

**А.В.Комиссаров, Ю.А.Алешина, О.В.Громова, А.К.Никифоров, С.А.Еремин, О.А.Волох,
О.А.Лобовикова, А.И.Перепелица**

ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ И ОЧИСТКИ АНТИГЕНОВ

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,
Российская Федерация*

Представлен обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный вопросам использования ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов. Рассмотрено применение различных методов ультрафильтрации. Установлено, что одним из перспективных является фильтрация в тангенциальном режиме на установках с плоскорамными фильтрующими элементами. Показано влияние таких технологических параметров данного процесса, как степень концентрирования, давление, температура, номинальная отсечка по молекулярной массе ультрафильтрационных мембран на качество целевых продуктов, время проведения и уменьшение (увеличение) потерь препаратов. Проведенный анализ данных литературы позволяет выбрать способ проведения процесса концентрирования и очистки протективных антигенов бактериальной и вирусной природы и учесть влияние описанных в обзоре параметров при разработке технологии производства диагностических и профилактических медицинских иммунобиологических препаратов.

Ключевые слова: ультрафильтрация, антигены, концентрирование, очистка.

**A.V.Komissarov, Yu.A.Aleshina, O.V.Gromova, A.K.Nikiforov, S.A.Eremin, O.A.Volokh, O.A.Lobovikova,
A.I.Perepelitsa**

Deployment of Ultrafiltration for Concentrating and Purification of Antigens

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Represented is domestic and foreign literature review dedicated to usage of ultrafiltration for concentrating and purification of antigens. Discussed are the issues of deployment of various ultrafiltration techniques. It is determined that filtering in the tangential mode by means of modules with flat-frame filtering elements is among the prospective ones. Demonstrated is the impact of such technological specifications as concentration rate, pressure, temperature, and membrane nominal cut-off on molecular mass on the quality of target products, the time elapsed, and preparation losses decrease (increase). Literature data analysis proves to be useful for the selection of the proper procedure for concentrating and purification of protective antigens of bacterial and viral origins. In addition, it allows for taking into account the parameters under discussion when developing specific manufacturing technologies for diagnostic and preventive medical immunobiological preparation production.

Key words: ultrafiltration, antigens, concentrating, purification.

Ультрафильтрация – это процесс мембранного разделения, при котором из раствора отделяются молекулы и частицы размером от 10 до 200 ангстрем. Молекулярная масса таких частиц лежит в пределах от 1000 до 1000000 дальтон. В результате ультрафильтрации увеличивается концентрация макромолекул в растворе после частичного удаления растворителя [2, 5, 27].

При традиционной статической фильтрации под давлением среда протекает перпендикулярно поверхности мембраны со стороны подачи исходного потока. Направления подачи среды и фильтрации совпадают. Частицы задерживаются на поверхности мембраны и образуют на ней слой, что приводит к снижению скорости потока и разделения частиц. При тангенциальной ультрафильтрации направления подачи среды и фильтрации не совпадают: они перпендикулярны друг другу. В результате часть фильтруемой среды проходит через мембраны как фильтрат, а основная часть потока выходит из системы в рабочую емкость, а затем вновь поступает в фильтрующий контур. При таком режиме имеет место самоочищение фильтрационного модуля, что значительно увеличивает продолжительность его эксплуатации [4].

В настоящее время можно выделить несколько

типов фильтрующих элементов для систем тангенциальной фильтрации: плоскорамный (кассетный), рулонный, трубчатый, полволоконный, керамический [4, 31]. Большое разнообразие высокоэффективных фильтрующих элементов предполагает соответствующее разнообразие конструктивных решений в виде фильтрационных установок. В биофармацевтической промышленности широкое распространение получили установки с плоскорамными фильтрующими элементами. В частности, они используются для получения растворов альбумина и иммуноглобулина более чем на 20 станциях переливания крови; при получении иммунопрепаратов в ФГУП «НПО «Микроген»; в производстве бифидумбактерина (ЗАО «Партнер») и интерферона (ЗАО «Биокад»); в технологиях приготовления вакцин и сывороток для животных на Армавирской, Ставропольской, Щелковской биотехнологических фабриках и Федеральном центре токсикологической и радиационной безопасности ГУ «ФЦТРБВНИВИ» и многих других. Такие фильтрационные установки имеют минимальный «мертвый» объем системы. Это связано также и с тем, что многие жидкие препараты имеют достаточно высокую цену, такие как, например, альбумин, иммуноглобулин, некоторые вакцины и сыворотки. Преимуществом плоскорамных филь-

традиционных элементов является возможность их линейного масштабирования: отработав технологию на лабораторной установке, полученные данные можно использовать для расчета пилотной и промышленной установок [4].

Ультрафильтрация достаточно широко применяется для очистки и концентрирования целевых препаратов. Так вакцина для защиты животных против клостридиальных заболеваний, вызванных *Clostridia perfringens*, содержит в качестве одного из компонентов *C. perfringens* типа С, концентрированный путем ультрафильтрации [11]. Согласно способу изготовления вакцины для профилактики и лечения некробактериоза животных, концентрирование экзотоксина осуществляют ультрафильтрацией на полых волокнах с номинальной отсечкой по молекулярной массе (НОММ) 1,5 кДа до содержания белка 5,5–6,0 мг/мл. Получают экзотоксин *Fusobacterium necrophorum* с молекулярной массой 18000–20000 Да [17]. Имеются сведения о наборе для иммунизации и способе его получения, согласно которому используемые антигены вируса гепатита А, а также дифтерийный и столбнячный анатоксины очищают и концентрируют ультрафильтрацией [3].

При изготовлении вакцины гриппозной хроматографической инактивированной жидкой ультрафильтрация используется на этапе концентрирования вирусосодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ), при этом мембранная поверхность собирается из расчета 1 м² на 100 дм³ ВАЖ. Степень концентрирования определяют, исходя из гемагглютинирующей активности ВАЖ. Время концентрирования составляет 6–7 ч (<http://e-vaccine.ru/articles/46.html>, 10.08.2012).

Описано применение тангенциальной ультрафильтрации с динамическим режимом концентрирования в производстве препарата «Вакцина гриппа культуральная очищенная концентрированная сухая» («ГРИПП – А/В-ВАК») для получения концентрата вирусосодержащей культуральной жидкости. Линейная скорость подачи вирусосодержащей культуральной жидкости 1,0–1,5 дм³/мин. Давление на входе не должно превышать давление на выходе более, чем на 0,5 кгс/см² (<http://e-vaccine.ru/articles/46.html>, 10.08.2012).

Концентрирование и очистка антигенов ультрафильтрацией применяется в технологиях производства вакцины против бешенства инактивированной сухой концентрированной (http://www.vidal.ru/poisk_preparatov/lact_534.htm, 11.06.2011) и вакцины «Хаврикс», предназначенной для активной иммунопрофилактики гепатита А (<http://pharmabook.net/immunotropnye-sredstva/vakciny-syvorotki-fagi/havriks>, 10.03.2011).

В технологии производства вакцины клещевого энцефалита Энцевир, разработанной в «НПО «Вирион» (Томск) одним из этапов является концентрирование нативного антигена ультрафильтрацией в тангенциальном потоке. При этом авторы подчеркивают, что выбранные технологические приемы получения протективного антигена, его выделения и очистки позволяют проводить процесс стандартно и

достаточно экономично [16, 37].

Описана технология получения комбинированной бивалентной, культуральной, инактивированной, концентрированной, очищенной вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом, согласно которой инактивированный объединенный сбор (антигенсодержащая культуральная жидкость инактивированного вируса геморрагической лихорадки) подвергают концентрированию путем ультрафильтрации в тангенциальном потоке, используя систему с пределом отсечения 100 кДа и площадью фильтрации от 0,1 до 0,5 м². Процесс ультрафильтрации ведут до уменьшения первоначального объема антигенсодержащей культуральной жидкости в 70–100 раз [30].

Технология получения протективного антигена сибирезвездного микроба предусматривает концентрирование ультрафильтрацией культуральной жидкости, освобожденной от клеток микрофильтрацией [32]. Одной из стадий процесса получения поливалентной вакцины против лептоспироза животных является концентрирование ультрафильтрацией на полых волокнах в 20–30 раз инактивированных формалином культур микроорганизмов [26].

В изготовлении поликомпонентной вакцины для иммунопрофилактики и иммунотерапии заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, содержащей смесь антигенов, выделенных из штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* на этапах концентрирования и очистки антигенов применяется ультрафильтрация и диафильтрация. При этом подчеркивается, что введение в процесс получения антигена мембранных методов разделения упрощает технологию производства препарата, снижает энерго- и трудозатраты, и обеспечивает высокое качество (высокую степень чистоты) целевых продуктов за счет эффективного освобождения от балластных примесей питательной среды и низкомолекулярных бактериальных компонентов, не обладающих иммуногенной активностью [13].

В диссертации Т.А.Скотниковой, посвященной отработке технологии получения вакцин против ньюкаслской болезни, было показано, что более технологичным методом концентрирования антигенов является ультрафильтрация с применением мембран с НОММ 15 кДа, характеризующаяся низкими энергоемкостью и эксплуатационными затратами. Его применение позволяет работать с большими объемами вирусного материала, сохранить структуру биологически активного вещества, обеспечить герметичность и асептические условия процесса. Очистка и концентрирование проводились практически в одну стадию. Установлены следующие параметры концентрирования вируса: рабочее давление – 0,8–1,2 кгс/см², линейная скорость потока жидкости – 0,1–0,8 м/с.

На Курской биофабрике с применением мембранных методов концентрирования и очистки разработана промышленная технология производства туберкулина, очищенного для млекопитающих, представляющего собой обогащенную белками фракцию культуральной

жидкости (КЖ) микобактерий. Предложенные технологические решения: очистка КЖ проточной микрофильтрацией «кросс-флоу» с использованием микрофильтрационных мембран с размером пор 0,1 мкм; концентрирование очищенной КЖ (фильтрата) на ультрафильтрационных модулях с мембранами НОММ 3 кДа; обессоливание концентрата методом диафильтрации с использованием ультрафильтрационных мембран с НОММ 3 кДа; ультрафильтрационное фракционирование концентрата белка на мембранах с НОММ 300 кДа позволили повысить выход продукта и специфичность препарата [19, 33, 34].

В литературе имеются сведения о концентрировании ультрафильтрацией фиксированного вируса бешенства. Так, для получения гетерологичной антирабической сыворотки в качестве антигена используют вирус бешенства штамма Внуково-32, полученный на культуре перевиваемых клеток Vero и/или на первичной культуре клеток ПСХ и концентрированный ультрафильтрацией [25]. Однако авторами не раскрыт ни способ концентрирования ультрафильтрацией, ни НОММ используемых устройств. Показано использование метода тангенциальной фильтрации для концентрирования фиксированного вируса бешенства при приготовлении вакцины от бешенства на основе вируса, выращенного на культуре клеток Vero в бессывороточной среде [39], с использованием мембраны с НОММ 10 кДа, что, на наш взгляд, не является эффективным за счет увеличения времени технологического процесса.

В РосНИПЧИ «Микроб» впервые при концентрировании инактивированной суспензии культурального фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» с применением метода тангенциальной ультрафильтрации определен оптимальный вариант кассетного модуля, обеспечивающий минимальные потери вируса и высокую степень чистоты суспензии. Установлено, что наиболее целесообразно использовать мембраны с НОММ 300 кДа и проводить технологический процесс при давлении равном 2,4–2,6 кгс/см². Полученные данным способом концентраты представляли собой культуральный рабический антиген – инактивированную концентрированную суспензию фиксированного вируса бешенства «Москва 3253», пригодную для получения антирабической сыворотки от животных-продуцентов [8].

Исследователями ГОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» показана целесообразность и отработаны методические аспекты выделения низкомолекулярных метаболитов в ходе концентрирования бактериальной взвеси лактобактерий штамма *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 ультрафильтрацией. Данный технологический процесс являлся безотходным и позволял получать два самостоятельных полуфабриката: бесклеточный ультрафильтрат и концентрат бактериальной взвеси производственного штамма [23].

И.В.Нынь [24] в ходе разработки технологии получения генно-инженерной вакцины против гепатита В на основе рекомбинантного антигена этого вируса (rHBsAg) с использованием в качестве продук-

цента специального штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показал использование ультрафильтрации в технологическом процессе. Им выявлено, что после концентрирования на мембране предельная молекулярная масса пропускаемой фракции антигена составляла 100 кДа и содержала компоненты с массой 23 и 46 кДа. Эти компоненты были идентифицированы как белковые составляющие rHBsAg.

Другими исследователями [6, 7] с использованием методов ультра-, микрофильтрации и высаливания сульфатом аммония был получен препарат Б-антигена из культуральной жидкости псевдотуберкулезного микроба. При этом ультрафильтрация применяется при концентрировании культуральной жидкости отделенной от клеток центрифугированием с использованием мембран с НОММ 10 кДа.

Имеются сведения о способе выделения экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* с применением фильтрационных технологий. Полученную после культивирования токсинсодержащую культуральную жидкость осветляют методом микрофильтрации на плоскокамерных разделительных аппаратах, заправленных микропористыми капроновыми мембранами с диаметром пор 0,2 мкм. Осветленную токсинсодержащую жидкость концентрируют на полых волокнах с порогом пропускания 15 кДа, при этом рабочее давление не должно превышать 0,2 МПа, полученный пермеат отбрасывают, а концентрат подвергают диафильтрации на этих же волокнах. Степень очистки экзотоксина от балластных примесей питательной среды составляет 99,9 %, а выход целевого продукта – 84,2 % от исходного [22].

Описан способ получения протективной белоксодержащей фракции бактерий, согласно которому концентрирование антигенов секретлируемых *K. pneumoniae* K2 и *Streptococcus pneumoniae* типа 3 осуществляют методом ультрафильтрации с порогом отсека белка 30 кДа и колоночной хроматографии с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75 [18].

С целью концентрирования и очистки протективного внеклеточного антигена бруцелл используют метод ультрафильтрации культуральной среды через фильтры с размером пор 30 кДа [15].

В научно-производственном объединении «Вектор» разработан способ получения концентратов вирусов, вызывающих геморрагические лихорадки [1]. Одной из особенностей данного способа является концентрирование и очистка антигенов посредством ультрафильтрации на мембранах с размерами пор 80–100 нм. При этом авторы обосновали ряд технологических параметров. Процесс ультрафильтрации проводили при разности давления на входе и выходе из ультрафильтрационного модуля не более 0,5 кгс/см². Давление на входе в ультрафильтрационный модуль составляло 3,5 кгс/см², а на выходе 3,0 кгс/см². Концентрирование осуществляли до уменьшения объема исходного продукта в 20 раз. Обоснованные режимы позволили сократить потери препаратов и уменьшить время проведения процесса фильтрации. Исследования показали, что предлагаемый способ может быть применен для получения

препаратов, обладающих протективной активностью в отношении вирусов Марбург, Мачупо и Эбола.

При получении протективного комплекса *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ его концентрирование осуществляли ультрафильтрацией на волоконном аппарате марки УВА-ПС-17-1040 (предел исключения 17 кДа). Скорость фильтрации составила 240 мл/мин при давлении 1,0 кгс/см². Использование данного метода позволило за короткое время получать 10-кратный концентрат культуральной жидкости, что упрощает дальнейшее выделение антигенного препарата [14, 36]. Аналогичные данные были получены при выделении препарата Ф1, продуцируемого штаммами *Yersinia pestis* EV *Y. pestis* KM277 [14, 36].

Ультрафильтрационная технология также широко используется в лабораторной практике при выделении антигенов *Salmonella typhi* [38, 42].

В разработке и производстве пилотной серии вакцины против гриппа H5N1 Фонда исследований микробных болезней университета Осаки, Япония, применялось осветление и концентрирование собранного урожая вируса и очистка от овальбумина и бактериального эндотоксина с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы и ультрафильтрации. В экспериментальных исследованиях и разработке пандемической гриппозной вакцины PanFluTM компаний Sinovac Biotech Ltd, Chinese CDC (2005) применялось концентрирование инактивированного материала ультрафильтрацией. Промышленная платформа для очистки вируса гриппа (IBIA Separations, Ljubljana, Slovenia and Wilmington, DE USA.2Avir Green Hills Biotechnology, Vienna, Austria, 2009 г.) предусматривает: осветление низкоскоростным ультрацентрифугированием, концентрирование в 10 раз тангенциальной ультрафильтрацией и очистка анионообменной хроматографией (<http://e-vaccine.ru/articles/45.html>, 10.08.2012).

Одним из способов очистки полисахаридов *Haemophilus influenzae*, используемых в качестве компонентов вакцины, предложенным учеными из института Бразилии (Centro de Biologia, Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil), является использование тангенциальной ультрафильтрации, которая в значительной степени уменьшает количество этанола при осаждении [41].

Повышенное внимание в данной статье нами было уделено применению ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов холерного вибриона. В конце 70-х – начале 80-х годов прошлого столетия в институте «Микроб» проводились исследования по применению мембранной технологии в изготовлении холерного токсина. Исследователями были обоснованы типы мембран, обеспечивающие гарантированное разделение О-антигена от холерного токсина, и выбраны параметры проведения процесса. Было показано, что О-антиген на 98 % задерживался мембранами с размером пор 0,05 мкм, а экзотоксин на 100 % мембранами с размером пор 0,01 мкм. Также было выявлено, что проведение процесса ультрафильтрации при давлении 2,0 кгс/см² увеличивает производительность процесса [28, 29]. В продолже-

ние этих исследований в 10-х годах нашего столетия была показана возможность применения ультрафильтрационных технологий при выделении холерного токсина в производственных условиях. Применение методов ультрафильтрации позволило снизить потери на этапах выделения и очистки антигенных препаратов, концентрирование сырья или полуфабриката и уменьшить трудозатраты. При этом для отделения О-антигена использовались ядерные мембраны 500 Å, а концентрирование полученного фильтрата проводили на ультрафильтрационной колонке с полисульфоновыми волокнами с НОММ от 0 до 20 кДа [35].

В РосНИПЧИ «Микроб» разработана технология концентрирования протективных антигенов штамма *V. cholerae* 569В серовара Инаба методом тангенциальной ультрафильтрации и обоснованы предложения по ее внедрению в производство бивалентной химической таблетированной холерной вакцины. Установлено, что наиболее целесообразно проведение технологического процесса концентрирования О-антигена и холерогена-анатоксина *V. cholerae* 569В серовара Инаба с использованием ультрафильтрационных мембран с НОММ 50 кДа. Также было показано, что для интенсификации процесса мембранного концентрирования необходимо его проведение при следующих параметрах: температура – (37±2) °С, давления на входе и выходе фильтрационной установки – (2,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см² соответственно. При этом свойства вакцины холерной химической бивалентной таблетированной, полученной по новой технологии, соответствовали требованиям нормативной документации и не уступали по качеству препарату, производимому традиционным способом [20].

В 90-х годах прошлого столетия была показана возможность концентрирования и очистки О-антигена холерных вибрионов с использованием ультрафильтрации на полых волокнах с применением мембран с НОММ 300 кДа для дальнейшего получения диагностических препаратов [9]. Была разработана и внедрена в производство масштабируемая технология концентрирования одного из компонентов холерной химической таблетированной вакцины – О-антигена холерного вибриона штамма М41 серовара Огава с использованием ультрафильтрационных модулей на полых волокнах УВА-ПС-20-1040. Проведенные исследования позволили снизить количество сульфата аммония, применяемого для очистки О-антигена, проточной воды и электроэнергии, существенно уменьшить трудозатраты на осуществление данного этапа производства, а также повысить качество конечного продукта за счет получения более очищенной фракции О-антигена, при этом препараты, полученные по данной технологии, соответствовали требованиям действующей нормативной документации [12]. Технология концентрирования протективных антигенов апробирована на штаммах *V. cholerae* O139 серогруппы MO45 и KM137 при изготовлении трех серий экспериментальной вакцины против холеры, вызванной возбудителем O139 серогруппы [10]. В дальнейшем эта технология была усовершенствована

на и внедрена в производство вакцины оральной холерной бивалентной химической таблетированной. Данный способ отличался тем, что концентрирование осуществляют через мембраны с номинальной отсечкой по молекулярной массе 500 кДа в режиме проточной (тангенциальной) фильтрации с давлением 0,24–0,26 МПа, средней удельной скоростью фильтрации (79 ± 2) $\text{дм}^3/\text{м}^2/\text{ч}$ со степенью концентрирования 10 раз. Применение описанного выше метода позволяет увеличить производительность процесса почти в 4 раза и снизить потери О-антигена, с сохранением показателей качества препарата [21].

Учеными из Южной Кореи метод тангенциальной ультрафильтрации с использованием мембран с НОММ 30 кДа успешно применялся для концентрирования холерного токсина [40].

Таким образом, при анализе данных литературы по применению ультрафильтрации для концентрирования и очистки бактериальных и вирусных антигенов установлено, что одним из перспективных является метод фильтрации в тангенциальном режиме на установках с плоскосторонними фильтрующими элементами с использованием мембран, оптимально соответствующих молекулярной массе получаемого продукта. Для увеличения скорости и уменьшения времени проведения фильтрации необходимо оптимизировать режимы температуры и давления, создаваемого фильтрационной установкой.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агафонов А.П., Стрельцова М.А., Игнатьев Г.М., Твердохлебов А.В., Чепурнов А.А., Калиберов С.А., Кузьмин В.А., Черный Н.Б. Способ получения концентратов вирусов, вызывающих геморрагические лихорадки и обладающих иммуногенной и протективной активностью. Патент 2029561 РФ, опубл. 27.02.1995. Бюл. № 6.
- Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС; 2004. 296 с.
- Борковски А. Множественная вакцинация, включающая менингококки серогруппы С. Патент 2457858 РФ, опубл. 10.08.2012. Бюл. № 22.
- Брахт К., Каталевский Е.Е., Савельева С.П. Фильтрация кросс-флоу. *Фармацевтические технологии и упаковка*. 2009; 6: 47–51.
- Брок Т. Мембранная фильтрация. М.: Мир; 1987. 462 с.
- Бывалов А.А., Евстигнеев В.И., Дармов И.В., Пименов Е.В. Антигенный состав чумной химической вакцины. Патент 2190424 РФ, опубл. 10.10.2002. Бюл. № 28.
- Бывалов А.А., Евстигнеев В.И., Дармов И.В., Пименов Е.В. Идентификация и выделение антигена, защищающего морских свинок от экспериментальной чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2005; 1(89):54–8.
- Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Лобовикова О.А., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Михеева Т.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н. Опыт получения кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 2(112):78–81.
- Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Киреев М.Н., Федорова В.А., Аленкина Т.В., Абрамова Е.Г. Новый способ получения О-антигена холерного очищенного с целью создания холерных диагностических препаратов. *Биотехнология*. 2002; 2:42–6.
- Громова О.В., Нижегородцев С.А., Дятлов И.А., Кутырев В.В. Оптимизация процесса производства холерной химической таблетированной вакцины с помощью технологии ультрафильтрации. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 109:71–4.
- Джаяппа Х., О'Коннелл К. Вакцина АЛЬФА ТОКСОИДА C. perfringens. Патент 2434638 РФ, опубл. 27.11.2011. Бюл. № 33.
- Дятлов И.А., Нижегородцев С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Бутов А.С., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Разработка ультрафильтрационной технологии получения О-антигена холерного вибриона для производства вакцин. *Пробл. особо опасных*

- инф.* 2001; 2(82):133–9.
- Егорова Н.Б., Семенов Б.Ф., Курбатова Е.А., Ефремова В.Н., Каверина К.Г., Михайлова Н.А. Поликомпонентная вакцина для иммунопрофилактики и иммунотерапии заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами. Патент 2209081 РФ, опубл. 27.07.2003. Бюл. № 21.
- Еремин С.А., Волох О.А., Шепелев И.А., Дальвадянц С.М., Дятлов И.А. Разработка новых технологических схем и масштабирование процессов получения антигенов чумного и туляремийного микробов. *Пробл. особо опасных инф.* 2006; 2(92):58–61.
- Игнатов П.Е., Федоров А.И. Способ получения протективного вневлеточного антигена бруцелл, обладающего способностью провоцировать хронические формы бруцеллеза. Патент 2199340 РФ, опубл. 27.02.2003. Бюл. № 6.
- Ильченко Т.Э., Бидалова Г.П., Ставицкая Н.Х., Соляник Р.Г., Быстрицкий Л.Д., Красильников И.В. Вакцина «Энцевир» – современный препарат для профилактики клещевого энцефалита. *Сибирский мед. журн.* 2009; 2(2):50–5.
- Караваев Ю.Д., Семенова И.Н., Мельник Н.В., Плохова А.А. Способ изготовления вакцины для профилактики и лечения некробактериоза животных, вакцина для профилактики и лечения некробактериоза животных и способ профилактики и лечения некробактериоза животных. Патент 2329828 РФ, опубл. 27.07.2008. Бюл. № 21.
- Киселевский М.В., Доненко Ф.В., Воюшин К.Е., Тришин А.В., Курбатова Е.А., Егорова Н.Б., Грубер И.М., Ахматова Н.К., Семенова И.Б., Семенов Б.Ф. Способ получения протективной белоксодержащей фракции бактерий. Патент 2311197 РФ, опубл. 27.11.2007. Бюл. № 33.
- Козлов В.Е., Ничвеева Л.Д., Гречкина Н.Т., Шевырев Н.С., Азарова Н.А., Шаров А.Н., Безгин В.М., Солодов Е.Н., Букова Н.К. Способ получения туберкулина. Патент 2113233 РФ, опубл. 20.06.1998. Бюл. № 17.
- Комиссаров А.В., Еремин С.А., Ульянов А.Ю., Алешина Ю.А., Никифоров А.К., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Разработка экспериментальной технологии концентрирования протективных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569В Инаба методом тангенциальной ультрафильтрации. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):75–7.
- Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Экспериментальная оценка использования метода ультрафильтрации по принципу «кросс-флоу» для концентрирования О-антигена в производстве холерной бивалентной химической вакцины. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 2(108):83–6.
- Михайлова Н.А., Шаймухаметов Ф.А., Кузнецова Т.Н. Способ получения экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. Патент 1596770 РФ, опубл. 09.06.1995. Бюл. № 16.
- Несичаев В.А., Молохова Е.И., Чистохина Л.П., Сорокина Ю.В., Белова И.В. Комплексное использование биологически активных метаболитов лакто- и бифидобактерий в производстве пробиотиков. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 2006; 2(4):29–30.
- Нынь И.В. Биотехнология как основной подход в производстве иммунобиологических профилактических препаратов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 2006; 2(4):62–3.
- Ситник Н.П., Загидуллин Н.В., Исрафилов А.Г., Еникеева Л.Ф., Мухачева А.В., Шафеева Р.С., Кунцевич Ю.Г., Петрова И.И. Способ получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки. Патент 2322503 РФ, опубл. 20.04.2008. Бюл. № 11.
- Ситыков В.И., Сурмило А.П., Лемешко В.Н., Соболева Г.Л., Панин А.Н. Способ получения поливалентной вакцины против лептоспироза животных. Патент 2096042 РФ, опубл. 20.11.1997. Бюл. № 32.
- Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир; 1985. 237 с.
- Строганов В.В., Космаенко О.М., Попов А.А., Никитина Г.П., Джапаридзе М.Н., Коткина Т.А. Применение метода ультрафильтрации на отечественных полупроницаемых мембранах УАМ для отделения соматического О-антигена от экзотоксина холерного вибриона. *Пробл. особо опасных инф.* 1978; 4(68):50–67.
- Строганов В.В., Космаенко О.М., Тихонов Н.Г., Адамов А.К., Васин Ю.Г., Никитина Г.П., Маторина Н.А. Экспериментальное изучение ультрафильтрационной установки для получения очищенного холерного экзотоксина. В кн.: Профилактика особо опасных инфекций. 1980. С. 50–7.
- Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Набатников П.А., Михайлов М.И. Способ получения комбинированной бивалентной, культуральной, инактивированной, концентрированной, очищенной вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Патент 2445117 РФ, опубл. 20.03.2012. Бюл. № 8.
- Черкасов А.Н., Пасечник В.А. Мембраны и сорбенты в биотехнологии. Л.: Химия; 1991. 239 с.
- Шевцов А.Н., Лобастов В.С., Боровской Д.В., Меновщиков В.А., Хапаев Н.Г. Способ получения сибирязевого протективного антигена. Патент 2340356 РФ, опубл. 10.12.2008. Бюл. № 34.
- Шевырев Н.С., Безгин В.М., Козлов В.Е., Ничвеева Л.Д., Солодов Е.Н., Шаров А.Н., Букова Н.К., Тырина В.С. Аллерген

для диагностики туберкулеза и способ его получения. Патент 2045959 РФ, опублик. 20.10.1995. Бюл. № 29.

34. Шейвьев Н.С., Безгин В.М., Ничвеева Л.Д., Козлов В.Е., Солодов Е.Н., Козлов В.Е., Гринев А.А., Сорокина А.А., Алехин В.А., Шаров А.Н., Тырина В.С., Букова Н.К. Способ получения туберкулина. Патент 2035914 РФ, опублик. 27.05.1995. Бюл. № 15.

35. Шепелев И.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Волох О.А., Аленкина Т.В., Белякова Н.И., Кузнецова Е.М. Перспективы применения процессов ультрафильтрации для масштабированного получения основных антигенов чумного микроба и холерного вибриона. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):84–7.

36. Шепелев И.А., Волох О.А., Еремин С.А., Дятлов И.А. Оптимизация способа получения протективного «С»-комплекса туляремийного микроба. *Пробл. особо опасных инф.* 2006; 2(92):61–4.

37. Эльберт Л.Б., Красильников И.В., Дроздов С.Г., Терлецкая Е.Н., Тимофеев А.В. Концентрированная очищенная вакцина клещевого энцефалита, изготовленная методом ультрафильтрации и хроматографии. *Вопр. вирусол.* 1985; 1:90–3.

38. Arockiasamy A., Krishnaswamy S. Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface antigen from *Salmonella typhi* for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer-membrane protein. *Anal. Biochem.* 2000; 283(1):64–70.

39. Barrett P., Mundt W., Kistner O., Howard M. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert. Rev. Vaccines.* 2009; 8:607–18.

40. Jang H., Hyo S.K., Jeong A.K. Improved Purification Process for Cholera Toxin and its Application to the Quantification of Residual Toxin in Cholera Vaccines. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(1):108–12.

41. Takagi M., Barbosa R. Purification of capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b through a simple, efficient and suitable method for scale-up. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008; 35:1217–22.

42. Zydnev A.L., Kuriyel R. Protein concentration and buffer exchange using ultrafiltration. *Methods in Biotechnology.* 2000; 9:35–46.

References

1. Agafonov A.P., Strel'tsova M.A., Ignat'ev G.M., Tverdokhlebov A.V., Chepurnov A.A., Kaliberov S.A., Kuz'min V.A., Cherny N.B. [Method for the production of concentrates from the viruses inducing hemorrhagic fevers and possessing immunogenic and protective activity]. RF Patent 2029561, 27.02.1995.

2. Biryukov V.V. [Fundamental Principles of Industrial Biotechnology]. M.; 2004. 296 p.

3. Borkovski A. [Multiple vaccination including *Neisseria meningitidis* serogroup C]. RF Patent 2457858, 10.08.2012.

4. Brakht K., Katalevsky E.E., Savel'eva S.P. [Cross-flow filtration]. *Farmatsevt. Tekhnol. Upakovka.* 2009; 6:47–51.

5. Brok T. [Membrane Filtration]. M.: Mir; 1987. 462 p.

6. Byvalov A.A., Evstigneev V.I., Darmov I.V., Pimenov E.V. [Antigen composition of chemical plague vaccine]. RF Patent 2190424, 10.10.2002.

7. Byvalov A.A., Evstigneev V.I., Darmov I.V., Pimenov E.V. [Identification and isolation of the antigen, protecting guinea pigs from experimental plague infection]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2005; 1(89):54–8.

8. Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Savitskaya L.V., Minaeva L.N., Galkina M.V., Mikheeva T.A., Komissarov A.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Production of rabbit anti-rabies immunoglobulin using cultural antigen]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 2(112):78–81.

9. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Kireev M.N., Fedorova V.A., Alenkina T.V., Abramova E.G. [New method for the production of purified cholera O-antigen with a view to obtain cholera diagnostic preparations]. *Biotechnologia.* 2002; 2:42–6.

10. Gromova O.V., Nizhegorodtsev S.A., Dyatlov I.A., Kutryev V.V. [Optimization of the process of cholera chemical pelleted vaccine production using ultrafiltration technology]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 109:71–4.

11. Dzhayappa Kh., O'Connell K. [Vaccine ALFA TAXOIDA C. perfringens]. RF Patent 2434638, 27.11.2011.

12. Dyatlov I.A., Nizhegorodtsev S.A., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Butov A.S., Klokov O.D., Belyakova N.I. [Development of ultrafiltration technology for the production of cholera vibrio O-antigen with a view to vaccine manufacturing]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2001; 2(82):133–9.

13. Egorova N.B., Semenov B.F., Kurbatova E.A., Efremova V.N., Kaverina K.G., Mikhailova N.A. [Poly-component vaccine for immunoprophylaxis and immunotherapy of the diseases caused by opportunistic (potentially) pathogenic microorganisms]. RF Patent 2209081, 27.07.2003.

14. Yeremin S.A., Volokh O.A., Shepelev I.A., Dalvadyants S.M., Dyatlov I.A. [Designation of new technological patterns and ranging the processes of deriving the antigens from the plague and tularemia microbial agents]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2006; 2(92):58–61.

15. Ignatov P.E., Fedorov A.I. [Method for the production of protective extracellular antigen of *Brucella*, which can induce chronic brucellosis]. RF Patent 2199340, 27.02.2003.

16. Il'chenko T.E., Bilalova G.P., Stavitskaya N.Kh., Solyanik R.G., Bystritsky L.D., Krasil'nikov I.V. [Vaccine "ENCEVIR" – state-of-the-art medical preparation for tick-borne encephalitis prophylaxis]. *Sibir. Med. Zh.* 2009; 2(2): 50–5.

17. Karavaev Yu.D., Semenova I.N., Mel'nik N.V., Plokhova A.A. [Method for the production of the vaccine for animal necrobacillosis prevention and treatment]. RF Patent 2329828, 27.07.2008.

18. Kisilevsky M.V., Donenko F.V., Voyushin K.E., Trishin A.V., Kurbatova E.A., Egorova N.B., Gruber I.M., Akhmatova N.K., Semanova I.B., Semenov B.F. [Method for the production of protective protein-bearing

fraction of bacteria]. RF Patent 2311197, 27.11.2007.

19. Kozlov V.E., Nichveeva L.D., Grechkhina N.T., Shevyrev N.S., Azarova N.A., Sharov A.N., Bezgin V.M., Solodov E.N., Bukova N.K. [Method for the production of tuberculin]. RF Patent 2113233, 20.06.1998.

20. Komissarov A.V., Eremin S.A., Ul'yanov A.Yu., Aleshina Yu.A., Nikiforov A.K., Vasin Yu.G., Klokov O.D., Belyakova N.I. [Development of the experimental technology for protective antigens of *Vibrio cholerae* 569B Inaba concentration by means of tangential ultrafiltration]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3(109):75–7.

21. Komissarov A.V., Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Vasin Yu.G., Klokov O.D., Belyakova N.I. [Experimental evaluation of application of "cross-flow" ultrafiltration method for O-antigen concentrating in cholera chemical bivalent vaccine production]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 2(108):83–6.

22. Mikhailova N.A., Shaimukhametov F.A., Kuznetsova T.N. [Method for the production of A *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin]. RF Patent 1596770, 09.06.1995.

23. Neschislyayev V.A., Molokhova E.I., Chistokhina L.P., Sorokina Yu.V., Belova I.V. [Multiple use of biologically active metabolites of Lacto- and Bifidobacteria in probiotics manufacturing]. *Vestnik Biotechnol. Fizikokhim. Biol. imeni Y.A.Ovchinnikova.* 2006; 2(4):29–30.

24. Nyn'I.V. [Biotechnology as a basic approach to manufacturing of immunobiological preventive preparations]. *Vestnik Biotechnol. Fizikokhim. Biol. imeni Y.A.Ovchinnikova.* 2006; 2(4):62–3.

25. Sitnik N.P., Zagidullin N.V., Israfilov A.G., Enikeeva L.F., Mukhacheva A.V., Shafeeva R.S., Kuntsevich Yu.G., Petrova I.I. [Method for the production of highly specific heterologous anti-rabies serum]. RF Patent 2322503, 20.04.2008.

26. Sit'kov V.I., Surmilo A.P., Lemeshko V.N., Soboleva G.L., Panin A.N. [Method for the production of polyvalent vaccine against animal leptospirosis]. RF Patent 2096042, 20.11.1997.

27. Scopus R. [Methods of Protein Purification]. M.: Mir; 1985. 237 p.

28. Stroganov V.V., Kosmaenko O.M., Popov A.A., Nikitina G.P., Dzhaparidze M.N., Kotkina T.A. [Application of ultrafiltration performed on the home-produced semi-permeable membranes UAM for separation of somatic O-antigen from cholera vibrio exotoxin]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1978; 4(68):50–67.

29. Stroganov V.V., Kosmaenko O.M., Tikhonov N.G., Adamov A.K., Vasin Yu.G., Nikitina G.P., Matorina N.A. [Experimental studies of ultrafiltration module for manufacturing purified cholera exotoxin]. In: [Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections]. 1980. P. 50–67.

30. Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Nabatnikov P.A., Mikhailov M.I. [Method for the production of the mixed bivalent, cultural, inactivated, concentrated, purified vaccine for HFRS (hemorrhagic fever with renal syndrome) prophylaxis]. RF Patent 2445117, 20.03.2012.

31. Cherkasov A.N., Pasechnik V.A. [Membranes and Sorbents in Biotechnology]. L.: Khimiya; 1991. 239 p.

32. Shevtsov A.N., Lobastov V.S., Borovskoy D.V., Menovshchikov V.A., Khapaev N.G. [Method for the production of anthrax protective antigen]. RF Patent 2340356, 10.12.2008.

33. Shevyrev N.S., Bezgin V.M., Kozlov V.E., Nichveeva L.D., Solodov E.N., Sharov A.N., Bukova N.K., Tyrina V.S. [Allergen for diagnostics of tuberculosis and method for its production]. RF Patent 2045959, 20.10.1995.

34. Shevyrev N.S., Bezgin V.M., Nichveeva L.D., Kozlov V.E., Solodov E.N., Grinev A.A., Sorokina A.A., Alekhin V.A., Sharov A.N., Tyrina V.S., Bukova N.K. [Method for the production of tuberculin]. RF Patent 2035914, 27.05.1995.

35. Shepelev I.A., Eremin S.A., Vasin Yu.G., Volokh O.A., Alenkina T.V., Belyakova N.I., Kuznetsova E.M., Nikiforov A.K. [Prospects for application of ultrafiltration technology for the scaled preparation of plague microbe and cholera vibrio major antigens]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3(109):84–7.

36. Shepelev I.A., Volokh O.A., Yereomin S.A., Dyatlov I.A. [Optimization of the techniques for deriving the protective "C" complex of the tularemia pathogen]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2006; 2(92):61–4.

37. El'bert L.B., Krasil'nikov I.V., Dроздов С.Г., Терлецкая Е.Н., Тимофеев А.В. [Concentrated purified vaccine against tick-borne encephalitis produced using ultrafiltration and chromatography]. *Vopr. Virusol.* 1985; 1:90–3.

38. Arockiasamy A., Krishnaswamy S. Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface antigen from *Salmonella typhi* for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer-membrane protein. *Anal. Biochem.* 2000; 283(1):64–70.

39. Barrett P., Mundt W., Kistner O., Howard M. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert. Rev. Vaccines.* 2009; 8:607–18.

40. Jang H., Hyo S.K., Jeong A.K. Improved Purification Process for Cholera Toxin and its Application to the Quantification of Residual Toxin in Cholera Vaccines. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(1):108–12.

41. Takagi M., Barbosa R. Purification of capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b through a simple, efficient and suitable method for scale-up. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008; 35:1217–22.

42. Zydnev A.L., Kuriyel R. Protein concentration and buffer exchange using ultrafiltration. *Methods in Biotechnology.* 2000; 9:35–46.

Authors:

Komissarov A.V., Aleshina Yu.A., Gromova O.V., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Volokh O.A., Lobovikova O.A., Perepelitsa A.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Комиссаров А.В., Алейшина Ю.А., Громова О.В., Никифоров А.К., Еремин С.А., Волох О.А., Лобовикова О.А., Перепелитса А.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 25.09.14.