

**А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, О.В. Громова, А.В. Комиссаров, С.А. Еремин, О.А. Волох,
Ю.А. Алешина, А.В. Гаева, Т.Л. Захарова, В.И. Павлова**

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* 569В ИНАБА, ПОЛУЧЕННЫХ НА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ И РАЗРАБОТАННОМ БИОРЕАКТОРАХ И ПО УСОВЕРШЕНСТВОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)

*Изучены иммунохимические, физические и биохимические свойства протективных антигенов *Vibrio cholerae* 569В Инаба, полученных на производственном и сконструированном биореакторах и с применением технологии их концентрирования тангенциальной ультрафильтрацией. Во всех препаратах было определено присутствие таких ферментов, как протеаза, твиназа и лизофосфолипаза. Проведенный dot-иммуноанализ показал на одинаковое содержание холероген-анатоксина и О-антигена в исследуемых образцах. Изучение специфических фракций с помощью хроматографических и электрофоретических методов продемонстрировало подобие их свойств. Таким образом, доказана возможность использования сконструированного биореактора и технологии концентрирования протективных антигенов *V. cholerae* 569В Инаба тангенциальной ультрафильтрацией в производственном процессе получения вакцины холерной химической бивалентной таблетированной.*

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холероген-анатоксин, О-антиген, свойства

EVALUATION OF *VIBRIO CHOLERAЕ* 569B INABA PROTECTIVE ANTIGENES, DERIVED ON INDUSTRIAL AND DEVELOPED BIOREACTORS AS WELL AS BY IMPROVED TECHNOLOGY

**A.K. Nikiforov, M.N. Kireyev, O.V. Gromova, A.V. Komissarov, S.A. Yeriomin, O.A. Volokh,
Yu.A. Aleshina, A.V. Gayeva, T.L. Zakharova, V.I. Pavlova**

Scientific Research Anti-plague institute «Microbe», Saratov

*We evaluated immunochemical, physical and biochemical properties of *Vibrio cholerae* 569B INABA protective antigens, derived on industrial and own-developed bioreactors as well as by technology of its concentration by tangential ultrafiltration. We detected protease, twinase and lysophospholipase in all samples. Also, dot-immunoanalysis showed equal concentration of cholero-gen-anatoxine and O-antigen in all samples too. Using chromatography and electrophoresis, we found their properties as similar. Thus, we suppose to be possible using developed bioreactor as well as technology of *Vibrio cholerae* 569B INABA protective antigens concentration by tangential concentration during a process of synthetic oral cholera vaccine production.*

Key words: *Vibrio cholerae*, cholero-gen-anatoxine, O-antigen, features

Нами было усовершенствовано производство вакцины холерной бивалентной химической таблетированной за счет внедрения в производственный процесс сконструированного биореактора и обоснована возможность использования процесса концентрирования протективных антигенов *Vibrio cholerae* 569В Инаба методом тангенциальной ультрафильтрации [1, 3, 4, 7].

Была изучена кинетика роста биомассы производственных штаммов холерных вибрионов и накопления О-антигенов (О-АГ) *V. cholerae* М-41 серовара Огава и 569В серовара Инаба, а также холерогена *V. cholerae* 569В серовара Инаба [3]. Было показано, что кинетика роста биомассы и накопления О-АГ и холерного токсина значимо не отличается от аналогичных показателей в существующих производственных реакторах, при этом полученные полупродукты (О-АГ и холероген-анатоксин (ХА)) соответствуют нормируемым требованиям. В результате дальнейших исследований было установлено, что культивирование производственных штаммов холерных вибрионов на разработанном биореакторе обеспечивает по-

лучение кондиционных нативных протективных антигенов, при этом изучение физиологических свойств производственных штаммов холерных вибрионов в ходе их глубинного культивирования на производственных и разработанном биореакторах показало их идентичность. Кроме того, исследование физико-химических и иммунобиологических свойств вакцины холерной химической бивалентной таблетированной, полученной с использованием разработанного биореактора, показало, что она соответствует требованиям нормативной документации и не уступает по качеству препарату, производимому традиционным способом [1].

При этом свойства полученных компонентов вакцины изучались только в соответствии с показателями, установленными нормативными документами на производство холерной вакцины. Поэтому значимый научно-практический интерес представляло более детальное исследование иммунохимических, физических и биохимических свойств протективных антигенов *Vibrio cholerae* 569В Инаба, полученных на производственных и разработанном биореакторах и по усовершенство-

ванной технологии, что и являлось целью данной работы.

МЕТОДИКА

В качестве препарата сравнения использовали сухую специфическую фракцию, содержащую ХА и О-АГ холерного вибриона 569В серии 208, полученную в соответствии с производственным регламентом. Исследованиям подвергались две сухие специфические фракции, содержащую ХА и О-АГ холерного вибриона 569В: полученные на разработанном (препарат 1) и производственном (препарат 2) биореакторах. Другим отличием препаратов 1 и 2 от полученных по регламентному способу являлось то, что безмикробный детоксигированный центрифугат, содержащий ХА и О-АГ холерного вибриона 569В (препарат 2), был подвергнут концентрированию тангенциальной ультрафильтрацией.

В исследовании использовали коммерческую сыворотку диагностическую холерную О1 адсорбированную сухую для реакции агглютинации производства РосНИПЧИ «Микроб» (серия 78) и ОСО стандартной антихолерогенной сыворотки, полученную иммунизацией кроликов очищенным от О-антигена энтеротоксином (серия 8).

Хроматографическое фракционирование осуществляли на системе для хроматографии Biologic LP (Bio-Rad, США) с использованием колонки длиной 16 см с внутренним диаметром 2,0 см с TSK-гелем HW-65. Электрофоретический контроль выделенных фракций осуществляли на системе для электрофореза «Mini protean II» фирмы «Bio-Rad» (США).

Для определения протеазной активности использовали 10%-й молочный агар. Для нахождения фермента фосфолипазы А2 использовали специальную среду с эмульсией яичного желтка. Для определения твиназной активности использовали следующую среду: 1,2 % агар Дифко, 0,01 М трис-буфер (рН-7,5-7,6) с 0,14 М натрия хлористого, твин 40 (0,4 % по объему), 0,05 мл 1М раствора магния сульфата на 100 мл, натрия азид 0,02 %. При исследовании активности лизофосфолипазы использовали среду с эмульсией яичного желтка, предварительно обработанной коммерческой фосфолипазой А₂ из пчелиного яда. Определение ферментов проводили путем использования специальных твердых агаровых сред по разработанным методам [2, 6]. Постановка всех реакций осуществлялась на агаровых пластинках и чашках Петри с рядом лунок. Чашки помещали в термостат при температуре 37 °С и учет результатов проводили через 1 сут, окончательный – через 2 сут. Наличие ферментов регистрировали в пробе, взятой в количестве 0,1 мл. Действие протеазы учитывали по ширине протеолиза вокруг лунки. О наличии фосфолипазы, лизофосфолипазы и твиназы судили по появлению зон помутнения вокруг лунки.

Определение концентрации белка проводили в соответствии с методиками, изложенными в

«Методических указаниях...» (МУК 4.1/4.2.588-96). Определение химического состава общепринятыми методиками: суммарные углеводы – по Дюбуа, альдогептозы – по Osborn. Количество нуклеиновых кислот измеряли по методу, описанному А.С. Спириным [5]. Для определения общих липидов использовали биотест «Lachema».

Для изучения специфической активности препаратов *in vitro* использовали метод дот-иммуноанализа с применением конъюгата специфических антител с коллоидным золотом. Для постановки дот-иммуноанализа исследуемые образцы (содержание белка 2 мг/мл) титровали в 96-луночном планшете с деионизованной водой. Затем на нитроцеллюлозную мембрану «Millipore» (0,45 мкм) наносили по 2 мкл образца в виде последовательного ряда точек, начиная с разведения 1:20. После впитывания материала и высухания мембраны, ее два раза промывали 0,9%-м раствором натрия хлорида по 3 мин. Затем мембрану погружали в 3%-й раствор бычьего сывороточного альбумина на 15 мин для блокировки свободных сайтов связывания. После чего мембрану промывали 0,9%-м раствором натрия хлорида два раза по 3 мин, а затем – два раза по 3 мин деионизованной водой. Заблокированную мембрану помещали в 400 мкл приготовленного конъюгата специфических антител. Мембрану выдерживали в течение 1,5–2 ч при температуре 20–25 °С, промывали проточной водой, после чего учитывали результат. За титр принимали то наибольшее разведение, при котором визуально регистрировали четко различимое пятно красного либо оранжевого цвета.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение химического состава фракций, полученных двумя различными способами, результаты которого представлены в таблице 1, показало, что общее количество основных химических компонентов в препаратах было, в основном, подобным.

Таблица 1
Сравнительная характеристика препарата холерогена-анатоксина и О-антигена, полученных по регламентной и усовершенствованной технологиям

Наименование характеристики	Значение характеристики специфической фракции содержащей ХА и О-АГ		
	Серия 208	Получен по экспериментальной технологии	
		препарат 1	препарат 2
Белок, %	31,0	23,5	24,0
Углеводы, %	15,0	15,3	15,3
Липиды, %	8,61	8,3	8,3
Нуклеиновые кислоты, %	0,81	0,84	0,84
Альдогептоза, %	0,11	0,085	0,09

Как было показано ранее [2], в специфической фракции холероген-анатоксин из штамма холерного вибриона 569В преобладали два фермента – твиназа и лизофосфолипаза. Проведенные нами исследования показали следующие результаты: в

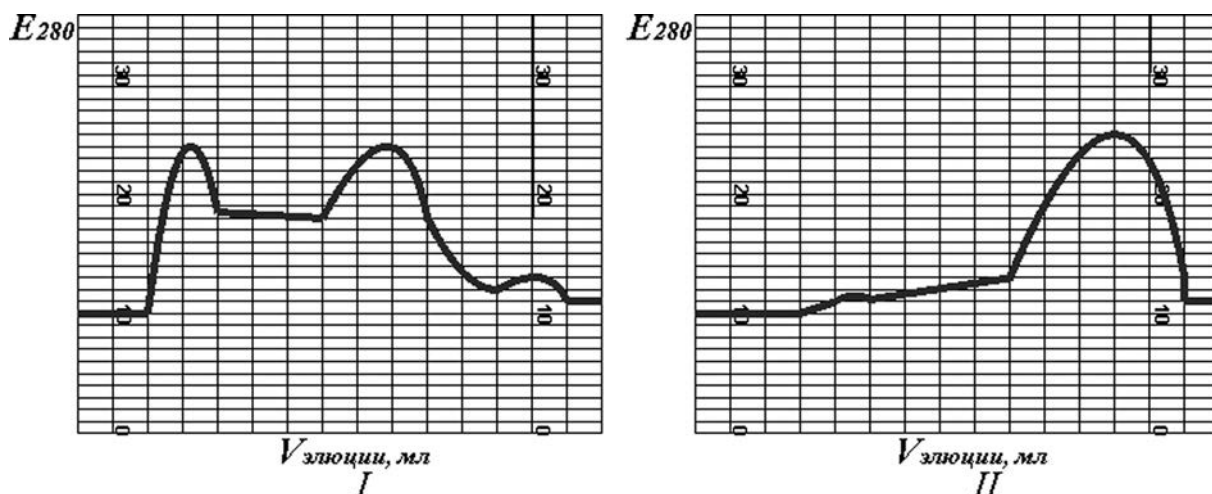


Рис. 1. Результаты хроматографического анализа препаратов: I – препараты 1 и 2 (хроматограммы для них одинаковы); II – серия 208.

серии 208 были определены протеаза (1:4), твиназа (1:4), лизофосфолипаза (1:4) и фосфолипаза А2 (1:8); в экспериментальных сериях (препараты 1 и 2) – протеаза (1:2), твиназа (1:2), лизофосфолипаза (1:4).

С использованием дот-иммуноанализа были проведены исследования содержания ХА и О-АГ в препаратах 1 и 2. Полученные данные свидетельствуют о том, что ХА и О-АГ в обоих препаратах обнаруживается в разведениях 1:380 и 1:1280 соответственно. Был проведен анализ полученных специфических фракций с помощью хроматографического разделения на колонке с TSK-гелем HW-65 по величине молекулярной массы (рис. 1). Полученные этим методом результаты исследования экспериментальных препаратов продемонстрировали их подобие, при этом с колонки элюировалось три пика.

Проведенный анализ электрофоретической подвижности экспериментальных препаратов, данные которого представлены на рисунке 2, свидетельствует о том, что их белково-углеводные комплексы практически идентичны и состоят из компонентов с молекулярной массой от 12 до 90 кДа.

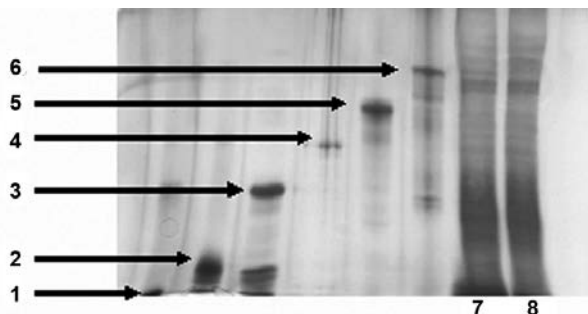


Рис. 2. Результаты анализа электрофоретической подвижности препаратов, проведенного с использованием диск-электрофореза с окраской серебром. 1–6 – маркеры молекулярной массы (1 – 12300 Да, 2 – 17800 Да, 3 – 25000 Да, 4 – 37000 Да, 5 – 45000 Да, 6 – 67000 Да); 7 и 8 – препараты 1 и 2 соответственно

ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенный сравнительный анализ иммунохимических, физических и биохимических свойств протективных антигенов полученных по традиционной технологии и с помощью разработанного ферментационного оборудования и по экспериментальной технологии показал, в основном, их подобие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Исследование процессов культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов вакцины холерной бивалентной химической таблетированной в сконструированном биореакторе / А.К. Никифоров [и др.] // Пробл. особо опасных инф. – (в печати).
2. Мониторинг активности ферментов при производстве вакцины холерной бивалентной таблетированной / И.А. Кузьмиченко [и др.] // Биотехнология. – 2010. – № 2. – С. 87–92.
3. Разработка биореактора и оценка возможности его использования в производстве холерной вакцины / А.Ю. Ульянов [и др.] // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2011. – № 1. – С. 39–44.
4. Разработка экспериментальной технологии концентрирования протективных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569В Инаба методом тангенциальной ультрафильтрации / А.В. Комиссаров [и др.] // Пробл. особо опасных инф. – 2011. – Вып. 3(109). – С. 75–77.
5. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. – 1958. – Т. 23. – Вып. 5. – С. 656–662.
6. Тест-среды для определения активности твиназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах / И.А. Кузьмиченко [и др.] // Пробл. особо опасных инф. – 2002. – Вып. 1 (83). – С. 148–152.

7. Ферментационная установка для культивирования микроорганизмов / А.К. Никифоров [и др.] // Патент № 86184 РФ, МПК C12M1/02, C12R1/01; 27.08.09., Бюл. № 24.

Сведения об авторах

Никифоров Алексей Константинович – кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора по научной и производственной работе, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Киреев Михаил Николаевич – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Громова Ольга Владимировна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Комиссаров Александр Владимирович – кандидат технических наук, доцент, старший научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (410040 Россия, город Саратов, улица Техническая, дом. 47/61, кв. 117; тел. 89172132402; e-mail: Komissarov-9@yandex.ru)

Еремин Сергей Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующий отделом, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Волох Оксана Александровна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Алешина Юлия Александровна – младший научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Гаева Анна Вячеславовна – младший научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Захарова Татьяна Львовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Павлова Варвара Игоревна – научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»