

УДК 616.932:615.372

**А.В.Комиссаров, С.А.Еремин, О.А.Волох, О.В.Громова, Ю.А.Алешина, Е.М.Кузнецова, Н.Г.Авдеева,
Л.Ф.Ливанова, А.К.Никифоров****СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,
Российская Федерация*

В статье рассмотрено внедрение современных фильтрационных технологий для масштабированного получения В-субъединицы холерного токсина, продуцируемой рекомбинантным штаммом *Vibrio cholerae* non O1 KM93. Проведен выбор оптимального типа микро- и ультрафильтрационных мембран для использования в технологическом процессе. Исследованы свойства В-субъединицы холерного токсина, полученного по разработанной технологии. Разработанный способ масштабированного получения В-субъединицы холерного токсина делает процесс более технологичным за счет внедрения метода тангенциальной микро- и ультрафильтрации на этапах его очистки и концентрирования позволяет исключить трудоемкие операции хроматографической очистки и сохранить свойства В-субъединицы. Проведенные исследования позволяют получать В-субъединицу холерного токсина в производственных условиях с характеристиками, аналогичными при разработке технологии, и использовать ее в качестве компонента холерной химической вакцины.

Ключевые слова: В-субъединица холерного токсина, тангенциальная фильтрация, свойства.

**A.V.Komissarov, S.A.Eremin, O.A.Volokh, O.V.Gromova, Yu.A.Aleshina, E.M.Kuznetsova, N.G.Avdeeva,
L.F.Livanova, A.K.Nikiforov****Improvement of Technology of Cholera Toxin B-Subunit Production***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Consideration is given to implementation of state-of-the-art filtration technologies for up-scaled manufacturing of cholera toxin B-subunit, produced by recombinant *Vibrio cholerae* non O1 KM93 strain. Selected are micro- and ultra-filtration membranes to be incorporated into manufacturing method. Investigated are the properties of cholera toxin B-subunit, obtained applying the pilot technology. The engineered method for up-scaled manufacturing of cholera toxin B-subunit makes the procedure easier-to-maintain due to tangential micro- and ultra-filtration, performed at the stage of purification and concentration. It excludes labor-consuming chromatographic purification, while retaining B-subunit properties. The studies undertaken make it possible to manufacture cholera toxin B-subunit with the same characteristics as in the case of the pilot technology, but under production conditions, and use it as a component for chemical cholera vaccine.

Key words: cholera toxin B-subunit, tangential filtration, properties.

В-субъединица холерного токсина (В-ХТ) является одним из основных иммуногенных компонентов, формирует антитоксический иммунитет. В-ХТ I типа входит в состав холерной вакцины Дюкорал, лицензированной для применения более чем в 70 странах [11]. В литературе описан способ получения очищенной В-ХТ из рекомбинантного штамма *Vibrio cholerae* [2], при котором основная стадия очистки осуществляется с помощью ионообменной хроматографии на фосфоцеллюлозе. Недостатком этого метода является то, что только небольшая часть от исходной концентрации В-ХТ связывается с катионообменником в процессе хроматографии, а большее количество антигена утрачивается.

Данного недостатка лишен способ, описанный в патенте РФ № 2456996 [3]. В предлагаемом способе получения очищенной В-ХТ применяют следующие последовательно сменяющиеся операции. Проводят глубинное культивирование рекомбинантного штамма *V. cholerae* KM93 – продуцента В-ХТ I типа [4, 8]. Источником В-ХТ служит фильтрат бульонной культуры указанного штамма. Из фильтрата бульонной культуры штамма осаждают общую белковую фракцию снижением pH до 4,0 в присутствии 0,25 % гексаметафосфата натрия, перемешивая в течение 2 ч при комнатной температуре. Далее отделяют осадок центрифугированием и суспендируют его в 0,1 М фос-

фатном буфере (pH 7,0). Затем полученную суспензию диализуют против 50 объемов 0,007 М фосфатного буфера (pH 7,0) в течение 24 ч и удаляют нерастворимые примеси центрифугированием. Полученный препарат подвергают гельпроникающей хроматографии на колонке с TSK-гелем HW-60 в три ступени. Элюцию осуществляют 0,007 М фосфатным буфером (pH 7,0), фракционируя по 5 мл. Фракции спектрофотометрируют при 280 нм и анализируют в реакции иммунодиффузии по Оухтерлони (РИД) с антисывороткой к В-ХТ. На второй ступени фракции, содержащие В-ХТ, объединяют, концентрируют и вновь наносят на колонку. Эту процедуру повторяют до тех пор, пока В-ХТ не сходит с колонки одним самостоятельным пиком. Для этого требуется три ступени очистки на TSK-геле HW-60. Полученный целевой продукт диализуют против 0,9 % хлорида натрия, разливают в ампулы и лиофильно высушивают.

Недостатком вышеуказанного способа, ограничивающим его использование для получения В-ХТ как компонента вакцины, является высокая продолжительность технологического процесса и большое количество стадий процесса.

Одним из перспективных направлений, применяемых в технологиях концентрирования и очистки антигенов, является использование метода тангенциальной фильтрации на установках с плоскорамными

фильтрующими элементами [1, 6, 7, 9, 10].

Современный рынок предлагает достаточно широкий спектр биотехнологического оборудования и материалов для методов микро- и ультрафильтрации, обладающих различной производительностью, в том числе и отечественного (Справочник технического директора фармацевтического предприятия, 2009).

Все вышеперечисленное определило перспективность использования новых фильтрационных технологий и оборудования для разработки масштабированного способа получения В-ХТ.

Материалы и методы

Исходным материалом для выделения В-ХТ являлись обработанные формалином центрифугаты бульонной культуры штамма *V. cholerae* KM93 [4, 8], выращенных в пилотном и производственном биореакторах вместимостью 20 и 500 дм³ соответственно, на бульоне из ферментативного гидролизата казеина с 1 % раствора пептона. Очистку и концентрирование В-ХТ проводили с использованием установки для тангенциальной фильтрации на базе фильтродержателя АСФ-009 (Владисарт, Владимир).

Содержание В-ХТ определяли в РИД с антихолерогенной сывороткой (АХС) и иммуноферментным методом с GM₁ ганглиозидами (GM₁-ELISA) [14]. Иммунохимическую активность *in vitro* устанавливали с применением дот-иммуноанализа (ДИА), используя конъюгат диагностикума эритроцитарного холерного антительного с коллоидным золотом. Молекулярную массу определяли методом электрофореза по U.K.Laemmli [12] в 12 % полиамаксидном геле в присутствии додецил сульфата натрия с использованием системы «Bio-Rad» (США) для белкового электрофореза и маркеров молекулярной массы «Fermentas» (Литва). Для обнаружения белков использовали окраску Кумасси синим R-250. Определение концентрации белка осуществляли по Лоури [13].

Результаты и обсуждение

Технологический процесс фракционирования и концентрирования складывался из ряда последовательно выполняющихся операций:

- отделение балластных примесей методом тангенциальной микрофильтрации с использованием мембран с порогом отсечки 0,22 мкм. При этом целевым продуктом является фильтрат. Кроме того, на данной стадии происходит полное удаление клеток холерного вибриона из В-ХТ;

- выделение В-ХТ методом тангенциальной ультрафильтрации с использованием мембран с номинальной отсечкой по молекулярной массе (НОММ) 100 кДа. В фильтрате, полученном после проведения процесса, отсутствует О-антиген;

- концентрирование В-ХТ методом тангенциальной ультрафильтрации с использованием мембран с НОММ 10 кДа. После концентрирования В-ХТ проводится диафильтрация 10 объемами 0,1 М фосфатного буфера с рН 7,0±0,1.

По разработанной методике были получены 4

Фракционирование и концентрирование безмикробного центрифугата штамма *V. cholerae* KM93

Образец	Белок, мг/мл	РДП, титр	GM ₁ ELISA, мкг/мл	Объем, дм ³
Сырье	0,64	1/2	2,65	14,0
0,2 мкм	0,2	1/2	2,65	14,0
100 кДа	0,18	1/2	2,65	14,0
10 кДа:				
фильтрат	0,04	0	0	-
концентрат	3,0	1/16	20,1	2,0
концентрат после диафильтрации	0,33	1/16	20,1	2,0

экспериментально-производственные серии препарата В-ХТ, характеристика которых представлена ниже.

Анализируя данные таблицы, можно констатировать о том, что последовательное применение мембран 0,2 мкм и 100 кДа позволяет проводить очистку В-ХТ от балластных примесей без его потерь. Использование мембран 10 кДа позволяет проводить концентрирование и диафильтрацию В-ХТ с сохранением количества целевого продукта и его дополнительной очисткой.

Далее белковую фракцию, содержащую В-ХТ, осаждали из концентрата гексаметафосфатом натрия в кислой среде (рН 4,0±0,1). Для установки необходимого уровня рН использовали 18,5 % раствор соляной кислоты. После инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре и 4 ч при 4 °С проводили центрифугирование при 12000 об/мин в течение 20 мин. Полученный осадок растворяли в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0±0,1) и проводили диализ против 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,0±0,1) при 4 °С в течение 24 ч с последующим центрифугированием при 3000 об/мин для освобождения от нерастворенных частиц. Полученный препарат стерилизовали через фильтры 0,22 мкм и лиофильно высушивали.

Содержание белка в сухом препарате в среднем составляло (82±2) %. Все серии препарата проявляли высокую иммунохимическую активность – титр в дот-иммуноанализе 1/512–1/1024 (0,5–1 мкг) (рис. 1).

В-ХТ представляет собой белок молекулярной массой 58 кДа, с мономерами молекулярной массой 11,6 кДа, которые образуют димеры, тримеры, тетрамеры и пентамеры, регистрируемые в электрофоретическом анализе. Используемый в работе рекомбинантный штамм-продуцент синтезирует В-ХТ в виде пентамера, который в белковом электрофорезе регистрировался в виде полос с молекулярной массой 58 кДа и может содержать полосы с молекулярной массой 34, 23 кДа (рис. 2).

Иммунохимическая специфичность всех полученных серий В-ХТ была подтверждена в иммуноблоттинге со специфической поливалентной кроли-

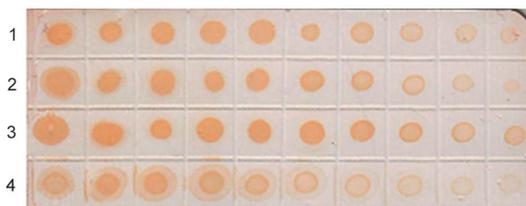


Рис. 1. Дот-иммуноанализ серий В-субъединицы холерного токсина: 1 – серия 1; 2 – серия 2; 3 – серия 3; 4 – серия 4

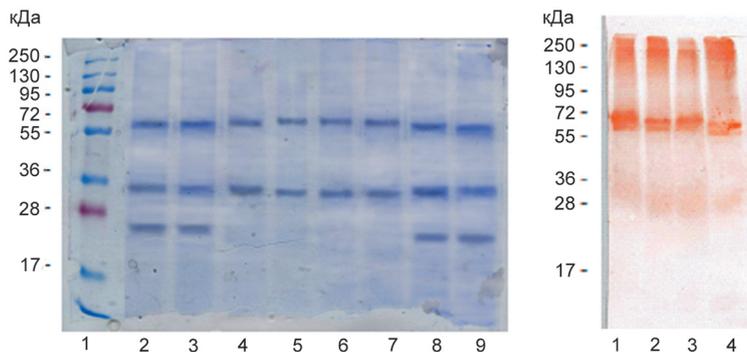


Рис. 2. Электрофореграмма (а) и иммуноблоттинг (б) серий В-субъединицы холерного токсина:

(а) окраска Кумасси R-250: 1 – маркеры молекулярной массы «Fermentas» (Литва); 2, 3 – серия 1; 4, 5 – серия 2; 6, 7 – серия 3; 8, 9 – серия 4. (б) 1 – серия 1; 2 – серия 2; 3 – серия 3; 4 – серия 4

чей сывороткой к В-ХТ (рис. 2).

По разработанной экспериментальной технологии из обработанной формалином центрифугата бульонной культуры штамма *V. cholerae* КМ93 в количестве 250 дм³, выращенного в производственном био-реакторе, была получена серия В-ХТ с показателями, аналогичными при разработке технологии. Это дает основание для внедрения описанного способа получения В-ХТ в технологический процесс производства.

В подтверждение разработанных методических приемов говорят результаты иммунобиологической оценки препаратов В-ХТ, полученных различными способами: по предложенному в данной статье; полученный с помощью технологии дифференциальной ультрафильтрации; хроматографически очищенная В-ХТ. Было показано, что все препараты В-ХТ не токсичны для биомоделей и не вызывают в их органах и тканях значимых патоморфологических изменений, а также способны инициировать иммунитет по наличию синтеза антител к В-ХТ [5].

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бракт К., Каталевский Е.Е., Савельева С.П. Фильтрация кросс-флоу. *Фармацевтические технологии и упаковка*. 2009; 6:47–51.
2. Захарова Т.Л., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Получение очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма *Vibrio cholerae*. *Биотехнология*. 2003; 5:53–56.
3. Захарова Т.Л., Киреев М.Н., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Способ получения очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма *Vibrio cholerae*. Патент 2456996 РФ, опубл. 27.07.2012 г. Бюл. № 21.
4. Ильина Т.С., Смирнов Г.Б., Смирнова Н.И., Ливанова Л.Ф. Рекомбинантная плазмидная ДНК рIEM3, кодирующая синтез В-субъединицы холерного токсина, способ ее конструирования и штамм бактерий *Vibrio cholerae* – продуцент В-субъединицы холерного токсина. Авторское свидетельство 1505022 СССР, опубл. 15.10.1991 г. Бюл. № 28.
5. Ключева С.Н., Шуковская Т.Н., Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Смирнова Н.И., Волох О.А., Захарова Т.Л., Белякова Н.И., Еремин С.А., Никифоров А.К. Иммунобиологическая характеристика В-субъединицы холерного токсина. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 3(113):67–70.
6. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Ульянов А.Ю., Аleshina 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.
7. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Аleshina 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.
8. Смирнова Н.И., Крепостнова И.М., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Еремин С.А., Ильина Т.С. Авирулентный штамм *Vibrio cholerae* – продуцент В-субъединицы холерного токсина: получение и молекулярно-генетический анализ. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2007; 4:7–13.
9. 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.

10. 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.

11. Cholera vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2010; 85(13):117–28.

12. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680–5.

13. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265–75.

14. Svennerholm A.M., Holmgren J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA) procedure. *Curr. Microbiol.* 1978; 1:19–23.

References

1. Brakht K., Katalovsky E.E., Savel'eva S.P. [Cross-flow filtration]. *Farmatsevt. Tekhnol. Upakovka.* 2009; 6:47–51.
2. Zakharova T.L., Livanova L.F., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Production of purified cholera toxin B-subunit from recombinant *Vibrio cholerae* strain]. *Biotechnologia.* 2003; 5:53–6.
3. Zakharova T.L., Kireev M.N., Livanova L.F., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Method for the production of purified cholera toxin B-subunit from recombinant *Vibrio cholerae* strain]. RF Patent 2456996, 27.07.2012.
4. Il'ina T.S., Smirnov G.B., Smirnova N.I., Livanova L.F. [Recombinant plasmid pIEM3 DNA, encoding cholera toxin B-subunit synthesis, method for its construction and *Vibrio cholerae* strain – producer of cholera toxin B-subunit]. USSR Certificate of Authorship 1505022. 15.10.1991.
5. Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Shmel'kova T.P., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Smirnova N.I., Volokh O.A., Zakharova T.L., Belyakova N.I., Eremin S.A., Nikiforov A.K. [Immunobiological characteristics of cholera toxin B-subunit]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 3(113):67–70.
6. Komissarov A.V., Eremin S.A., Ul'yanov A.Yu., Aleshina Yu.A., Nikiforov A.K., Vasin Yu.G., Klokova 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.
7. Komissarov A.V., Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Vasin Yu.G., Klokova 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.
8. Smirnova N.I., Krepostnova I.M., Livanova L.F., Zadnova S.P., Eremin S.A., Il'ina T.S. [A virulent *Vibrio cholerae* strain – producer of cholera toxin B-subunit: engineering and molecular-genetic analysis]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2007; 4:7–13.
9. 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.
10. 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.
11. Cholera vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2010; 85(13):117–28.
12. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680–5.
13. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265–75.
14. Svennerholm A.M., Holmgren J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA) procedure. *Curr. Microbiol.* 1978; 1:19–23.

Authors:

Komissarov A.V., Eremin S.A., Volokh O.A., Gromova O.V., Aleshina Yu.A., Kuznetsova E.M., Avdeeva N.G., Livanova L.F., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Комиссаров А.В., Еремин С.А., Волох О.А., Громова О.В., Аleshina Ю.А., Кузнецова Е.М., Авдеева Н.Г., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 03.04.14.