

УДК 616.932:615.371

А.В.Комиссаров, А.К.Никифоров, А.И.Перепелица, С.А.Еремин, О.В.Громова, Ю.Г.Васин, О.А.Волох,  
А.В.Гаева, Л.Ф.Ливанова

## АППАРАТНЫЙ МЕТОД ОБЕССОЛИВАНИЯ АНТИГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

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

Экспериментально доказана возможность применения метода тангенциальной ультрафильтрации для обессоливания антигенных компонентов вакцины холерной бивалентной химической таблетированной. Определены технологические параметры проведения процесса. Показано, что свойства холерогена-анатоксина, продуцируемого штаммом *Vibrio cholerae* 569В Инаба и О-антигенов, продуцируемых штаммами *V. cholerae* 569В Инаба и М-41 Огава, полученных с использованием разработанных методических приемов, не уступают полученным по традиционной технологии и удовлетворяют требованиям нормативной документации. Обоснованная опытным путем технология обессоливания антигенных компонентов холерной химической вакцины позволила снизить время проведения процесса с 3–4 сут до 5–6 ч и проводить его в контролируемых условиях. Аппаратный метод обессоливания внедрен в производственный процесс получения вакцины.

*Ключевые слова:* тангенциальная ультрафильтрация, вакцина холерная, антигены, обессоливание.

A.V.Komissarov, A.K.Nikiforov, A.I.Perepelitsa, S.A.Eremin, O.V.Gromova, Yu.G.Vasin, O.A.Volokh,  
A.V.Gaeva, L.F.Livanova

## Hardware-Controlled Method of Desalting Antigen Components of Cholera Chemical Vaccine

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

Experimentally substantiated is the possibility to apply tangential ultrafiltration for desalting antigen components of the tableted bivalent chemical cholera vaccine. Specified are the technological parameters of the process. It is demonstrated that the properties of choleraen-anatoxin (produced by *Vibrio cholerae* strain 569B Inaba) and O-antigens (produced from *V. cholerae* 569B Inaba and M-41 Ogawa strains) obtained using the designed methodology are as efficient as the ones manufactured using certified procedure and satisfy regulatory requirements. Experimentally substantiated technology for the desalting of antigen components of chemical cholera vaccine provides for the reduction of the time elapsed up to 5-6 hours from the original 3 to 4 days. It also allows for the manufacturing under controlled conditions. This hard-ware controlled method of desalting has been implemented into the vaccine production practice.

*Key words:* tangential ultrafiltration, cholera vaccine, antigens, desalting.

Наиболее эффективными средствами профилактики и диагностики холеры являются медицинские иммунобиологические препараты [4]. В 2001 г. в России вакцинация против холеры, в соответствии с Приказом Минздрава России от 27.07.2001 № 229, была включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. В настоящее время в Российской Федерации для вакцинации и ревакцинации населения используют вакцину холерную бивалентную химическую таблетированную производства института «Микроб». Хотя данная вакцина не уступает по эффективности зарубежным аналогам [6, 8] в технологии ее приготовления имеется ряд недостатков, обусловленных тем, что она была разработана более 20 лет назад, одним из которых является диализ О-антигена (О-АГ) и холерогена-анатоксина (ХА) холерного вибриона штамма 569В Инаба и О-АГ холерного вибриона штамма М-41 Огава для их освобождения от сульфата аммония в целлофановых диализных мешочках против водо-

проводной воды, что не исключает вероятность попадания в диализуемые продукты нежелательных примесей, находящихся в воде. Кроме того, данный технологический процесс довольно длительный, его проведение длится от 3 до 4 сут.

Одним из перспективных направлений требующих, на наш взгляд, внедрения в технологию приготовления холерной вакцины является применение метода тангенциальной ультрафильтрации для обессоливания антигенных компонентов холерной вакцины, что и являлось целью данной работы.

## Материалы и методы

В работе использовали безмикробные детоксигированные центрифугаты, полученные при производственном выращивании штаммов *V. cholerae* М-41 Огава и 569В Инаба (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб») и осажденные сульфатом аммония. Для обессоливания

О-АГ и ХА применяли установки для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-009, снаряженной мембранными модулями с номинальной отсежкой по молекулярной массе (НОММ) 30 кДа, с площадью фильтрации равной 0,1 м<sup>2</sup>; на базе фильтродержателя АСФ-020, снаряженной мембранными модулями с НОММ 30 кДа, с площадью фильтрации равной 0,7 м<sup>2</sup>; Vivaflow-200 с мембранным модулем 300 кДа, с площадью фильтрации равной 0,02 м<sup>2</sup>.

Серологическую активность О-АГ холерного вибриона определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) по Оухтерлони с О1 сывороткой. Активность ХА устанавливали в РИД с антихолерогенной сывороткой (АХС). Определение ионов аммония и сульфат-ионов проводили в соответствии с методами, изложенными в нормативной документации [5].

### Результаты и обсуждение

В настоящее время можно выделить несколько типов фильтрующих элементов для систем тангенциальной фильтрации: плоскорамный (кассетный), рулонный, трубчатый, половолоконный, керамический [1, 7]. Преимуществом плоскорамных фильтрационных элементов является возможность их линейного масштабирования: отработав технологию на лабораторной установке, полученные данные можно использовать для расчета пилотной и промышленной установок [1]. Поэтому именно данный тип фильтрующих элементов был выбран для проведения исследований.

Был апробирован процесс обессоливания диафильтрацией в периодическом режиме. Технологические режимы проведения процесса диафильтрации были выбраны исходя из результатов собственных исследований по концентрированию О-АГ и ХА методом тангенциальной ультрафильтрации [2, 3]: давление на входе и выходе фильтрационной установки – (2,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см<sup>2</sup> соответственно. Для обессоливания О-АГ были апробированы ультрафильтрационные модули с НОММ 300 кДа с площадью фильтрации 0,02 м<sup>2</sup>, ХА – 30 кДа с площадью фильтрации 0,1 м<sup>2</sup>.

Количество обессоливаемых продуктов насыщенных сульфатом аммония, полученных после центрифугирования, составило: О-АГ 569В Инаба и О-АГ М-41 Огава – по 100 граммов; ХА 569В Инаба – 25 граммов.

Центрифугаты выделенных антигенов были растворены, в соответствии с регламентом производства, в дистиллированной воде до величины оптической плотности равной (0,6±0,2) при измерении в кювете с рабочей длиной 20 мм и длиной волны 590 нм. Полученные объемы составили: О-АГ 569В Инаба и О-АГ М-41 Огава – по 1,0 дм<sup>3</sup>; ХА штамма 569В Инаба – 0,01 дм<sup>3</sup>. Полученные полупродукты подвергали десятикратному разбавлению дистиллированной водой и концентрировали до исходного объема. Количество дистиллированной воды, израс-

Значения параметров, определенных при обессоливании

Наименование продукта	Значения параметров		
	Количество воды, дм <sup>3</sup>	Время, ч	Средняя удельная скорость фильтрации, дм <sup>3</sup> /м <sup>2</sup> /ч
О-АГ 569В Инаба	16,0	2,5	64
О-АГ М-41 Огава	15,0	3,0	50
ХА 569В Инаба	2,6	2,0	65

ходованной на обессоливание, время проведения технологического процесса, средняя удельная скорость фильтрации представлены в таблице.

Проведенные исследования по оценке показателей качества обессоленных препаратов показали, что они не уступают полученным по регламентной технологии. Так, активность О-АГ 569В Инаба и О-АГ М-41 Огава в РИД с О1 сывороткой составляла 1:32 и 1:125 соответственно, ХА 569В Инаба в РИД с АХС – 1:16. Данные значения были одинаковы для препаратов, полученных как по регламентной, так и по экспериментальной технологиям. Основываясь на полученных значениях средней удельной скорости фильтрации, представленных в таблице, и количестве получаемых продуктов за один производственный цикл произвели расчет площади ультрафильтрационных модулей необходимой для обессоливания антигенов в течение 5–6 ч. Для обессоливания ХА 569В Инаба необходима фильтрующая поверхность до 4 м<sup>2</sup>, О-АГ М-41 Огава – до 5 м<sup>2</sup>, О-АГ 569В Инаба – до 4 м<sup>2</sup>. На рынке оборудования для производства медицинских иммунобиологических препаратов данное оборудование представлено довольно широко (компании Владисарт, Sartorius, Millipore).

Таким образом, на основании полученных данных показана принципиальная возможность обессоливания антигенных компонентов вакцины холерной бивалентной химической таблетированной методом тангенциальной ультрафильтрации и проведено обоснование выбора фильтрационного оборудования в промышленную технологию производства холерной вакцины.

Следующим шагом исследований являлась апробация разработанных методических приемов в условиях производства холерной химической вакцины.

В эксперименте участвовали безмикробные детоксицированные центрифугаты микробных культур *V. cholerae* М-41 Огава (400 дм<sup>3</sup>) и 569В Инаба (360 дм<sup>3</sup>), т.е. то количество, которое получается за один производственный цикл выращивания холерных вибрионов. Бездомные центрифугаты концентрировали до 10,0 дм<sup>3</sup> и подвергали осаждению сульфатом аммония (О-АГ Инаба до 30 % насыщения, О-АГ Огава – до 50 и ХА Инаба – до 80) с последующим получением осадка центрифугированием. Обессоливание проводили с использованием оборудования технологического участка концентрирования антигенов (рис. 1), включающего в себя установку для фильтрации на базе фильтродержателя АСФ-020, снаряженной 4 ультрафильтрационными моду-

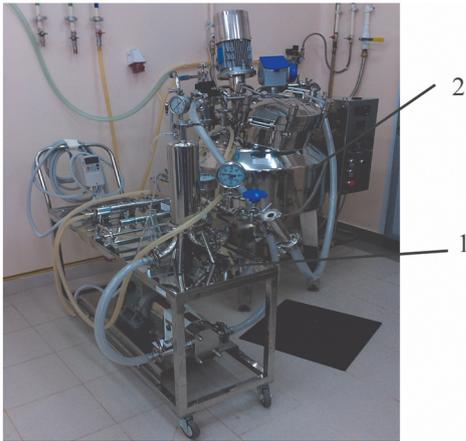


Рис. 1. Оборудование для обессоливания:  
1 – фильтрационная установка; 2 – емкость РВД-100

лями с НОММ 30 кДа с общей площадью фильтрации равной 2,8 м<sup>2</sup>, и реактор РВД-100. Антигенные компоненты разводили дистиллированной водой до 10,0 дм<sup>3</sup> в реакторе, добавляли воду до общего объема 80 дм<sup>3</sup> и концентрировали до исходного объема. При достижении объема 10 дм<sup>3</sup> анализировали на содержание ионов аммония и сульфат-ионов. Данную процедуру повторяли до достижения нулевой концентрации ионов. Динамика процесса обессоливания представлена на рис. 2.

Анализируя полученные данные, можно гово-

рить о том, что время обессоливания антигенных компонентов составляет от 2 до 4 ч, что даже меньше, чем было рассчитано при проведении предварительных экспериментов, учитывая, что и площадь фильтрации составляла меньшую величину. Количество дистиллированной воды, затраченной на проведение процесса максимально составляло 300 дм<sup>3</sup>. Максимальные продолжительность и объем воды определены для обессоливания ХА 569В Инаба, что объясняется большим в сравнении с другими антигенными компонентами количеством сульфатом аммония, затрачиваемом при его осаждении. Представляет интерес тот факт, что удаление сульфат-ионов происходит быстрее, чем ионов аммония. Данное обстоятельство позволяет выбрать тип иономера для контроля процесса обессоливания в режиме реального времени.

По разработанным методическим приемам получено по 3 производственные серии каждого из антигенных компонентов холерной химической вакцины, полностью удовлетворяющих требованиям нормативной документации, что дало основание для внедрения аппаратного метода обессоливания в технологический процесс производства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брайт К., Каталевский Е.Е., Савельева С.П. Фильтрация кросс-флоу. Фармацевтические технологии и упаковка. 2009; 6:47–51.

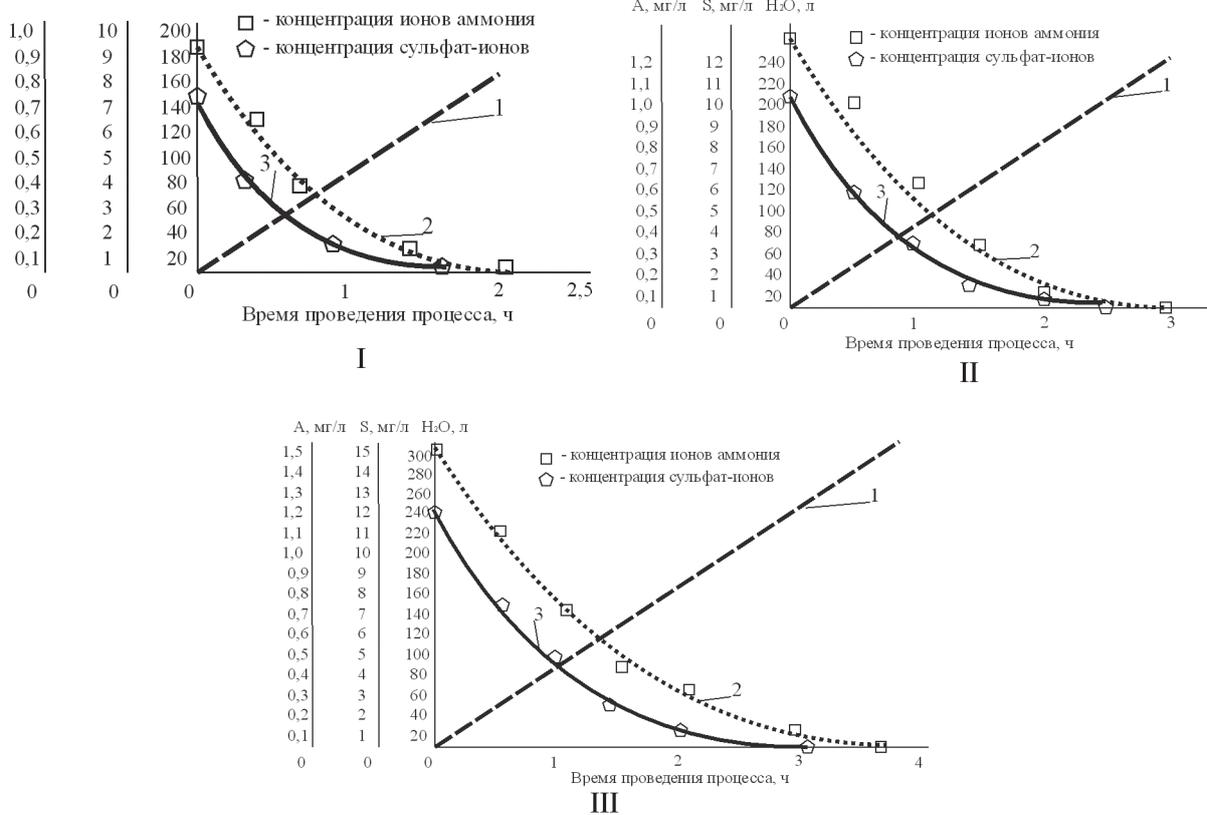


Рис. 2. Динамика процесса обессоливания антигенных компонентов холерной химической вакцины:

A – концентрация ионов аммония; S – концентрация сульфат-ионов; I – данные для О-АГ 569В Инаба; II – данные для О-АГ М-41 Огава; III – данные для ХА 569В Инаба

2. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Ульянов А.Ю., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Громова О.В., Крайнова А.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И., Васин Ю.Г. Разработка экспериментальной технологии концентрирования протективных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569В Инаба методом тангенциальной ультрафильтрации. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):75–7.

3. 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.

4. Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области профилактики особо опасных инфекционных бактериальных инфекций. *Пробл. особо опасных инф.* 2006; 2(92):18–24.

5. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. МУК 4.1/4.2.588-96. М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998.

6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Щуковская Т.Н., Смирнова Н.И., Никифоров А.К., Еремин С.А., Топорков В.П. Специфическая профилактика холеры в современных условиях. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):5–12.

7. Черкасов А.Н., Пасечник В.А. Мембраны и сорбенты в биотехнологии. Л.: Химия; 1991. 240 с.

8. Щуковская Т.Н., Саяпина Л.В., Кутырев В.В. Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактик.* 2009; 2:62–7.

#### References

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

2. Komissarov A.V., Eremin S.A., Ulyanov 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.

3. 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.

4. Kutyrev V.V., Devdariani Z.L., Sayapina L.V. [Present status of the researches in the sphere of vaccine prophylaxis of particularly dangerous bacterial infections]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2006; 2(92):18–24.

5. [Methods of control of medical immunobiological preparations administered to humans. Methodological Regulations]. MR 4.1/4.2.588-96. M., 1998.

6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N., Smirnova N.I., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Toporkov V.P. [Cholera specific prophylaxis in modern conditions]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):5–12.

7. Cherkasov A.N., Pasechnik V.A. [Membranes and Sorbents in Biotechnology]. L.: Khimiya; 1991. 240 p.

8. Shchukovskaya T.N., Sayapina L.V., Kutyrev V.V. [Preventive vaccination against cholera: Current state of affairs]. *Epidemiol. Vaksino prof.* 2009; 2:62–7.

#### Authors:

Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Perepelitsa A.I., Eremin S.A., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Volokh O.A., Gaeva A.V., Livanova L.F. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Перепелица А.И., Еремин С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Волох О.А., Гаева А.В., Ливанова Л.Ф. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 27.09.13.