

О.В.Громова¹, С.А.Нижегородцев¹, И.А.Дятлов², В.В.Кутырев¹

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ

¹Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

²Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk

Разработана и внедрена в производство холерной химической вакцины технология получения О-антигена штамма *Vibrio cholerae* M41 с использованием ультрафильтрационных модулей на полых волокнах. Ультрафильтрация позволяет получать нативные высокоактивные препараты О-антигена, соответствующие требованиям действующей нормативной документации, экономить в 10–15 раз сульфат аммония, используемый для осаждения антигена, уменьшать вдвое длительность технологического цикла и снизить трудозатраты. Технология концентрирования протективных антигенов апробирована на штаммах *V. cholerae* O139 серогруппы MO45 и KM137, получены 3 серии экспериментальной вакцины против холеры, вызванной возбудителем O139 серогруппы.

Ключевые слова: холерная химическая вакцина, производственные штаммы, О-антиген, ультрафильтрация.

O.V.Gromova¹, S.A.Nizhegorodtsev¹, I.A.Dyatlov², V.V.Kutyrev²

Optimization of the Process of Cholera Chemical Pelleted Vaccine Production Using Ultrafiltration Technology

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; ²State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Technology of O-antigen obtaining from *Vibrio cholerae* M41 production strain, using the hollow fiber ultrafiltration modules, is developed and introduced into cholera vaccine manufacturing. Application of ultrafiltration makes it possible to obtain native high-activity O-antigen preparations which comply with the current regulatory requirements. Besides, it provides for economy (10–15-fold) of ammonium sulphate, used for antigen precipitation, reduces the duration of technological cycle (2 times), and the labor inputs. The technology of protective antigen concentrating is tested on *V. cholerae* strains MO45 and KM137 of O139 serogroup. Three series of experimental *V. cholerae* O139 vaccine are obtained.

Key words: cholera chemical vaccine, production strains, O-antigen, ultrafiltration.

Одной из приоритетных задач медицины является резкое снижение заболеваемости, вызываемое возбудителями опасных и особо опасных инфекций. Важную роль в решении данной проблемы играют вакцины. В Российском научно-исследовательском институте «Микроб» разработана и производится бивалентная химическая таблетированная холерная вакцина, содержащая основные протективные антигены холерного вибриона: холероген-анатоксин и соматические О-антигены (О-АГ) серогрупп Огава и Инаба. Также создана экспериментальная модульная вакцина из штаммов O1 и O139 серогрупп [3, 6].

Для оптимизации производства проанализирована каждая стадия процесса получения препарата для поиска путей увеличения выхода вакцины без изменения ее качества. Наибольшие материальные и временные затраты обнаружены на стадиях выделения специфических компонентов вакцины.

Целью работы явилось усовершенствование производства оральной холерной химической вакцины путем внедрения новых технологий, для улучшения стандартности препарата, уменьшения затрат труда и повышения выхода целевого продукта. Конкретная задача исследования состояла во внедрении в произ-

водство вакцины новой технологии получения О-АГ с использованием ультрафильтрационных модулей на полых волокнах.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы-продуценты *V. cholerae* O1 серогруппы M41 Огава и 569В Инаба, а также штаммы O139 серогруппы MO45 (Япония) и KM-137 [9]. Выращивание штаммов проводили в производственных условиях [5]. Химический состав характеризовали, как описано ранее [6]. Гель-фильтрацию проводили на колонке (35×2 см) с TSK гелем HW-60 с фосфатным буфером M/150, pH 7,2. Безвредность и иммуногенность по ED₅₀ определяли на белых мышах, заражение иммунизированных мышей проводили вну- трибрюшинно тампами *V. cholerae* 879-М Инаба, *V. cholerae* 3122-Р Огава и *V. cholerae* P-16064 O139 [1, 5]. Активность холерогена определяли на взрослых кроликах с помощью внутрикожной реакции, Специфическую активность очищенных антигенов определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) и РНГА [6]. В серологических тестах использовали коммерческие холерные

сыворотки: О1 и О139-агглютинирующая и антихолерогенная (РосНИПЧИ «Микроб»).

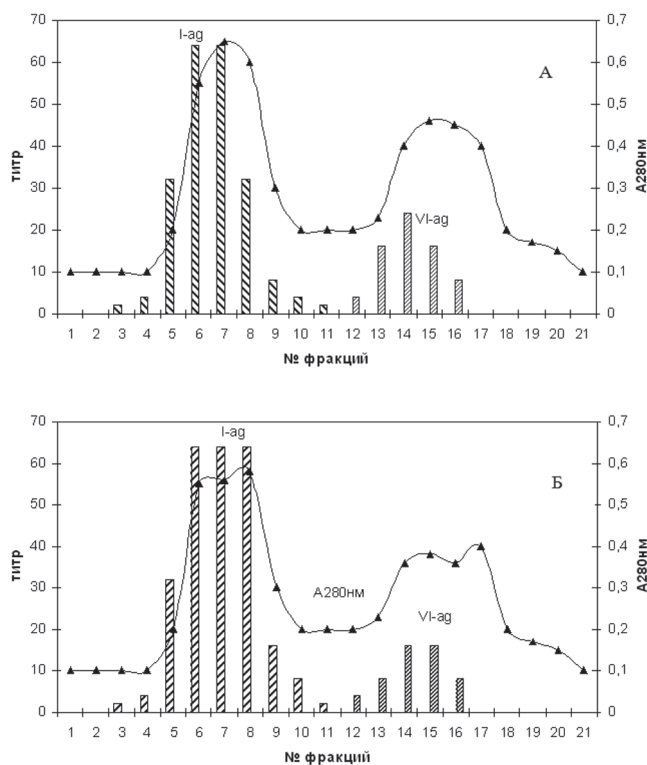
Результаты и обсуждение

Технологическая схема выделения иммуногенов коммерческой вакцины предполагает использование растворимых антигенов из культуральной жидкости штаммов-продуцентов [5]. Исходным материалом для получения О-АГ является центрифугат бульонной культуры штамма М41, выращенного в течение (10 ± 2) ч на казеиновом бульоне методом глубинного культивирования, детоксицированный в холодильной комнате в течении 30 сут при температуре (8 ± 2) °С. Согласно регламенту производства холерной вакцины для выделения у О-АГ из обеззараженной и детоксицированной культуральной жидкости требуется большое количество сульфата аммония. Для повышения эффективности и снижения затрат этого процесса предложен новый способ предварительной ультрафильтрации центрифугата с целью его концентрирования в 10–15 раз и удаления неспецифических примесей с молекулярной массой менее 20 кДа [2, 4]. Нами была сконструирована и смонтирована установка с использованием шести ультрафильтрационных волоконных колонок марки УВА-ПС-20-1040 суммарной производительностью по дистиллированной воде 4380 л/ч, соединенных последовательно с включенным в конструкцию вспомогательным оборудованием [7]. На данной установке проведено концентрирование 3 серий формализованного центрифугата штамма М41 Огава в количестве 450 л в трех производственных циклах. Скорость отвода фильтрата была высокой – 2,4 л/мин с последующим постепенным снижением до 0,82 л/мин. Среднее время концентрирования в 3 сериях равнялось (7 ± 1) ч. Концентраты О-АГ центрифугировали на сверхцентрифуге СГО-100 при 13000g для осаждения нерастворимых компонентов, из надосадочной жидкости осаждали О-АГ при 50 % насыщения сульфатом аммония с последующим отделением осадка и диализом. Далее материал лиофилизировали и использовали как компонент химической таблетированной вакцины (серии 09–011).

Результаты, полученные в процессе сравнительного изучения данных О-АГ, позволили сделать вывод о том, что внедрение нового технологического этапа не ухудшило их качества как компонентов вакцины, а в некоторых случаях имелось преимущество перед традиционной технологией (средние титры РНГА производственных серий 1:112, у экспериментальной серии 011 1:224). Изучение химического состава полученных О-АГ показало наличие 22–24 % углеводов, 12–15 % липидов, 3–5 % нуклеиновых кислот, что является сходным с коммерческими О-АГ. Некоторые отличия обнаружены в количестве белка: у экспериментальных О-АГ оно составляло 20–22 %, а у полученных традиционным способом – 25–27 %. Возможно, это связано с удалением в процессе ультра-

трафильтрации неспецифических белковых компонентов. Содержание альдогептозы во всех препаратах было близким и составляло 0,5–0,6 %. Как известно, альдогептоза является маркером липополисахарида холерного вибриона и может характеризовать содержание О-АГ в препаратах [6]. Таким образом, О-АГ, полученные с помощью технологии ультрафильтрации, по своим физико-химическим свойствам и серологической активности соответствовали препаратам, выделенным по регламенту производства. Результаты гель-хроматографического анализа О-АГ на колонке с TSK-гелем HW-60 (рисунок) продемонстрировали их подобие: в элюатах препаратов обнаружился специфический О-АГ и некоторое количество антигена VI, относящегося к неспецифическим термостабильным антигенам, что связано со стерилизацией обоих препаратов текучим паром.

Три сформированные экспериментально-производственные серии вакцины – 09, 010, 011 были проконтролированы по всем тестам, заложенным в ФСП-42-0020-0020-00. В результате проведенных контролей установлено, что все 3 серии соответствовали паспортным данным и требованиям нормативной документации. Средние данные по трем сериям препарата: антигенная активность по анти-токсинсвязыванию (ЕС) составила 100000 ЕС на таблетку (лимит 100000 ± 20000 ЕС), содержание О-АГ в РНГА в обратных значениях титра реакции равно 2500 (лимит не менее 2000). Иммуногенная актив-



Хроматография на TSK-геле HW-60
О-антигена холерного вибриона:

А – по регламенту, Б – с ультрафильтрацией. По оси абсцисс – номер фракций; по оси ординат – кривая элюции белка при $A_{280\text{nm}}$; I-ag, VI-ag – содержание антигенов (титр в пробе РИД)

ность по ED_{50} на белых мышах составила в среднем 1/30000 часть таблетки (лимит не более 1/20000 части таблетки). Все серии были нереактогенными при испытаниях на добровольцах (по пять волонтеров на серию), нетоксичны в дозе 1/160 части таблетки при подкожном введении белым мышам и специфически безопасны при испытаниях на кроликах (в 1 мг белка препарата содержалось в среднем 4000 условных кожных доз) при лимите не более 6000.

Для отработки технологии ультрафильтрации на материале штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы было проведено производственное выращивание двух штаммов-продуцентов O139 серогруппы – МО-45 и КМ 137. Выращивание штаммов, получение формализованного центрифугата и его детоксикация проводились так же, как и штаммов O1 серогруппы.

Ультрафильтрацию формализованного центрифугата (125 л каждого штамма) проводили на производственном стенде в течение 2 ч с целью концентрирования содержащегося в нем О-АГ. Скорость фильтрации составила в среднем 1 л/мин. В процессе ультрафильтрации каждые 15 мин производили отбор проб фильтрата, который контролировался по мутности (что позволяло определять целостность волокон колонки) и содержанию О-АГ. Оставшийся на колонке препарат был смыт обратным током жидкости. Практически весь О-АГ, растворенный в культуральной жидкости, концентрировался в процессе ультрафильтрации и сохранялся в концентрате. Концентраты центрифугировали, О-АГ фракционировали сульфатом аммония и далее получали полуфабрикат вакцины, как описано для штамма М41.

Изучение химического состава полученных О-АГ O139 показало наличие 24–26 % углеводов, 20–22 % белка, 12–15 % липидов, 3–5 % нуклеиновых кислот что соответствует данным анализа фракций, полученных традиционным способом. Серологическая активность фракций также соответствовала фракциям О-АГ, полученным традиционно (титр РИД 1:8). Далее было скомпоновано и проконтролировано три серии таблеток O139 вакцины (015–017). Как компонент, содержащий в экспериментальной вакцине анатоксин холерогена и О-антиген Инаба, использовали материал штамма *V. cholerae* 569В. Средние данные по трем сериям препарата: антигенная активность по антитоксинам связыванию (ЕС) составила 100000 ЕС на таблетку, содержание О-АГ в РИД в обратных значениях титра реакции равно 3200. Все серии были нетоксичны в дозе 1/160 части таблетки для белых мышей и специфически безопасны при испытаниях на кроликах.

Особенно интересным является тот факт, что иммуногенная активность экспериментальной вакцины против O139 серогруппы с применением ультрафильтрации (серии 015–017) по ED_{50} на белых мышах была значительно выше показателей серии 012, полученной традиционно (ED_{50} составила в среднем 1/50000 часть таблетки (015–017) и 1/35000 (012) при

заражении штаммом O1 серогруппы; 1/45000 часть таблетки (серии 015–017) и 1/28000 (012) при заражении штаммом O139 серогруппы).

Таким образом, метод производства холерной таблетированной вакцины с использованием препаратов О-АГ, полученных ультрафильтрацией был успешно апробирован на штаммах-продуцентах O1 и O139 серогруппы коммерческой и экспериментальной вакцин. Один цикл концентрирования по новой технологии позволил уменьшить количество используемого сульфата аммония в 10–15 раз, убрать этап осаждения балластной фракции, ее центрифугирования и диализа, уменьшить на 25 ч время технологического цикла.

Ультрафильтрат культуральной жидкости вакцинного штамма М41, накапливающийся в процессе получения О-АГ в качестве отхода производства, может служить источником ферментов холерного вибриона и применяться для производства питательных сред [8].

На основе разработанной технологии получения О-АГ холерного вибриона штамма М41 Огава методом ультрафильтрации было составлено Изменение № 3 к РП № 479-99 вакцины холерной бивалентной химической таблетированной, которое утверждено ГИСК им. Л.А.Тарасевича и внесено в регламент производства.

В результате настоящего исследования нами экспериментально обосновано использования метода ультрафильтрации на полых волокнах для получения антигенов холерного вибриона и проведено внедрение масштабируемой технологии изготовления таблетированной холерной вакцины (в том числе и против O139 сероварианта) с использованием данного метода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
2. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Космаенко О.М. Способ получения О-антигена холерного очищенного. Патент РФ № 2143280. Оpubл. 27.12.99. Бюл. № 36.
3. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Наумов А.В. и др. Оральная химическая вакцина против холеры. Патент РФ № 2159128. Оpubл. 20.11.2000.
4. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Киреев М.Н., Федорова В.А., Аленкина Т.В. и др. Новый способ получения О-антигена холерного очищенного с целью создания холерных диагностических антисывороток. Биотехнология. 2002; 2:42–7.
5. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.П., Мелещенко М.В., Доброва В.Г., Заворотных В.И. и др. Оральная химическая вакцина из гипертонических штаммов КМ-76 Инаба и КМ-68 Огава возбудителя холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 4:31–3.
6. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Громова О.В., Адамов А.К., Елисеев Ю.Ю., Космаенко О.М. и др. Использование нового штамма *Vibrio cholerae* O139 в качестве продуцента энтеральной химической вакцины. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1996; 2:52–5.
7. Дятлов И.А., Нижегородцев С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Бутов А.С., Клокова О.Д. и др. Разработка ультрафильтрационной технологии получения О-антигена холерного вибриона для производства вакцины. Пробл. особо опасных инф. 2001; 2(82):133–9.
8. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Плотников О.П., Грачева И.В., Виноградова Н.А. и др. Способ получения питательной основы и питательная среда для культивирования микроорганизмов рода *Yersinia* и *Vibrio*. Патент РФ № 2360962. Оpubл. 10.07.09. Бюл. № 19.

9. Чеховская Г.В., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Бескапсульные мутанты *Vibrio cholerae* O139 серогруппы: получение, идентификация и использование для приготовления диагностической O139 антисыворотки. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000; 1:34–7.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz; 1962. 180 p.
2. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Kosmaenko O.M. [Method of obtainment of cholera O-antigen purified]. RF Patent 2143280. 27 Dec 1999.
3. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Naumov A.V. [Oral chemical cholera vaccine]. RF Patent 2159128. 20 Nov 2000.
4. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Kireev M.N., Fedorova V.A., Alenkina T.V. et al. [New method of obtainment of the purified cholera O-antigen for the preparation of cholera diagnostic anti-serums]. Biotechnology. 2002; 2:42–7.
5. Dzhaparidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P., Meleshchenko M.V., Dobrova V.G., Zavorotnykh V.I. et al. [Oral chemical vaccine obtained from the hyper-toxigenic cholera agent strains KM–76 Inaba and KM–68 Ogawa]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991; 4:31–3.
6. Dzhaparidze M.N., Naumov A.V., Gromova O.V., Adamov A.K., Eliseev Yu.Yu., Kosmaenko O.M. et al. [Usage of the new *Vibrio cholerae* O139 strain as a producer of enteric chemical vaccine]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1996; 2:52–5.
7. Dyatlov I.A., Nizhegorodtsev S.A., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Butov A.S., Klokov O.D. et al. [Development of the ultrafiltration technology of ob-

tainment of the cholerae vibrio O-antigen for the vaccine production]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2001; 2 (82):133–9.

8. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Plotnikov O.P., Gracheva I.V., Vinogradova N.A., et al. [Method of obtainment of the nutrient substrate and nutrient medium for cultivation of *Vibrio* and *Yersinia* microorganisms]. RF Patent 2360962. 10 Jul 2009.

9. Chekhovskaia G.V., Shchelkanova E.Yu., Smirnova N.I. [Noncapsular mutants of *Vibrio cholerae* serogroup O139: their isolation, identification and use for the preparation of an O139 diagnostic antiserum]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2000; 1:34–7.

Authors:

Gromova O.V., Nizhegorodtsev S.A., Kutuyev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Громова О.В., Нижегородцев С.А., Кутуйев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболеник, Московская обл. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 05.10.10.