починаючи з 5 доби, мозок мишей досліджують методом імунофлюоресценції. У випадку негативної відповіді вважають, що вакцина не містить вірусу грипу. У випадку сумнівного результату проводять повторний контроль на подвійній кількості проб з вказаною вище культурою клітин і подвоєною кількістю мишей. При захворюванні хоча б однієї миші з клінічними ознаками грипу, при повторному контролі, досліджувану серію вакцини бракують.

#### 15. Специфічна активність (імуногенність)

Вакцина повинна мати специфічну активність не менш ніж 2,5 МО на одну дозу.

Визначення специфічної активності (імуногенності) проводять за методикою Національного інституту здоров'я США (N111) та у відповідності з «Свідоцтвом па галузевий стандартний зразок імуногенної активності вакцини аитирабічної культуральної концентрованої очищеної інактивованої сухої - ОСО 42-28-380-05», ДІ.СК ім. Л.А. Тарасовича. Для визначення специфічної активності від кожної випробовуваної серії беруть не менш: 3 ампул на 1

імунізацію. Вміст ампул з ліофілізованою вакциною розчинюють в розчиннику, вносячи по 1,0 мл на одну дозу вакцини, об'єднують в одну ємкість і готують ряд розведень з п'ятикратним інтервалом 1:5; 1:25; 1:125; 1:625; 1:31.25 на середовищі 199, що містить 0,1% альбуміну.

Вміст ампул ГСЗ відновлюють водою для ін'єкцій до 1 Міжнародної одиниці на мл і готують п'ятикратні розведення 1:5; 1:25; 1:125; 1:625; 1:3125 на середовищі 199, що містить 0,1% альбуміну (розчину для інфузій). Пробірки з розведеною вакциною і ГСЗ зберігають на льоді протягом часу постановки досліду (не більш 4 годин).

Для імунізації використовують безпородних мишей або мишей лінії Ва1/с у віці 4-6 тижнів вагою 12-14 г без різниці статі. Кожним розведенням вакцини і ГСЗ імунізують не менш 11 тварин, 40-50 мишей з тієї ж групи пересаджують в окремі клітки та утримують до проведення контрольного титрування тест-штаму СУ8 вірусу грипу. Мишей імунізують внутрішньочеревно по 0.5 мл двократно з інтервалом 7 діб. В якості тест-штаму використовують штам СУ8 фіксованого вірусу грипу (офіційна колекція штамів вірусів ФДУП «ДІСК ім. Л.Л. Тарасевича» Росспоживнагляду, номер депозиту 78/00). Через 7 діб після другої імунізації мишам вводять вирішальну дозу тест-штаму СУ8 в мозок в об'ємі 0,03 мл шприцем об'ємом 1 см з поділкою 0.01, використовуючи голки № 26, 27 довжиною 1-1.5 см діаметром 0.40-0.45 мм. Вирішаючи дозу тест-штаму СУ8, що містить від 20 до 100 ЛД<sub>50</sub> і визначають за результатами попереднього титрування па мишах. Якщо титр вірусу, наприклад, дорівнює 1СГ<sup>67</sup> ДД<sub>50</sub> /0.03 мл, то в 0.03 мл розведення КГ<sup>10</sup> містяться 500 ЛД<sub>50</sub>. При подальшому розведенні в 5, 10 або 20 разів можна отримати дозу, що дорівнює 100, 50 або 25 ЛД<sub>50</sub> відповідно. Для зараження всіх імунізованих мишей застосовують те вибране розведення, яке містить вирішальну дозу вірусу.

На контрольній групі мишей одночасно з введенням вірусу проімунізованим тваринам і проводять тарування тест-штаму СУ8, використовуючи вирішальну дозу та її десятикратні розведення, які зроблені на волі для ін'єкцій з додаванням 2 % сироватки кінської крові нормальної рідкої,

інактивованої протягом 30 хвилин при  $(56\pm 1)^\circ\text{C}$ . Вирішальною дозою і кожним розведенням заражають не менш 10 мишей в мозок в об'ємі 0.03 мл. За мишами спостерігають протягом 14 діб після зараження. По закінченню досліду підраховують точну дозу вірусу, використану в якості вирішальної, за методом Рида і Менча. При оцінці результатів досліду враховують мишей, які захворіли або вмерли з 5 по 14 добу.

#### 16. Термостабільність

Повинна бути термостабільною. Специфічна активність (імуногенність) вакцини після прогрівання повинна бути 2,5 МО на дозу. Зразки вакцини витримують для випробування протягом 4 тижнів при  $37^\circ\text{C}$ . Для дослідження використовують не менш 6 ампул кожної серії (див. п. 1.6 АНД «Специфічна активність (імуногенність).

Виробничий штам: атенуйований штам фіксованого вірусу грипу «А/17/Потсдам/86/92 (H3N2)», номер депозиту 463/84 в офіціальній колекції виробничих штамів вірусів ФДУІІ «ДІСК ім. Л.Л. Тарасевича» Росспоживнагляду і виробничий (маточний) штам вірусу грипу підтримується на рівні 29-3 1 серійних пасажів в культурі первинних клітин НСХ.

Серії робочого посівного вірусу готують з виробничого штаму на рівні 32-37 пасажів в культурі первинних клітин НСХ.

Серії виробничого і посівного вірусу повинні бути вільні від бактеріальної і грибової коштам і нації; не містити мікоплазм, мікобактерій туберкульозу і сторонніх агентів; мати антигенну специфічність; мати інфекційний титр (в рідкій фазі) при внутрішньомозковому зараженні безпородних білих мишей вагою 6-7 г не нижче  $\text{H})^{60} \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$ .

#### 17. Пакування

Вакцина по 1 дозі (1,0 мл до ліофілізації) в ампулах ШП-3 зі скла марки ПС-1 за ГОСТ 64-2-485-85 або аналогічних за якістю (за 180 9187).

Розчинник (вода для ін'єкцій в ампулах) - по 1,1 мл в ампулах і 1111-3 зі скла марки НС-1 за ГОСТ 64-2-485-85 або аналогічних за якістю (за 180 9187).

Випускають в комплекті: 1 ампула, що містить 1 дозу (1,0 мл) вакцини та 1 ампула, що містить 1.1 мл розчинника, 5 комплектів в пачці з розчинником і його об'єм в ампулі, реєстраційний номер, дату реєстрації, номер ліцензії, термін її дії, штрих-код, сигнальну смугу, попереджувальні написи: «Стерильно», «Препарат не містить консервантів і антибіотиків», «Зберігати у недоступному для дітей місці», «Для лікувально-профілактичних і санітарно-профілактичних закладів», «Заморожування не допускається».

Підприємство-виробник усі зазначені написи на коробці робить українською мовою. Використання стакеру цією аналітично-нормативною документацією не передбачене. Графічне оформлення етикеток транспортної тари (РД 42-1 100/1440-11-113), транспортної тари (ГОСТ 14192-96). На ящик наносять додатковий попереджувальний напис «БІОПРЕПАРАТИ».

Транспортування. Усіма видами критого транспорту при температурі від 2 до 8°C з дотриманням правил холодового ланцюга. Заморожування не допускається.

Зберігання. При температурі від 2 до 8°C, у сухому, захищеному від світла місці. Заморожування не допускається.

Термін придатності. Два роки.

### **2.3. Створення штаму для приготування вакцини Грипол**

За спектр антигенів, що включаються у вакцину, відповідальна Всесвітня Організація Охорони Здоров'я. Вона в своєму розпорядженні має мережу національних лабораторій з грипу в 80-ти країнах світу, які під час епідемій виділяють від хворих епідемічні штами вірусів і розсилають їх у 4 центри, які співпрацюють з ВООЗ.

Всі виділені штами ретельно аналізуються, і в лютому збираються всі керівники цих центрів.

За результатами дискусії формуються нові рекомендації - які варіанти вірусів повинні бути використані для приготування нових вакцин на цей рік. Цю інформацію

отримують всі фірми, що виробляють вакцини. Вони встигають підготувати рекомендовані ВООЗ штами, та запускають в технологічний процес [6].

До червня-вересня цього року вакцини готові і надходять у продаж. Штамовий складу вакцин на сезон 2011/2012 рр. залишився таким самим як і в минулому сезоні і відповідає рекомендаціям ВООЗ і ЄК для північної півкулі:

Тип вірусу грипу А, підтип А/Н3N2 представлений штамом А/Москва/10/99.

Тип А, підтип А/ Н1N1 - штам А / Нова Каледонія/20/99.

Тип В - штам В/ Гон-Конг /330/011.

Для одержання штаму для виробництва вакцини Грипол була реалізована наступна схема створення штаму та його адаптація для виробничих потреб.

Донор атенуації А/Ленінград/134/17/57 (Н2N2) - штам вірусу грипу, дозволений для отримання нешкідливих інтраназальних вакцин для дорослих і дітей. Застосовувані в даний час вакцинні штами для живих грипозних вакцин (ЖГВ) отримують методом реасортації сучасних епідемічних вірусів з холодоадаптованими донорськими штамми, в результаті чого утворюються реасортанти, що мають змішаний геном. Гени, що кодують гемаглютинін і нейрамінідазу, успадковуються від антигенно актуального епідемічного штаму, а шість генів внутрішніх та неструктурних білків (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) - від нешкідливого холодоадаптованого донора аттенуації. Відомий вакцинний штам А/17/Новая Каледонія/99/145 (Н1N1), а також вакцинний штам А/17/Панама/99/242 (Н3N2) був покладений в основу донора аттенуації А/Ленінград/134/17/57 (Н2N2).

Відносно створення вакцинного штаму, що містить поверхневі антигени вірусу грипу підтипу Н5N2 була обрана стратегія, аналогічна отриманню реасортантних штамів на основі донора аттенуації А/Ленінград/134/17/57 (Н2N2) з сучасними епідемічними вірусами Н1N1 і Н3N2. Реасортантний штам А/17/Потсдам/86/92 (Н3N2) - позначення «Лен17/Н5» - був отриманий методом класичної генетичної реасортації в курячих ембріонах (РКЕ) апатогенного пташиного вірусу А/Потсдам/1402-6/86 (Н3N2) з холодоадаптованим штамом А/Ленінград/134/17/57 (Н2N2). Метод класичної генетичної реасортації включає Ко-інфікування сумішшю батьківських вірусів в еквівалентних інфекційних дозах, після

чого отримується вірусний матеріал. Після чого вірус суспендується 3-4 рази при зниженій до 25 °С температурі у присутності антисироватки до донору аттенуації А/Ленінград/134/17/57 (H2N2), після чого проводиться клонування методом кінцевих розведенні. Отримані клони піддаються детальному аналізу. Аналіз геному одного з отриманих реассортантом (А/17/Потсдам/86/92 (H3N2) був виконаний за допомогою ПЛР-рестрикційного аналізу і частковим або повним секвенуванням ДНК-копій окремих генів. Отримані за допомогою ЗТ-ПЛР ДНК-копії сегментів PB2, PB1, PA, NP, M, NS і NA обробляли відповідно ендонуклеазами рестрикції Tru9I, HindIII, BamHI, AsnI, EcoRI, PvuI, NciI, SphI відповідно. Додатково копії сегментів PB1, PA і M були оброблені рестриктазами BstXI, AsnI BciVI. було показано, що сайти рестрикції в положеннях нуклеотидної ланцюга, характерні для донора аттенуації А/Ленінград/134/17/57 (H2N2), присутні в генах PB2 (1459), PA (107 і 1045), NP (1066), M (68 і 969), NA (78). Водночас втрачені сайти рестрикції в генах PB1 (819 і 975) і NS (798), що також характерно для донора аттенуації А/Ленінград/134/17/57 (H2N2). Таким чином показано, що реассортантом успадкував ген NA і 6 генів неглікозильованих білків від донора аттенуації А/Ленінград/134/17/57 (H2N2).

Антигенні властивості реассортантного штаму А/17/Потсдам/86/92 (H3N2).

Належність NA реассортантом батьківському штаму «дикого» типу А/Потсдам/1402-6/86 (H3N2) підтверджена в реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) з набором імунних антисироваток. РГГА проводили в 96- лункових планшетах для імунологічних реакцій, в які послідовно вносили послідовні падаючі розведення імунних антисироваток з кроком 2, відповідні антигени в стандартній дозі (4 аглютинуючих одиниці) і 0,75 % суспензія еритроцитів індика. Титр антигемаглютиніруючих антитіл виражали як величину, зворотну найбільшому розведенню сироватки, при якому спостерігалось гальмування аглютинації.

Було показано, що вакцинний кандидат для створення вакцини Грипол – А/17/Потсдам/86/92 (H3N2) антигенно ідентичний батьківському штаму А/Потсдам/1402-6/86 (H3N2) (Таблиця 1.1).

*Таблиця 2.3*

**Антигенна специфічність реассортантного вакцинного штаму  
А/17/Потсдам/86/92 (H3N2)**

Антигени	Антисироватка тхора					
	ГК/156	Г/ГК	ВН/113	ВН/342	ГК/213	Лен17/Н5
А/Гонконг/156/97	320	160	640	640	<20	160
А/Гонконг/437-4/99	640	640	5120	2560	640	1280
А/Вьетнам/113/01	160	40	2560	320	160	80
А/Вьетнам/342/01	320	160	320	2560	<20	640
А/Гонконг/213/03	640	160	10240	2560	2560	640
Лен17/Н5	160	40	1280	640	<20	640
А/Потсдам/86	160	80	1280	640	<20	640
А/Гонконг/409.1/02	160	80	5120	320	640	320
А/Гонконг/668.1/01	160	80	640	640	160	160

#### **2.4. Технологія одержання вакцини Грипол**

Технологія виробництва протигрипозної вакцини Грипол підпорядковується правилам Належної виробничої практики. Розглянемо основні етапи виробництва даної вакцини.

Опис технологічної схеми:

##### ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

##### ДР 1.1. Підготовка персоналу

Полягає в забезпеченні персоналу спеціальним одягом, а в разі необхідності і взуттям та іншим необхідним оснащенням. Одяг виготовляється зі спеціальної тканини, яка повинна мати мінімальне ворсовиділення, пиломісткість, пилепроникність та повітряпроникність – не менше  $300\text{м}^3/(\text{м}^2\cdot\text{с})$ . Важливою також є частота зміни одягу, яка залежить від пори року і кліматичних умов. Також до працівників фармацевтичних підприємств висуваються жорсткі вимоги відносно їх особистої гігієни та чистоти.

### ДР 1.2. Підготовка одягу

Підготовка комплекту технологічного одягу складається з: огляду одягу безпосередньо перед пранням, пранням, сушкою та термічною обробкою (в паровому стерилізаторі або прогладжуванням. Перед пранням проводять огляд, оцінку ступеня її зносу, виявлення пошкоджень, перевірку роботи застібок та розділення одягу за кольором та призначенням. За наявності дефектів одяг ремонтується або замінюється новим.

Огляд стану технологічного одягу перед пранням або ремонтом проводиться в спеціальному приміщенні С класу чистоти.

#### ДР 1.2.1 Прання та сушіння одягу

Прання одягу здійснюється в пральній машині. Для прання використовують синтетичні миючі засоби у відповідності до рекомендаціями для обладнання, що використовується пральними підприємствами.

Рекомендована концентрація розчину – 2г/л. На кожен кілограм завантаженої білизни має приходитись не менш ніж 10 л розчину миючого засобу. Сушіння одягу проводиться в сушильній шафі, в яку через фільтр тонкого очищення типа НЕРА поступає тепле повітря.

#### ДР 1.2.2. Стерилізація одягу

Далі одяг надходить на обладнання для пакування чистого одягу. Стерилізацію технологічного одягу проводять так: після закінчення сушки кожен комплект технологічного одягу загортають в два шари пергаменту або спочатку поміщають в мішечки з безворсової тканини, а потім загортають. Після цього згортки поміщують в бокси або контейнери з кришками, що закриваються, і стерилізують в автоклаві при температурі 120 °С і тиску від 0,09 до 0,11 МПа протягом 1 год. Технологічний одяг для класів С, D не підлягає стерилізації

Одяг зберігається у спеціальних шафах для зберігання одягу не більше двох діб.

Контроль мікробної контамінації технологічного одягу проводить мікробіолог один раз на тиждень під час виробничого процесу у декількох працівників, і один раз на два тижні перед початком роботи. У процесі роботи допускається наявність не



більше двох колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на двох рівнобіжних чашках Петрі.

### ДР 1.3 Підготовка приміщень

Підготовка приміщень є важливою умовою для виробництва готової продукції. Для приміщень є певні вимоги, яких слід дотримуватися при їх будівництві. Це, насамперед, стіни, підлога і стеля, які мають бути гладкими, легко очищатися, бути непроникними і неушкодженими, щоб звести до мінімуму утворення і накопичення пилу та мікроорганізмів, а також забезпечити можливість багаторазового застосування очищувальних і дезінфікуючих засобів.

#### ДР 1.3.1 Щоденне прибирання

Після роботи з приміщень вилучають препарати, інвентар, матеріали. Вимикають обладнання. Використовують бактерицидні лампи. Перед роботою роблять вологе прибирання. Обробку приміщень проводять 0,5 % розчином Біомою з 1 % розчином Деконексу 50 ФФ.

Стіни, двері та інші поверхні протирають безворсовою серветкою, змоченою робочим розчином, потім цим же розчином миють підлогу.

Після закінчення вологого прибирання персонал покидає приміщення. При використанні бактерицидних ламп їх вмикають на 1 год. Не менше ніж на 30 хв. до початку роботи лампи відключають та вмикають вентиляцію.

#### ДР 1.3.2 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводять вологим способом раз на 5-6 днів наприкінці робочого тижня. Прибирання проводять 1 % розчином Деконексу 50 ФФ з 0,5 % розчином миючого засобу Біомой.

Стіни, двері, стеля та інші поверхні зрошують з гідропульта або вручну робочим розчином з розрахунку (150-200) мл/м<sup>2</sup>.

Після цього персонал покидає приміщення, і його зачиняють на 30-40 хв. Потім надлишок розчину прибирають за допомогою безворсових серветок. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином.

Можлива обробка приміщення бактерицидними лампами. Вмикають бактерицидні лампи на 1 год. Не менш, ніж за 30 хв до початку роботи лампи відключають та вмикають вентиляцію.

На чисте приміщення поміщають етикетку з датою обробки та підписом особи, яка відповідає за обробку.

Чистоту повітря виробничих приміщень контролюють на мікробну контамінацію. В процесі роботи в змивах із поверхонь приміщень допускається наявність не більше п'яти колоній на двох паралельних чашках Петрі для приміщень С і D класу чистоти.

Підготовка виробничих приміщень відображається в протоколі, який додають до протоколу серії.

#### ДР 1.4 Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів

Робочі розчини миючих та дезінфікуючих засобів готують у спеціально виділеній промаркованій тарі з корозійно-стійких матеріалів.

Допускається готувати розчини мийних та дезінфекційних засобів безпосередньо в технологічних ємностях і резервуарах, що призначені для циркуляції розчинів, з урахуванням корозійної стійкості матеріалів з яких вони виготовлені.

Для приготування розчинів мийних та дезінфекційних засобів хіміко-фармацевтичної промисловості використовують воду очищену.

#### ДР 1.4.1 Приготування 0,5 % розчину Біомою.

На стадії приготування розчину миючого засобу Біомой необхідно дотримуватися запобіжних заходів при зважуванні і завантаженні.

Сировина зберігається на складах. В окремому приміщенні знімають первинну упаковку з сировини і на візку транспортують в приміщення формування наважок. Зважування порошку, роблять у поліетиленових пакетах в чистому приміщенні, з використанням засобів індивідуального захисту.

На терезах зважують 50г порошку Біомою. Порошок поміщають в бікси та транспортують на візку на ділянку приготування розчину. Ємність з мішалкою заповнюється водою очищеною об'ємом 10 л та температурою 45 °С. Після закінчення процесу наповнення в ємність, вручну, через люк, завантажують наважку

миючого засобу. Перемішують вміст ємності до повного розчинення миючого засобу протягом  $10 \pm 1$  хв. Контроль розчинення проводять візуально

ДР 1.4.2 Приготування 0,5% розчину Неохлору.

На стадії приготування мийно-дезінфікуючого засобу Неохлору необхідно дотримуватися запобіжних заходів при зважуванні і завантаженні.

Сировина зберігається на складах. В окремому приміщенні знімають первинну упаковку з сировини і на візку транспортують в приміщення формування наважок. Зважування порошку, роблять у поліетиленових пакетах в чистому приміщенні, з використанням засобів індивідуального захисту.

На терезах зважують 50 г порошку Неохлор. Порошок поміщають в бікси та транспортують на візку на ділянку приготування розчину. Ємність з мішалкою заповнюється водою очищеною об'ємом 10 л та температурою 45 °С. Після закінчення процесу наповнення в ємність, вручну, через люк, завантажують наважку миючого засобу. Перемішують вміст ємності до повного розчинення миючого засобу протягом  $10 \pm 1$  хв. Контроль розчинення проводять візуально.

ДР 1.4.3 Приготування 1 % розчину Деконекс 50 ФФ.

На стадії приготування розчину дезінфікуючого засобу Деконекс 50 ФФ необхідно дотримуватися запобіжних заходів при зважуванні і завантаженні.

Сировина зберігається на складах. В окремому приміщенні знімають первинну упаковку з сировини і на візку транспортують в приміщення формування наважок. Відмірювання роблять у скляних циліндрах в чистому приміщенні, з використанням засобів індивідуального захисту.

В мірний циліндр наливають 100 мл концентрату та транспортують на візку на ділянку приготування розчину. Концентрат заливається в ємність, вручну, через люк, завантажують. Ємність з мішалкою заповнюється водою очищеною до 10 л та температурою 45 °С. Перемішують вміст ємності до повного розчинення миючого засобу протягом  $10 \pm 1$  хв. Контроль розчинення проводять візуально.

ДР 1.5. Підготовка обладнання та комунікацій

Виробниче обладнання не повинне негативно впливати на якість продукції. Частини або поверхні устаткування, що контактують з продукцією, виготовляються з

матеріалів, які не вступають з нею в реакцію, не мають абсорбційних властивостей і не виділяють речовин у такій кількості, щоб це могло вплинути на якість продукції. Ця стадія включає в себе кілька операцій.

#### ДР 1.5.1 Миття та дезінфекція

Миття, яке здійснюється миючими і дезінфікуючими розчинами Біомой та Декосепт 50 ФФ. Біомой - мийний засіб, що містить синтетичні поверхвоактивні речовини та протеолітичні ферменти (лужна фосфатаза). Водні розчини біомою безбарвні, прозорі, виявляють мийні, емульгуючі та диспергуючі властивості, легко видаляють білково-жирову плівку з поверхонь технологічного обладнання, легко змиваються, не залишають нальоту. Деконекс 50 ФФ - дезінфекційний засіб.

В якості активно діючих речовин містить гліоксаль, глютаровий альдегід, дидецилдимети-ламонійхлорид. До складу засобу введені гліколі, суміш ефірних олій і вода.

#### ДР 1.5.2 Ополіскування

Ополіскування проводиться водою очищеною при температурі 20°C.

#### ДР 1.5.3 Перевірка на герметичність

Перевірка на герметичність з'єднань, яку здійснюють під надлишковим тиском 0,15-0,2 МПа. Для герметизації фланців і вентилів використовують особливі прокладки з пароніту, обробленого графітом, для герметизації кришок апаратів використовують шнур з прогумованої тканини діаметром до 19 мм, а для завантажувальних люків – гуму завтовшки 14 мм.

#### ДР 1.5.4 Стерилізація

Стерилізація устаткування здійснюється парою при температурі 125-130 °С і надлишковому тиску 0,2 МПа. Після проведення стерилізації виділяється конденсат. В кінці цієї операції здійснюють мікробіологічний та технічний контроль, щоб перевірити якість стерилізації і справність обладнання.

#### ДР 2. Підготовка стерильного технологічного повітря

У процесі культивування в посівному апараті і ферментері зростаюча культура аерується кондиціонованим стерильним повітрям під надлишковим тиском 0,01-0,03

МПа для задоволення біологічної потреби мікроорганізмів та відведення продуктів їх життєдіяльності.

#### ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря відбувається на висоті 15 м. Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту. В нагнітачах повітря стискається до тиску  $(0,23 \pm 0,01)$  МПа і по повітропроводу надходить в головні фільтри грубого очищення.

#### ДР 2.2. Очищення повітря від пилу та механічних часток

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром 5-10 мкм. В якості фільтруючого матеріалу використовують синтетичне волокно. Головний фільтр це посуд із днищем та кришкою, що знімається. Всередині фільтра розташовані дві решітки, між якими поміщають фільтруючий матеріал.

#### ДР 2.3. Кондиціонування повітря

Кондиціонування повітря проводиться у кондиціонері, що складається з компресора, дроселя, конденсатора і випарника. Для відділення вологи використовується принцип дії сили тяжіння, відцентрових сил, коалесценції і здатності води та масла утворювати плівки на контактуючих з ними поверхнях. Зжате повітря, проходячи через сепаратор, закручується і направляється по стінках. Крапельна волога прилипає до стінок і стікає вниз до конденсатівідвідника. Ступінь вологовідділення 70 %. Осушення повітря відбувається за допомогою компресорного блоку й теплообмінника. У цьому випадку відбувається конденсація водяної пари при охолодженні повітря нижче так званої «точки роси». Конденсат накопичується в дренажному піддоні, а потім відводиться в дренажну систему. Теплова енергія, «витагнута» з вологого повітря у випарнику, повертається до холодного осушеного повітря після проходження ним конденсатора.

#### ДР 2.4. Очищення повітря в фільтрах другого ступеня очищення

Повітря надходить у головний фільтр типу ЛАІК. В якості фільтруючого матеріалу в ньому використовують ультра тонке волокно з перхлорвінілової смоли.

Для приміщень С, D класів чистоти застосовується трьох ступенева система очистки повітря фільтрами типу ЛАЙК:

- фільтрація на I ступені фільтрів - клас фільтр G-4

- фільтрація на II ступені фільтрів - клас фільтр F-9

- фільтрація на III ступені фільтрів - клас фільтр тонкої очистки з ефективністю фільтрації 99,97 %.

#### ДР 2.5. Очищення повітря в фільтрах третього ступеня очищення

Стерилізація повітря здійснюється у фільтрах тонкої очистки типу ЛАЙК та НЕРА. Ці фільтри характеризуються значною різноманітністю конструкцій. Найбільш популярні фільтри патронного типу, в яких у якості фільтрувального матеріалу використовується надтонке волокно з перхлорвінілової смоли. Регенерація здійснюється методами хімічної обробки - обробляють парою формаліну з наступною нейтралізацією парою аміаку.

У кожному ступені очищення передбачені штуцери для відбору проб повітря для визначення концентрації механічних часток до та після фільтру.

Для забезпечення стерильних умов в локальній зоні класу А створюється ламінарний потік повітря з рівномірною швидкістю повітря 0,45 м/с.

#### ДР 2.6 Очищення відпрацьованого повітря

Відпрацьоване повітря за допомогою вентилятора системи рециркуляції повітря (Н-10) направляється на фільтри очистки відпрацьованого повітря.

#### ДР 3 Отримання води очищеної та води ін'єкційної

Воду для фармацевтичних цілей отримують з води питної, джерелом якої служить природна вода, важливим моментом являється звільнення останньої від присутніх в ній домішок.

#### ДР 3.1 Надходження води з міського водоканалу

Для оцінки якості води питної, яка надходить з міського водоканалу, відбирають пробу води для аналізу в місці вводу її на підприємство. Вода питна повинна відповідати вимогам, зазначеним в ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством».

#### ДР 3.2 Отримання води очищеної

### ДР 3.2.1 Очищення води на фільтрах з активним вуглем

Вода за допомогою насоса (Н-15) проходить через вугільний фільтр (Ф-16). Активоване вугілля, яке є основною складовою вугільного фільтру, завдяки високій адсорбційній здатності ефективно поглинає залишковий хлор, розчинені гази, органічні сполуки, завдяки чому поліпшуються органолептичні показники води (усувається сторонній присмак, запах, кольоровість).

### ДР 3.2.2 Пом'якшення води

Для зменшення жорсткості води передбачений іонний обмін, який дозволяє провести демінералізацію води, видаляючи іони кальцію та магнію. Іонообмінний пом'якшувач являє собою пластиковий корпус з керуючим блоком (клапаном) і баком для приготування і зберігання регенеруючого розчину. Жорстка вода, надходячи в фільтр, проходить через шар засипки з високоякісної іонообмінної смоли. При цьому відбувається зміна хімічного складу розчинених солей за рахунок заміни іонів кальцію і магнію на іони натрію, які хімічно пов'язані зі смолою. У момент, коли поглинаюча здатність смоли знижується до певного рівня, блок керування автоматично починає цикл регенерації.

### ДР 3.2.3 Очищення на установці зворотнього осмосу

Пройшовши попередню очистку, вода надходить до установки двоступеневого зворотнього осмосу за допомогою насоса. Попередньо вода надходить в установку першого ступеня зворотного осмосу, де за рахунок насоса нагнітається тиск до 10-12 бар (1-1,2 МПа). Під високим тиском вода продавлюється крізь пори мембран, які пропускають крізь себе лише молекули води, молекули інших сполук осідають на поверхні мембран, звідки змиваються в каналізацію. До мембран надходить вихідна вода, а відводиться два потоки - очищена, яка називається пермеатом, і вода з концентрованими домішками - концентратом, який зливається у каналізацію. Фільтрат (пермеат) надходить в установку другого ступеня зворотного осмосу та ще раз піддається очистці. Концентрат від другого ступеня зворотного осмосу містить менше солі, ніж вода, що надходить до озворотньоосмотичної установки, то його змішують з водою, що надходить і тим самим повертають її в систему. Тиск води перед подачею на мембрани і після її проходження через

мембрани контролюється манометрами. Кількість води, що скидається в каналізацію регулюється вентилем та контролюється ротаметром.

#### ДР 3.2.4 Зберігання води очищеної

Отримана вода очищена зберігається в спеціальній накопичувальній ємності. Накопичувальна ємність та система трубопроводів утворюють циркуляційну петлю, по якій безперервно за рахунок насосу, рухається вода очищена. Вода очищена надходить на санітарну підготовку виробництва, на технологічні потреби та на дільницю отримання води для ін'єкцій, а решта повертається в накопичувальну ємність. Показники якості води очищеної перевіряються відповідно до ФС 42-2619-89.

#### ДР 3.3 Отримання води для ін'єкцій

Вода для ін'єкцій отримується з води очищеної методом багатоклонної дистиляції. Багатоклонний дистилятор складається з декількох колон, що з'єднуються послідовно, виносного конденсатора, охолоджувача дистиляту та баку для води з насосом. Кожна колона складається з двох посудів, які працюють під високим тиском. Конструкція колони та її елементів виконана таким чином, що вона працює як випарювач та сепаратор одночасно.

##### ДР 3.3.1 Нагрівання води

Вода очищена в дистиляційну установку подається з резервуара насосом (Н-22), витрата води регулюється автоматично.

Пара із магістралі цеху надходить у першу колону та теплообмінник.

Вихідна вода і утворена пара в системі рухаються протитоком. При цьому вода, проходячи крізь охолоджувач дистиляту і конденсатори, максимально акумулює вторинне тепло пари. В конденсаторі першої колони вода підігрівається заводською парою до температури 160 °С. Висока температура гарантує високу біологічну якість дистилята.

##### ДР 3.3.2 Утворення пари та відділення часток

Підігріта вихідна вода надходить у верхню частину лівої крайньої колони. Ця колона теж обігрівається заводською парою. За рахуною виникаючої в колоні різниці температур відбувається кипіння перегрітої води з утворенням пари. Колона



розрахована таким чином, що пара яка утворюється досягає її дна з високою швидкістю та змінює напрям свого руху на 180°С при цьому від пари відділяється невиварена вода.

Чиста пара з великою швидкістю підіймається по спіралеподібному жолобу, здійснюючи кругові рухи. Завдяки відцентровим силам, які виникають при такому русі, відділяються часточки та краплини, що залишилися в парі, в тому числі і ендотоксини.

### ДР 3.3.3 Конденсація пари та охолодження дистилляту

Отримана пара надходить в наступну колону, тут конденсується та відводиться в охолоджувач дистилляту. Невипарена вода та відсепаровані частинки також надходять в цю колону на повторне скипання. В цій та наступних колонах процес повторюється аналогічно з першою колоною. Відпрацьована вода виводиться з останньої колони.

### ДР 3.3.4 Зберігання води для ін'єкцій

Отримана вода для ін'єкцій надходить для зберігання в резервуар за допомогою насоса, що знаходиться під тиском з можливістю створення повного вакууму та за температури 80-95 °С. Для контролю якості води для ін'єкцій відбирають проби води з накопичувальної ємності. Показники якості води для ін'єкцій перевіряються відповідно до ФС 42-2620.

## ДР 4. Підготовка та стерилізація середовищ

### ДР 4.1. Підготовка та стерилізація середовища 199

У технологічному процесі для культивування клітин НСХ застосовується середовище 199, що містить в своєму складі амінокислоти, вітаміни, глюкозу, мінеральні солі та інші речовини, необхідні для підтримання життєдіяльності клітин поза організмом. Але для вирощування повноцінних культур клітин до середовища необхідно додавати сыворотку.

Середовище має наступний склад:

<b>Назва речовини</b>	<b>мг/дм<sup>3</sup></b>
L-аргінін	70
L-гістидин	20
L-лізин	70
L-тирозин	40
D-триптофан	20
D-фенілаланін	50
L-цистин	20
D-метіонін	30
D-цистин	50
D-ізолейцин	40
D-треонін	60
D-лейцин	120
D-валін	50
D-глутамінова кислота	150
D-аспарагінова кислота	60
Нікотинова кислота	0,025
D-аланін	50
L-пролін	40
L-гідроксипролін	10
L-цистеїн	0,1
Гліцин	50
Аденін сульфат	10
Гуанін хлоргідрин	0,3

Ксантин	0,3
Гіпоксантин	0,3
Урацил	0,3
Метилурацил	0,3
Тіамін	0,01
Рибофлавін	0,01
Піридоксаль	0,025
Кислота аскорбінова	0,025
Пантотенат кальцію	0,01
D-біотин	0,01
Холін-хлорид	0,5
Інозит	0,005
Параамінобензойна кислота	0,005
Вітамін А	0,1
Вітамін Д <sub>2</sub>	0,1
Вітамін Е	0,001
Вітамін К	0,001
Л-глутатіон	0,005
Твін-80	5
Холестерин	0,2
D-рибоза	0,5
АТФ	10
L-глутамін	100
D-2-дезоксирибоза	0,5

NaCl	6800
KCl	400
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	140
MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	200
CaCl <sub>2</sub> (безводний)	200
NaHCO <sub>3</sub>	2200
D-глюкоза	1000
Феноловий червоний	10
NaOH	За необхідності
HCl	За необхідності
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	За необхідності

#### ДР 4.1.1. Відважування та змішування компонентів поживного середовища 199

На вагах зважують всі компоненти поживного середовища 199. Наважки перерахованих компонентів ретельно перемішують у стерильних умовах до гомогенного стану.

#### ДР 4.1.2. Приготування рідкого поживного середовища 199

Готову суміш середовища 199 розчиняють у деіонізованій воді за температури від 15-20 °С під час постійного помішування, у співвідношенні, зазначеному у таблиці вище. Під час перемішування доводять рН середовища до рівня 0,1-0,2 одиниці нижче ніж необхідне рН (7,0±0,2) тобто до рН від 6,8 до 7,0. Для корегування рН застосовують 1н NaOH або 1н HCl.

#### ДР 4.1.3. Стерилізація поживного середовища 199

Готове поживне середовище 199 стерилізують фільтруванням через стерилізувальні фільтри типу Сарторіус (Sartorius) або Пелл (Pall) із діаметром пор 0,2 мкм. На початку фільтрування відкидають першу порцію фільтрату, яка становить 1-3 % від початкового об'єму. Фільтрат зливають у стерильну скляну ємність.

#### ДР 4.2. Підготовка та стерилізація захисного середовища висушування

Для збереження вихідних властивостей препаратів або високої життєздатності мікроорганізмів в процесі ліофілізації і подальшому зберіганні використовують різні захисні середовища.

Ефективність захисного середовища для висушування залежить не тільки від складу середовища, а й від співвідношення концентрації стабілізаторів.

Найкращим для зберігання сухої маси концентрату вакцини антирабічної виявилось сахарозо-желатинове середовище з додаванням альбуміну.

#### ДР 4.2.1. Приготування розчинів сахарози і желатину

Для приготування сахарозо-желатинового середовища попередньо готують 2 розчини: на водяній бані при температурі +55 °С необхідно розчинити в 300 мл дистильованої води 10 г желатини (1 розчин) і в 300 мл дистильованої води 100 г сахарози (2 розчин)..

#### ДР 4.2.2. Приготування розчину захисного середовища

З'єднують розчини желатину та сахарози, додають 5 г альбуміну, перемішують, доповнюють до 1 л дистильованою водою; встановлюють рН 7,0 розчином бікарбонату натрію і розливають у флакони.

#### ДР 4.2.3. Стерилізація розчину захисного середовища висушування

Флакони з готовим розчином захисного середовища висушування стерилізують текучою парою з тиском 0,1 МПа, температурою 100 °С в автоклаві 3 дні по 1 год.

#### ДР. 5 Трипсинізація клітин нирок сирійського хом'яка.

Всі маніпуляції з культурою клітин проводять біля пальника з дотриманням стерильних умов.

Виконують наступні маніпуляції:

- зливають ростове середовище (РС) з флакона з культурою клітин та обережно ополіскують клітинний моношар фосфатно-сольовим буфером (ФСБ)

- вносять у флакон 0,25 % розчин трипсину (чи рівні частини 0,25 % трипсину та 1:5000 розчину в ФСБ. На флакон з культуральною поверхнею 25 см достатньо 0,5 мл розчину. Його рівномірно розподіляють по шару клітин похитуванням флакону;

- витримують флакон при 36 °С до того часу, доки всі клітини не відокремляться від ростової поверхні (перевіряють під мікроскопом). Рекомендується енергійно постукати кілька раз по стінці флакона;

- ресуспендують клітини в РС (4,5 мл на флакон з ростовою поверхнею 25 см), яка зупиняє дію трипсину. Суспензію всмоктують кілька разів через тонку пастерівську пінетку, щоб роздробити агрегати клітин;

- розводять суспензію клітин РС до потрібної концентрації, базуючись на підрахунку клітин, чи розводять 1:3;

- розсівають отриману клітинну суспензію в культуральні флакони чи пробірки, щільно закривають та розміщують в термостаті при 36 °С;

- коли моношар буде майже сформовано (2-3 дні), замінюють РС на ПС. Культури зазвичай перещеплюють кожні 5-7 днів.

#### Підрахунок клітин

1. Розводять 0,1 мл суспензії клітин в 0,9 мл трипанової синьки (0,1 % розчин в ФСБ); нежиттєздатні клітини фарбуються в синій колір.

2. Після ретельного перемішування пастерівською піпеткою набирають завис клітин та заповнюють камери гемоцитометра.

3. Підраховують кількість клітин в чотирьох кутових великих квадратах в обох сітках камери, не враховуючи клітини, що лежать на лініях.

4. Розраховують середнє число клітин в квадраті за результатами їх підрахунку в 8 кутових квадратах.

5. Розраховують концентрацію клітин в 1 мл за формулою:

$$C1 = m \times tb \times 10^4$$

де С - вихідна концентрація клітин в 1 мл;

m - середнє число клітин в 1 великому квадраті;

tb - коефіцієнт корекції розведення завису трипанової синьки;

10<sup>4</sup> — коефіцієнт перерахунку об'єму до 1 мл.

6. Розраховують фактор розведення (d) для виготовлення потрібної робочої концентрації клітин в 1 мл (C2) за формулою:

$$d = C2/C1$$

7. Робочу концентрацію отримують змішуванням 1 об'єму вихідної суспензії з відповідною кількістю РС.

#### ТП 6. Інокуляція вірусом клітин нирок сирійського хом'яка

Трипсинізований моношар клітини нирок сирійського хом'яка (НСХ) у концентрації  $5 \times 10^6$  кл/мл заражають фіксованим вірусом штаму А/17/Постдам/86/92/ (H3N2) у дозі 0,01-0,001 ЦТД<sub>50</sub>/кл у колбах з середовищем Ігла, з постійним перемішуванням на магнітній мішалці протягом 1-1,5 год у термостаті за температури 37 °С.

#### ТП 7. Культивування вірусу в культурі клітин

До інфікованих клітин НСХ додають середовище наступного складу: 0,5% гідролізат лактальбуміну (ГЛА) та середовище 199, у співвідношенні 1:1; 10% сироватки великої рогатої худоби (ВРХ). Середовище завантажують у скляний реактор місткістю 50 л, в якому знаходяться мікроносії Цитолар 1 або 2. Концентрація мікроносіїв 10 г/л ростової середовища. Культивування проводиться за температури 35 °С з перемішуванням на магнітній мішалці зі швидкістю 15-20 об/хв. Режим перемішування:

Доба	Час роботи, хв	Час зупинки, хв
1 доба	2-5	120
2 доба	2-5	90
3 доба	2-5	60
4 доба і далі (до 9-10)	2-5	30

На 4-5 день за результатами візуального контролю якості моношару на мікроносіях з клітинами НСХ проводиться заміна середовища на нове, що не містить сироватки ВРХ. Заміна проводиться наступним чином. Ростове поживне середовище, що знаходиться у реакторі, зливається у бутиль-приймач (фільтри з діаметром пор 250 мкм), а у реактор подають робочий розчин Ерла. Після осідання мікроносіїв розчин Ерла зливається і подається нова порція розчину Ерла. Процедуру повторюють 3-4 рази. Після закінчення відмивання у реактор подають підтримуюче середовище, що має в своєму складі 0,5 %-й ГЛА і середовище 199 у співвідношенні

1:1. Культивування проводять за схемою описаною вище. На 7-8 день культивування проводиться перший відбір вірусомісної рідини. Після осідання мікроносіїв до реактора підключають трубку для відбору вірусомісної рідини (ВР) і за допомогою вакууму ВР відкачують з реактора. Потім в реактор подають нову порцію підтримуючого середовища і культивують при температурі 35 °С до наступного відбору. Відбори роблять через 1 добу, максимальна кількість відборів з одного біореактора 8. Перед відбором контролюють якість моношару на мікроносіях.

#### ТП 8. Відокремлення вірусу від клітинного дебрису

Відділення вірусу від дебрису клітин проводять методом стерилізуючої фільтрації на фільтрах з розміром пор 1,2; 0,8; 0,45; 0,22 мкм.

#### ТП 9. Очистка і концентрування вірусомісної рідини

Концентрування проводять на ультрафільтраційній установці на мембранах з порогом відсічення 100-300 кДа, при цьому відбувається не тільки концентрація вірусомісного матеріалу, а і його очистка від баластних речовин, включаючи видалення сивороточних компонентів. Ультрафільтрація відбувається при тиску 0,1-1,0 МПа. За таких умов досягається ступінь концентрування вірусомісного матеріалу до 10-20 разів.

#### ТП 10. Хроматографічна очистка вірусомісної рідини

Гельхроматографія полягає у пропусканні суспензії через колонку, заповнену пористим матеріалом. Для заповнення колони застосовується макропористе скло, отримане шляхом двофазного натрієво-боросилікатного скла спочатку кислим, а потім лужним розчином, з діаметром пор близько 100 нм, з питомою поверхнею 10-25 м<sup>2</sup> / г. Далі колону промивають розчином 0,05 М трис буфера з рН 7,0-7,4 до оптичної густини при 280 нм – не більше 0,1. Далі елюють буферною сумішшю, що містить 0,2-0,3 М Трис буфера, 0,5 М натрію хлористого з рН 8,2-8,4. Розмір сорбенту близько 700-800 нм. Ступінь очищення від домішок – 95-99 %

#### ТП 11. Стерилізуюча фільтрація

Отриману вірусомісну рідину піддають стерилізуючій фільтрації через мембрани з діаметром пор 0,22 мкм.

#### ТП 12. Інактивація вірусомісної рідини



Інактивацію вірусвмісної рідини проводять ультрафіолетовими променями, на установці ультрафіолетового знезараження дозою 50-60 кГр із швидкістю 20-21 об/хв, на відстані 18-20 см, у шарі вірусвмісної рідини 1 мм.

#### ТП 13. Отримання готового розчину вакцини

Приготування кінцевого розчину проводиться в реакторі з мішалкою. До вірусвмісної суміші доливають приготований розчин захисного середовища, що складається з сахарози, желатину і альбуміну і перемішують 15-20 хв зі швидкістю 30 об/хв.

#### ТП 14. Отримання ліофілізованої вакцини

Ампулювання розчину здійснюється на комбінованій лінії фірми *Bosch RRU-HQL-ALF Kombi*, на якій проводиться шприцева мийка, сушіння і стерилізація, наповнення та запайка ампул.

##### ТП 14.1 Шприцева мийка ампул

Мийка ампул здійснюється на автоматі для шприцевий миття ампул з ультразвуком. Управління за роботою мийної машини автоматичне. Ампули зі складу з гофрокоробів, вручну, укладають у касети капілярами вгору, вилучаючи при цьому ампули, що мають насічки, відколи, склоподібні включення, забруднення, з видимими відхиленнями від лінійних розмірів і ампули нестійкі на горизонтальній поверхні. Касети встановлюють на пересувний візок і транспортують в приміщення шприцевого миття ампул.

Мийник ампул, перед початком роботи, перевіряє в системі наявність води очищеної, води для ін'єкцій та стисненого повітря. Тиск миючої води має бути не менше 0,2 МПа, тиск стисненого повітря не менше 0,5 МПа.

При автоматичному запуску автомата миюча вода подається в ультразвукову ванну. При досягненні водою нижнього рівня в ультразвуковій ванні автомата, включається водонагрівач. Підігрівачий воду до температури  $75 \pm 5$  °С. В ультразвуковій ванні відбувається постійна циркуляція і фільтрація води.

Включають генератор ультразвукових коливань і приступають до завантаження ампул на мийку. Ампули вручну завантажують на лінію транспортера. Тримачі захоплюють ампули по 16 штук і опускають в ультразвукову ванну з гарячою водою,

де здійснюється так званий 1-й цикл миття - зовнішня і внутрішня мийка ампул. Зовнішня та внутрішня мийка ампул здійснюється рециркуляційною водою одночасно. Ампули, заповнені водою і оброблені ультразвуком надходять далі на двухциклічну шприцеву мийку: водою очищеною, водою для ін'єкцій та продувку фільтрованим стисненим повітрям. Після проходження всіх операцій мийки, ампули вивідним гребінцем встановлюються у вертикальне положення на транспортерну стрічку стерилізуючого тунелю.

#### ТП 14.2 Сушіння і стерилізація ампул

Сушіння і стерилізація ампул здійснюється в стерилізаційній тунелі з ламінарним потоком повітря. Тунель складається з трьох зон: сушіння, стерилізації та охолодження. У всі зони подається стерильне повітря в ламінарному потоці. У зоні сушіння відбувається нагрів ампул до температури стерилізації. Витяг ампул протягом заданого часу  $25 \pm 5$  хв при температурі  $250 \pm 2$  °C відбувається в зоні стерилізації. Охолодження ампул до температури 20-23 °C - в зоні охолодження. Контроль температури здійснюється за допомогою датчиків.

Періодично здійснювати контроль за температурою стерилізації і швидкістю транспортерної стрічки на пульті управління.

#### ТП 14.3. Наповнення ампул

Наповнення ампул здійснюють на автоматі шприцевого наповнення ампул.

Зі стерилізаційного тунелю ампули по конвеєру надходять на тримачі ампул у вузол наповнення по 8 штук.

Розчин зі збірки стерильного розчину надходить на дозатори наповнення ампул.

#### ТП 14.4. Попереднє заморожування та сублімаційна сушка розчину

Висушування розчину здійснюється на сушарці типу Ultra 35 Super XL фірми «VirTis», США, за допомогою якої здійснюється сублімаційна сушка. Температурна межа заморожування продуктів в сушарці становить  $-60$  °C. Площа полиць сушарки -  $0,35$  м<sup>2</sup>. Конструкція камери і конденсатора сушарки відповідають вимогам норм GMP. Камера і конденсатор виготовлені з полірованої нержавіючої сталі.

Завантажувальна частина сушарки розміщується під загальним ламінарним укриттям, яке забезпечує також «чисті» умови класу А над машиною для ампульного

фасування. Розлитий в ампули розчин поміщається в сушарку. Попереднє заморожування розчину здійснюється безпосередньо в сублімаційній камері при  $t$  від  $-40$  до  $-60$  °C. Далі створюється глибокий вакуум та підтримується знижена температура (до  $-40$  °C) з подачею в ампули інертного газу, охолодженого до температури біопрепарату, при різниці тисків на вході і виході потоків  $\Delta P = 0,98-2,94$  Па, що забезпечує скорочення часу сушіння в два рази. У результаті сублімації вільна вода видаляється з поверхні замороженого матеріалу, препарат переходить з твердого (замороженого) стану в сухе (пориста маса, майже не змінена в обсязі). Досушування об'єкта проводять в цій же камері доводячи до температури до  $20$  °C і вище підвищуючи по  $9$  °C за кожну годину. При цьому з препарату видаляється зв'язана вода. Після закінчення ліофілізації вакуумний насос вимикають і в камеру через фільтр подають стерильний сухе повітря або азот. Сушіння препарату протягом 24 год.

#### ТП 14.5. Запайка ампул

Після проведення процесу сублімації ампули повертаються на апарат наповнення і запайки ампул. Ампули проходять послідовно операції: насичення інертним газом (азотом), прогрів стебел ампул і запаювання ампул з сухим матеріалом. Контроль подачі азоту на станції попереднього і фінішного насичення ампул відбувається за допомогою датчика. При відсутності або недостатньому тиску азоту відбувається зупинка ротора.

Запаяні ампули надходять у касети через передавальне вікно. У касети вкладається етикетка із зазначенням на них найменування препарату, номера серії і номер зварювача. У процесі роботи стежать за справністю всіх з'єднань, не допускаючи витіку газу, і чистотою робочого місця. Регулюють приплив газокисневої суміші таким чином, щоб якість запаювання відповідало наступним вимогам: запаяні ампули повинні бути герметичні, кінець капіляра повинен мати сферичну форму без видимих опуклостей, западин, гачків.

#### ТП 15. Перевірка ампул на герметичність

Після наповнення та запайки ампули надходять до автоматичної інспекційної машини. Перевіряється кожна ампула окремо. Контроль герметичності здійснюється

за допомогою впливу на ампули стиснутим повітрям з величиною тиску  $6 \times 10^3$  кПа, і згодом вимірюючи будь мінімальне відхилення від встановленого тиску. Найменша зміна тиску, викликане негерметичність упаковки фіксується завдяки складному програмному забезпеченню, яке розроблено на основі геометрично незмінної стрижневої системи диспетчерського контролю збору даних системи SCADA.

### ПМВ 16. Маркування, упаковка, відвантаження готового продукту

#### ПМВ 16.1 Маркування та упаковка ампул в блістера та пачки.

Маркування та упаковка ампул в блістера проводиться на автоматичній лінії «FARMO RES».

Маркування ампул виробляється шляхом наклеювання етикетки на ампули на машині для маркування ампул, що складається з аплікатора, фотореєструючі локаційний інфрачервоного пристрої, пристрої для аплікації етикеток на ампули набійки різної довжини, друкувального пристрою. На етикетці з паперу з клейким покритті фарбою виробництва фірми «SICPA» друкарським способом нанесені назва препарату українською або українською та іншими мовами, доза препарату в ампулі. Номер серії на етикетку наносять друкуючим пристроєм маркування. Введення друкованої надписи з клавіатурними-дисплейного пристрою. Рулон самоклеючих етикеток з нанесеною на них серією, встановлюють на подаючий пристрій аплікатора.

Промарковані ампули укладаються в касету. Касети з ампулами вручну встановлюють у завантажувальний пристрій автоматичної лінії "FARMO RES", що складається з послідовно з'єднаних автоматів:

- формування блістерів, укладання ампул і скарифікаторів у кожен блістер;
- упаковка блістерів та інструкцій щодо застосування препарату в пачку;
- упаковка пачок у гофрокоробки.

Формування блістерів на автоматі здійснюється в автоматичному режимі шляхом попереднього прогріву полістирольного листа при температурі 150-170 °C і тиску стисненого повітря від 6 до 8 кПа.

#### ПМВ 16.3 Упаковка препарату в групову тару

Упаковка пачок з ампулами в гофрокоробки здійснюється на автоматі по 20 або 40 штук або вручну по 90 коробок на столі для пакування в групову тару. У групову тару вкладають поопераційний лист та інструкції із застосування, у кількості відповідного кількості коробок. На груповій етикетці, вручну, штампом маркують номер серії, термін придатності препарату і номер пакувальника. Гофрокоробки з продукцією укладають на візок пересувну і транспортують в приміщення карантинного зберігання продукції. Упакована продукція зберігається в захищеному від світла місці при температурі від +2 до +8 °С до отримання дозволу ВКЯ на реалізацію продукції. Від упакованої продукції контрольний майстер ВКЯ відбирає середню пробу на аналіз.

#### ЗВ 17. Знешкодження відходів

Знешкодження відходів відбувається при проведенні допоміжних робіт, миючі та дезінфікуючі засоби використовують тільки одноразово, далі відпрацьований розчин зливають до каналізації.

#### ЗВ 17.1 Знешкодження твердих відходів

У процесі виробництва залишки пакувальних матеріалів, склобій направляються на підприємства по переробці вторинної сировини.

#### ЗВ 17.2 Знешкодження рідких відходів

На стадіях культивування, очистки, концентрації, інактивування утворюється велика кількість відпрацьованих розчинів, що можливо містять вірус. Тому їх необхідно зливати в окремі ємності, з наступною їх інактивацією дезінфікуючими розчинами, та іншими методами обеззараження і тільки після цього зливати до каналізації.

Переробці підлягають некондиційні ампули зі стадії наповнення, сушки і запайки. Ампули розкривають вручну, обламуючи капіляри ампул. Потім розчин з ампул витягують за допомогою вакууму, а ліофілізат видаляють струшуючи в ємність. Далі в неї подають дезінфікуючий розчин і відправляють на знешкодження.

## **Висновки**

1. Представлена в роботі вакцина Грипол, порівняно спліт-вакцинами, має низьку реактогенність, цілком безпечна, викликає високий імунологічний відповідь до 3-х штамів вірусів грипу і забезпечує захист від грипу більше 70 % щеплених, при цьому відзначено зниження захворюваності ГРВІ та інших інфекцій верхніх дихальних шляхів серед щеплених цією вакциною.

2. Полімер-суб'єдинична вакцина Грипол має меншу шкідливість та в наслідок очищення від домішок невірйонного походження кон'югат-поверхневих протективних білків гемаглютиніну і нейрамінідази трьох вірусів грипу підтипів.

3. До складу вакцини входить високомолекулярний носій – імуностимулятор та імуномодулятор поліоксидоній, що дає змогу підсилити дію вакцини та імунну відповідь організму.

4. В роботі наведено технологію одержання вакцини Грипол, яка передбачає виробництво вакцини згідно Належної виробничої практики. До основних етапів виробництва вакцини можна віднести культивування вірусу в культурі клітин, його виділення, очищення та інактивацію. Готовий лікарський препарат являє собою ліофілізований порошок у ампулах.

## Список використаної літератури

1. А.А. Селиванов, Ю.Н. Мельник, В.Д. Раневский.// Сборник: Вирусные инфекции на пороге XXI века: эпидемиология и профилактика. - С-Петербург. - 1999. - стр. 106-107.
2. Александрова Г.И., Киселева И.В., Науменко З.С. Критерии (маркеры) отбора аттенуированных штаммов для живой вакцины против гриппа.// Журн.: Вирусные инфекции на пороге XXI века: эпидемиология и профилактика. С-Петербург. - 1999 - стр. 205-206.
3. Александрова Г.И., Руденко Л.Г., Григорьева Е.П. и др. Живая гриппозная холодоадаптированная реассортантная вакцина: безвредность, реактогенность, иммуногенная активность и профилактическая эффективность. // В журн.: Вирусные инфекции на пороге XXI века: эпидемиология и профилактика. - С-Петербург. - 1999 - стр. 202-205.
4. Бурханов С.А., Мажуль Л.А., Торчилин В.П. и др. Протективное действие включенных в липосомы поверхностных антигенов вируса гриппа при различных способах иммунизации. // Вопр. вирусол. 1988 - N2 - стр. 151-153.
5. Васильева Р.И., Меркурева Л.А., Дорошенко Е.М. и др. Динамика показателей гуморального иммунитета и профилактическая эффективность инактивированных гриппозных вакцин. // ЖМЭИ. - 1988 -N11.- стр. 65-68.
6. Васильева Р.И., Меркурьева Л.А., Дорошенко Е.М. и др.// Журн. микробиол,- 1989 - N 4 -стр. 105-106.
7. Вичугина Н.А., Горюнова В.В., Жебрун А.Б., Чубарова Н.И. Лабораторный контроль чистоты хроматографической гриппозной вакцины.// В кн.: Этиология и специфическая профилактика гриппа. Л,- 1979 г. - стр. 121-128.
8. Ерофеева М.К., Максакова В.Л., Оберлайдер Л.Н., Литвинова О.М., Зибина Э.А. Опыт вакцинопрофилактики гриппа ИГВ среди лиц высокого риска инфицирования. // Журн.: Вирусные инфекции на пороге XXI века: эпидемиология и профилактика. С-Петербург. - 1999 - стр. 201-202.
9. Ерофеева М.К., Максакова Л.В., Васильева Р.И., Либерман Е.Б., Крайнова Т.Н. Совершенствование тактики вакцинопрофилактики гриппа. // Журн.: Вирусные

инфекции на пороге XXI века: эпидемиология и профилактика. С-Петербург.- 1999 стр. 200-201.

10. Иванова В.Т., Оскерко Т.А., Власова Т.Н., Слепушкин А.Н. Особенности антигенного дрейфа полипептидов вирусов гриппа, изолированных в России в 1985-95 гг.// Актуальные вопросы современной вирусологии. - Екатеринбург,- 1995 - стр. 98-104.
11. Иванова В.Т., Оскерко Т.А., Говоркова Е.А. и др. Эволюция вирусов гриппа в России (1989-1995 гг.)// Вестн.Рос.Акад.с.-х. наук - 1995 - N 3 - стр. 53-55.
12. Иванова В.Т., Яхно М.А., Оскерко Т.А. и др. Характеристика эпидемических штаммов вирусов гриппа, вызвавших эпидемию в 1990-91 гг. в СССР// Вопр. вирусол.- 1993 - N 2 - стр.83-85.
13. Карпухин Г.И., Попова Т.Л., Карпова Л.С. и др. Значение иммуногенетических факторов в эпидемическом процессе при гриппе и ОРЗ.// В кн.: Этиология и эпидемический процесс при гриппе в современных условиях. Л,- 1985 г.- стр.139-145.
14. Кильбурн Э.Д. Перспективы развития генетики вируса гриппа.//В кн.: Генетика вируса гриппа. М,- 1986 г.-стр. 11-30.
15. Кильбурн Э.Д. Эпидемиология гриппа.// В кн.: Вирусы гриппа и грипп. М,- 1987 г.- стр.526-577.
16. Кузнецов О.К., Мигунов А.И., Исполатова А.В., Ерофеева М.К., Гашинская О.В. Пути совершенствования и создания мукозальных ИГВ с расширенным спектром антигенной активности и свойствами экстренной защиты. //В журн.: Вирусные инфекции на пороге XXI века : эпидемиология и профилактика. С-Петербург. - 1999 - стр. 198-199.
17. Львов Д.К. Экология вирусов.// Вестн. АМН СССР, 1983 г. - N 12 - стр. 76-81.
18. Львов Д.К., Слепушкин А.Н., Беляев А.Л. Эпидемическая ситуация по гриппу в IV квартале 1995 г.// Здоровье населения и среда обитания. - М.,- 1996 - Вып. 1 - стр. 3-6.
- 19.Макарова О.П., Смирнов С.В., Кудрявцев А.А., Казаков В.П. Изучение роста клеток на разных типах микроносителей в системе "Пульсатор".//



- Культивирование клеток животных и человека: III всесоюзное совещание г. Пущине. М., 1990, с. 161.
20. Малафеева Л.К., Фридман Э.А., Железнова Н.В., Ползик Т.П. и др. Изучение иммуногенности гриппозной вакцины, очищенной и концентрированной методом хроматографии на силикатных сорбентах. // Сб. Убитая гриппозная вакцина. Труды института им. Пастера. Л., - 1986 г. - том 47 - стр. 124-128.
21. Медведева Т.Е., Романова Ю.Р., Гущина М.И. и др. TS - фенотип реизолятов, привитых живой холодоадаптированной гриппозной вакциной типа А. // Вопр. вирусол. - 1990 - N 2 -стр. 101-102.
22. Пат. 220650 ЕПВ. МКИ С 12 М 3/00. Камера для культивирования и исследования клеток или тканей / В.С.Акатов, В.П. Лавровская, Э. И.Лежнев, и др.- Оpubл.23.08.91. Бюл. No 31.
23. Пат.4377639 США МКИ С 12 М 3/04. Аппарат для выращивания клеточных тканевых культур / Е.А. Бобровник, В.П. Мельник. - Оpubл. 15.03.90, бюл. No 10.
24. Перадзе Т.В. Живые гриппозные вакцины.// В кн.: Противогриппозные профилактические препараты. М, - 1986 г. - стр. 79-99.
25. Петров Р.В., Жданов В.М., Кабанов В.А. и др. Использование конъюгатов белков с синтетическими полимерами в качестве вакцинирующих комплексов для защиты от гриппозной инфекции.// Иммунол., 1984 г. - N 4 - стр. 50-52.
26. Пол Д. Культуры клеток и ткани. - М.: Медгиз. 1963. - 347 с.
27. Разработка и применение пульсационной аппаратуры. / Под ред. С.М. Карпачовой. - М.: Атомиздат. - 1974. - 254 с.
28. Рамм В.М. Абсорбция газов. - М: Химия, Изд. 2-е. 1976. - 507С.
29. Розаева Н.П., Бичурина М.А., Фридман Э.А.// Экспериментальное изучение эффективности инактивированной хроматографической гриппозной вакцины из дикого и рекомбинантного штаммов вирусов гриппа. - Вопр. вирусол.- 1989 - N 7. - стр. 738-742.
30. Романова Ю.Р. Принципы конструирования дивакцины из холодоадаптированных рекомбинантов вируса гриппа А. // Канд.дисс. - JL, - 1989.

31. Руденко Л.Г., Шварцман А.В., Исполатова Е.П., Григорьева и др. Основные характеристики живой гриппозной вакцины для детей из штаммов вируса гриппа А(Н1N1), А(Н3N2) при раздельном и совместном их применении. // Вопр. вирусол. - 1989г.-N 1 - стр. 29-34.
32. Тарасов В.Н. Культуры клеток в вирусологии // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Вирусология. - 1990. - N19. - С. 256.
33. Тартаковский А.Д. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих. - Сборник научных трудов. Ленинград "Наука" 1988. С. 44 - 63.
34. Туркова Я. Афинная хроматография. – М.:Мир, 1980. – 471 с.
35. Фаустов В.С., Коровник В.И., Попов В.Г., Быстров В.М. Методы и аппаратура для культивирования клеток.// Обзорная информация ВНИИСЭНИИ, М., 1986. - 52 с.
36. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. - М.: Мир, - 1980 - 582с.
37. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы.- М.: Мир. 1989.- 333 с.
38. Шварцман Я.С., Цыбульская Н.В., Исполатова А.В. Особенности противогриппозного иммунитета и перспективы совершенствования специфической профилактики гриппа. - //Успехи совр. биол. - 1992 - N 6 - стр.446-460.
39. Э. Де Клерк, Перспективы лечения вирусного гепатита В \\ Перевод с International Journal of Antimicrobial Agents.- 1999.-12/2. С.81-97.
40. Akgun A., Maier B., Preis D., Roth B. et al. A novel parallel shaken bioreactor system for continuous operation. // Biotechnol Prog. – 2004 – Vol.20 – p.1718-1724.
41. Birch J.R., Arathoon R. Suspension culture of mammalian cells. // Bioprocess Technol. – 1990 – Vol.10 – p.251-270.
42. Broadwell E., Breidenthal R.E. A simple model reaction mixing and chemical reaction in a turbulent shear layer. - J. Fluid Mechan. 1982, 125, p. 397-410. Biotechnol.Lab. 1989. 7, N2. p.46.
43. Brownloe G.G. Antigenicity in variable and conserved proteins of influenza virus./ Options Contr. Influenza Proc.Viratek - Ucla Symp.Keystone,Colo,Apr.20-25, - 1985. //New-York - 1986 -p.39-51.

44. Burtéau C.C., Verhoeve F.R., Mols J.F. et al. Schneider Y.J. Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon-gamma-producing CHO cell line. // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 2003 – Vol.39 – p.291-296.
45. Cantell K., Hirvonen S. Preparation of human leukocyte interferon for clinical use. // *Tex. Rep. Biol. Med.* – Vol.35 – p.138-144.
46. Doyle A., Griffiths J. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology.* - John Willey & Sons, 1998. - 332 p.
47. Editorial Prevention and control of influenza. Recommendations of the immunizations practices advisory committee (ACIP) // *MMWR* - 1992- v.41 -p.1-17.
48. Fedson D.S., Hannoun C., Leese J., Hampson A.W., et al. // *Vaccine*- 1995 - v. 13,7 - p.623-627.
49. Fedson D.S., Wajda A., Nikol J.P., Hammond G.W., Kaiser D.L., Roos L.L. Clinical effectiveness of influenza vaccination in Manitoba.// *JAMA*.- 1993 -v.270 -p.1956-1961.
50. Hu W.S., Aunins J.G. Large-scale mammalian cell culture.// *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1997 – Vol.8 – p.148-153.
51. Hu W.S., Oberg M.G. Monitoring and control of animal cell bioreactors: biochemical engineering considerations. // *Bioprocess Technol.* – 1990 – Vol.10 – p.451-481.
52. Immunogenicity and safety of influenza vaccination in 3-to 6-year-old children with a two dose immunization schedule *Eur. J. Pediatr.*- 1996 -v.55 (4) -p.346-347.
53. In: Hannoun C., ed. *Options for the control of influenza II*, Elsevier Science Publisher. - 1993 -p. 47-68.
54. *Influenza*. // *Ibid.* - 1997 - v.72 - N 1/2 - p.5-6.
55. *Influenza/ Wkly Epidemiol. Rec.* - 1995 - Vol. 70 - N 17. - p. 122-123, *Influenza* // *Ibid.* -N23-p. 167.
56. Ivanova V.T., Cameron R., Hemphill M. et al. The evolution of influenza A and B viruses in Russia in 1989-1994. // *Immunobiology of Viral Infection: Proceedings of the 3-rd Congress of the European Society for Veterinary Virology.* - Interlaken.- 1994 - p.538-541.

57. Khan M.W., Gallagher M., Bucher D. et al. Detection of influenza virus neuraminidase- specific antibodies by an Enzyme-linked immunosorbent assay. //J.Clin.Microbiol. - 1992 - Vol.16.-p. 115-120.
58. Levy E. A cost benefit study of flu vaccination of 25-to 64 year old French people.
59. Melling I./ World Biotech. Rept. - 1996 - Vol.1 - p. 239-246.
60. MMWR. Prevention and control of influenza. - 1996 - v. 45 - NRR5 - p. 1-24.
61. Muller O.H., Shapira M., Arnon R. Antiinfluenza response achieved by immunisation with a synthetic conjugate.// Proc nat. Acad. Sci - 1982 - v. 79 - p. 569-573.
62. Nicholson K.G., Snacker R. and Palache A.M. Vaccine - 1995 - v.13,4 -p.365-369.
63. Options for the Control of Influenza III, Abstracts of conference. Cairns, North Queensland, Australia, 4-9 May 1996 -p.50-53.
64. Palache A.M. Influenza subunit vaccine ten years experience. //The European Journal of Clinical Research. - 1992 - v.3 -p. 117-138.
65. Potter C.W. Vaccination of infants and children. Conclusion and recommendations. (Eds Hannoun C., Kendal A.P., Klenk H.D. and Ruben F.L. Options for the Control of Influenza II) Elsevier, Amsterdam - 1993 - p.449-450.
66. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in 1997-1998 season.// Ibid.- 1997 - v.72 - N9 -p.57-61.
67. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in 1996-1997 season // Wkly Epidemiol. Rec. - 1996 - Vol. 71 - N 8. - p. 57-61.
68. Rudenko L.G., Slepushkin A.N., Monto A.S. et al.//J. Infect. Dis. - 1993 - v.168 - p. 881-887.
69. Side Effects Associated With Influenza Vaccination in Healthy Working Adults./ Kristin L., Nichol D., Karen L. //Arch Intern Med. - 1996 -v. 156 -p.1546-1550.
70. Slepushkin A.N., Obrosova-Serova N.P., Burtseva E.I. et al. Comparison of live attenuated and inactivated influenza vaccines in children Russia. //Vaccine -v.II.- 1993 - P.323-328.
71. Studies on the helical nucleocapsid of influenza virus./Reggeness M.H., Smith R.R., Ulmanen J., Krug R.M. et al.// Virol- 1992 - v.1 18 -p.466-470.

72. Tannock G.A. Prospects of a living attenuated vaccine against influenza.// Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci - 1989 - v.58-115 -p.429-439.
73. The Efficacy of Influenza Vaccine in Elderly Persons. A Meta-analysis and Review of the Literature.- 1995 -p.1788-1797.
74. Townsend A.R., Rothbard I., Cotch R. et al./ The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. // Cell. -1996 - Vol. 44 - p. 959-968.
75. Update: Influenza Activity - United States and Worldwide - 1996-1997 season // Ibid. N 15. -p. 325-330.
76. Update: Influenza activity - worldwide 1996// Morbid. Mortal. Wkly Rep. - 1996 - Vol. 45 - N38-p. 816-819.
77. World Health Organization Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 1995 - 1996 season.// Weekly Epidem. Rec.- 1995 - v.70 -p.53-60.