

А.В.Комиссаров, С.А.Еремин, А.Ю.Ульянов, Ю.А.Алешина, А.К.Никифоров, Ю.Г.Васин,
О.Д.Клокова, Н.И.Белякова

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИИ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* 569В ИНАБА МЕТОДОМ ТАНГЕНЦИАЛЬНОЙ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Разработана экспериментальная технология концентрирования протективных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569В Инаба (холерогена-анатоксина и О-антигена) методом тангенциальной ультрафильтрации. Проведена оптимизация технологического процесса концентрирования. Данная технология позволяет получать компоненты холерной вакцины, соответствующие нормируемым требованиям.

Ключевые слова: холерная вакцина, холероген-анатоксин, О-антиген, концентрирование, тангенциальная ультрафильтрация.

A.V.Komissarov, S.A.Eremin, A.Yu.Ulyanov, Yu.A.Aleshina, A.K.Nikiforov, Yu.G.Vasin, O.D.Klokov, N.I.Belyakova

Development of the Experimental Technology for Protective Antigens of *Vibrio cholerae* 569B Inaba Concentration by Means of Tangential Ultrafiltration

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Worked out is the experimental technology for protective antigens of *Vibrio cholerae* 569 B Inaba (cholera-anatoxin and O-antigen) concentrating by means of tangential ultrafiltration. Optimization of concentrating technological process is carried out. This technique makes it possible to obtain cholera vaccine components meeting all regulatory requirements.

Key words: cholera vaccine, cholera-anatoxin, O-antigen, concentrating procedure, tangential ultrafiltration.

Одним из недостатков существующей технологии производства вакцины холерной бивалентной химической, таблетированной является затратный и трудоемкий этап выделения нативных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569В Инаба. Данный недостаток обусловлен тем, что выделение О-антигена (О-АГ) и холерогена-анатоксина (ХА) проводят методом солевого осаждения сульфатом аммония непосредственно из детоксицированного безмикробного центрифугата формализированной культуральной жидкости холерного вибриона, что приводит к его значительному расходу. Устранить указанный технологический недостаток возможно предварительным концентрированием безмикробного формализированного центрифугата. Нами ранее была показана возможность применения метода тангенциальной ультрафильтрации для концентрирования одного из компонентов таблетированной холерной вакцины – О-АГ штамма *V. cholerae* М41 Огава из безмикробного центрифугата [2]. Поэтому исследования, направленные на внедрение в производственный процесс технологий концентрирования антигенных компонентов холерной химической вакцины, получаемых из штамма *V. cholerae* 569В Инаба тангенциальной ультрафильтрацией, имеют под собой определенную практическую основу и являются актуальными.

Целью данной работы являлась разработка экспериментальной технологии концентрирования О-АГ и ХА штамма *V. cholerae* 569В Инаба из без-

микробного центрифугата методом тангенциальной ультрафильтрации.

Материалы и методы

При выполнении работы использовали производственный штамм *V. cholerae* 569В Инаба, продуцент ХА и О-АГ (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), который выращивали при 37 °С в реакторе-ферментере Р170 объемом 250 дм³ на среде из ферментативного гидролизата казеина в условиях глубинного культивирования. Через 10 ч выращивание прекращали добавлением формалина до конечной концентрации 0,6 %. Для концентрирования О-АГ и ХА применяли установки для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-009, снаряженной мембранными модулями с номинальной отсечкой по молекулярной массе (НОММ) 10, 20 и 50 кДа, с площадью фильтрации равной 0,1 м² и Vivaflow-200 (производства фирмы Sartorius, Германия) с мембранными модулями 30 и 100 кДа, с площадью фильтрации равной 0,02 м². Критерием окончания процесса выбрана уменьшение объема безмикробного центрифугата в 10 раз. Активность О-АГ холерного вибриона определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) по Оухтерлони и реакции непрямой агглютинации (РНГА) с О1-сывороткой. Активность ХА холерного вибриона устанавливали в РИД с антихолерогенной сывороткой (АХС) и по единицам связывания ана-

Таблица 1

Показатели, полученные при концентрировании с использованием мембранных модулей с различными НОММ

Показатель	Значение показателя, полученного при использовании мембранного модуля с НОММ, кДа														
	10			20			30			50			100		
	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К
Активность О-АГ в РИД с О1-сывороткой, обратный титр	4	0	64	4	0	64	4	0	64	4	0	64	4	0	64
Активность ХА в РИД с АХС, обратный титр	2	0	32	2	0	32	2	0	32	2	0	32	2	1	4
Средняя удельная скорость фильтрации, дм ³ /м ² /час	13			21			34			39			62		

Примечание. Ц – безмикробный центрифугат, Ф – фильтрат, К – концентрат.

токсина (ЕС), определенным при подкожном введении препарата кроликам массой (2,7±0,25) кг.

Результаты и обсуждение

Первый этап работы был связан с оценкой возможности использования мембран с различными НОММ для концентрирования ХА и О-АГ. В предварительных экспериментах процесс ультрафильтрации проводили при давлении на входе и выходе фильтрационной установки равными (1,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см² соответственно и температуре проведения процесса – (8±2) °С. Объемы безмикробного центрифугата составляли по 10,0 дм³. Среднюю удельную скорость фильтрации определяли по объему фильтрата, удаленному за промежуток времени от начала до окончания процесса концентрирования. Результаты данного этапа исследований, представленные в табл. 1, показывают, что использование мембранного модуля с НОММ 100 кДа для концентрирования нецелесообразно, так как значительная часть ХА проходит в фильтрат. При использовании других мембранных модулей для концентрирования безмикробных центрифугатов содержание О-АГ и ХА в концентрате увеличивается в 16 раз, при этом О-АГ и ХА в фильтрате не обнаруживается. Наибольшая средняя удельная скорость фильтрации определена при использовании мембранного модуля с НОММ 50 кДа, что дало нам основание выбрать его для проведения дальнейших исследований.

Для определения возможной сорбции ХА и

О-АГ внутри пор мембранных модулей проводили их отмывку путем рециркуляции через установку дистиллированной воды объемом 0,5 дм³ в течение 60 мин. Промывочную воду исследовали на наличие ХА и О-АГ путем постановки РИД. В промывочной воде ХА и О-АГ не обнаружены, что дает основание предполагать, что они не сорбируются на мембранных модулях.

Выделение протективных антигенов из безмикробных центрифугатов, подвергнутых концентрированию, проводили с использованием ряда последовательно выполняющихся операций:

осаждение балластных фракций сернокислым аммонием при 37 % насыщении, после формирования осадка при комнатной температуре в течение ночи материал центрифугировали на центрифуге Beckman при 10000 г в течение 20 мин;

осаждение ХА и О-АГ из полученного центрифугата сернокислым аммонием при 80 % насыщении, после формирования осадка при комнатной температуре в течение ночи материал центрифугировали на центрифуге Beckman при 10000 г в течение 20 мин;

диализ полученного осадка против дистиллированной воды;

стерилизация отдиализованного осадка путем фильтрации через мембраны с размером пор 0,2 мкм и лиофилизация.

Выделение протективных антигенов из безмикробного центрифугата, не подвергавшегося концентрированию, проводили как описано выше, за исключением проведения процесса центрифугирования,

Таблица 2

Сравнительные показатели сухих препаратов О-АГ и ХА, полученных по регламентной технологии и с использованием мембранных модулей с различными НОММ

Показатель	Значение показателя, полученного по					Нормируемое значение показателя
	регламентной технологии	экспериментальной технологии при использовании мембран с НОММ, кДа				
		10	20	30	50	
Объем безмикробного центрифугата, дм ³	550	10	10	10	10	–
Активность препарата:						
по ЕС	6000	6000	5500	6000	6000	≥2000
в РНГА с О1-сывороткой, обратный титр	256	252	300	264	264	≥100
Вес препарата, г	122	2,5	2,6	2,5	2,4	“

Примечание. «–» – требования отсутствуют.

Сравнительные показатели сухих препаратов О-АГ и ХА, полученных при различных температурах фильтрации и по регламентной технологии

Показатель	Значение показателя, полученного по			Нормируемое значение показателя
	регламентной технологии	экспериментальной технологии при различных температурах фильтрации, °С		
		20±2	37±2	
Активность препарата по ЕС	6000	6000	6500	≥2000
в РНГА с О1-сывороткой, обратный титр	256	264	256	≥100

осуществляемого на производственной центрифуге СГО-100 при 15000 g. Определенные показатели качества сухих препаратов представлены в табл. 2.

Анализируя данные, представленные в табл. 2, можно сделать выводы, что значения показателей сухих препаратов О-АГ и ХА, приготовленных по экспериментальной технологии, соответствуют нормируемым и значимо не отличаются друг от друга, а выход (по соотношению веса сухого полуфабриката на объем безмикробного центрифугата) незначительно превышает значения показателей препаратов О-АГ и ХА, полученных по регламентной технологии. Следует отметить, что в реализованном эксперименте количество сульфата аммония, затраченного на осаждение по регламентному способу, составило 334,4 кг, а по предлагаемому – 0,608 кг, т.е. в 10 раз меньше, исходя из объемов препаратов, подвергаемых осаждению.

Ранее нами [2] было показано, что процесс ультрафильтрации возможно интенсифицировать путем проведения процедуры «сканирования» давления. Для повышения эффективности процесса концентрирования ХА и О-АГ были проведены исследования по выбору рационального соотношения давления на входе и выходе фильтрационной установки. Проведенные исследования показали, что оптимальными параметрами для концентрирования ХА и О-АГ являются давление на входе равное (2,5±0,1) и на выходе (0,5±0,1) кгс/см² соответственно, что совпало с обоснованными параметрами при концентрировании О-АГ штамма *V. cholerae* М-41 Огава [1]. Установленные параметры позволили увеличить среднюю удельную скорость фильтрации с 39 до 58 дм³/м²/час при сохранении показателей качества определенных ранее.

В ряде работ [1, 3, 4] показано, что с повышением температуры скорость процесса фильтрации возрастает. В связи с этим для дальнейшей оптимизации процесса фильтрации, важное значение приобретали исследования по изучению температурных режимов концентрирования и их влияния на качество полупродуктов.

Дополнительно к ранее исследованному процессу фильтрации при температуре (8±2) °С, апробировано два температурных режима проведения концентрирования ХА и О-АГ – (20±2) и (37±2) °С. Средняя удельная скорость фильтрации составила: при температуре (20±2) °С – 56 дм³/м²/ч и (37±2) °С –

72 дм³/м²/ч. Активность лиофилизированных препаратов, как следует из данных табл. 3, полученных в эксперименте, соответствовала нормируемым значениям и существенно не отличалась от активности препаратов, полученных по регламентной технологии.

Таким образом, нами разработана экспериментальная технология концентрирования ХА и О-АГ штамма *V. cholerae* 569В Инаба из безмикробного центрифугата методом тангенциальной ультрафильтрации, которая позволяет снизить количество сульфата аммония, используемого для осаждения до 10 раз и получать препараты с показателями качества, отвечающими требованиям нормативной документации. Является перспективным применение разработанной технологии в производственном процессе получения вакцины холерной бивалентной химической таблетированной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дытнерский Ю.И. Мембранные процессы разделения жидких смесей. М.: Химия; 1995. 252 с.
2. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина Ю.А. и др. 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):83–5.
3. Комиссаров А.В., Комоско Г.В., Лещенко А.А. и др. Изучение процесса стерилизующей фильтрации жидкого противосибирезявного лошадиного глобулина. Биотехнология. 2002; 2:66–74.
4. Черкасов А.Н., Пасечник В.А. Мембраны и сорбенты в биотехнологии. Л.: Химия; 1991. 239 с.

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

1. Dytner'sky Yu. I. [Membrane processes of liquid-mixture separation]. Moscow: Khimiya; 1995. 252 p.
2. Komissarov A.V., Eremin S.A., Aleshina Yu. A., Vasin Yu.G., Klokoва 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):83–5.
3. Komissarov A.V., Komosko G.V., Leshchenko A.A. et al. [Study of sterilization filtration process of the liquid anti-anthrax equine globulin]. Biotechnology. 2002; 2:66–74.
4. Cherkasov A.N., Pasechnik V.A. [Membranes and sorbents in biotechnology]. Leningrad: Khimiya; 1991. 239 p.

Authors:

Комиссаров А.В., Еремин С.А., Ульянов А.Ю., Алешина Ю.А., Никифоров А.К., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Никифоров А.К., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И., Ульянов А.Ю. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 20.10.10.