

И.А.Шепелёв, С.А.Еремин, Ю.Г.Васин, О.А.Волох, Т.В.Алёнкина, Н.И.Белякова, Е.М.Кузнецова, А.К.Никифоров

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОЦЕССОВ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ ДЛЯ МАСШТАБИРОВАННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ АНТИГЕНОВ ЧУМНОГО МИКРОБА И ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

*Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Показана возможность применения ультрафильтрационных технологий при выделении холерного токсина и капсульного антигена чумного микроба в производственных условиях. Применение методов ультрафильтрации позволяет снизить потери на этапах выделения и очистки антигенных препаратов, концентрирование сырья или полуфабриката позволяет уменьшить трудозатраты, что ведет к повышению производительности и экономической эффективности.

*Ключевые слова:* ультрафильтрация, концентрирование, холерный токсин, капсульный антиген (Ф1).

I.A.Shepelev, S.A.Eremin, Yu.G.Vasin, O.A.Volokh, T.V.Alenkina, N.I.Belyakova, E.M.Kuznetsova, A.K.Nikiforov

### Prospects for Application of Ultrafiltration Technology for the Scaled Preparation of Plague Microbe and Cholera Vibrio Major Antigens

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

Demonstrated is the possibility of application of ultrafiltration technologies in the process of cholera toxin and plague agent capsular antigen precipitation under production conditions. Application of ultrafiltration techniques permits of the reduction of losses at the stages of isolation and purification of antigen preparations; and concentration of raw material or semi-finished product provides for the reduction of labor inputs. Thus it leads to the increase in productivity and economical efficiency.

*Key words:* ultrafiltration, concentration, cholera toxin, capsular antigen (F1).

Появление огромного количества новых фильтрующих материалов сделало баромембранные процессы, прежде всего метод ультрафильтрации, незаменимым в процессах биосепарации благодаря высокой производительности и малой энерго- и трудозатратности по сравнению с разделением с помощью органических растворителей, солей или дифференциальных методов центрифугирования. Ультрафильтрационная технология разделения растворов известна давно, она успешно применяется в пищевой, химической, биотехнологической и других отраслях промышленности, а также в производстве лекарственных средств [3, 9], широко используется в лабораторной практике при выделении антигенов как белковой, так и липополисахаридной природы [6, 7, 12].

Сотрудниками РосНИПЧИ «Микроб» разработана экспериментальная установка на основе ядерных ультрафильтрационных мембран для получения очищенного холерного экзотоксина [4]. Имеются данные о применении для концентрирования, диализа и диафильтрации ультрафильтрационного волоконного аппарата марки УВА-ПС-20-1040 (Россия) производительностью по дистиллированной воде 415 л/ч (предел исключения 20 кДа), при получении О-антигена холерного вибриона, что позволило повысить эффективность данного производственного этапа за счет сокращения времени на выполнение и количества расходных материалов при сохранении концентрации и биологической активности препарата [2].

В настоящее время в РосНИПЧИ «Микроб» ультрафильтрация на колонках с полыми волокнами используется при производстве химической холерной таблетированной вакцины (концентрирование культуральной жидкости холерного вибриона, диафильтрация О-антигена) и антирабического гетерологичного иммуноглобулина (диализ антирабического иммуноглобулина от этанола).

Целью наших исследований являлась оценка возможности использования ультрафильтрации на этапах выделения холерного токсина (ХТ) и капсульного антигена (Ф1) чумного микроба.

### Материалы и методы

Препарат холерного токсина получали из производственного штамма-производителя коммерческой оральной холерной химической бивалентной вакцины института «Микроб» *Vibrio cholerae* 569 В биовара Инаба О1 (ХТ+, ТСП+) классического серовара.

Культивирование штамма *V. cholerae* 569 В биовара Инаба проводили в реакторе (500 л) в производственных условиях, разработанных для холерной химической вакцины, на казеиновом бульоне, рН 7,8±0,2. Выращивание культуры в реакторе прекращали через (10,5±0,5) ч в стационарной фазе роста микробной популяции. Биомассу инактивировали формалином (0,6 %). Для выделения ХТ использовали 30 л культуральной жидкости. Безмикробный

прозрачный центрифугат, полученный на сепараторе АСГ 3М при 9000 об./мин, подвергали стерилизующей мембранной фильтрации с использованием фильтра Сальникова с 8 стерилизующими пластинами СФ и определяли специфическую стерильность. Концентрацию ХТ и О-антигена на всех этапах выделения контролировали с помощью реакций диффузной преципитации (РДП) и непрямой геммагглютинации (РНГА) с антитоксической (АХС) и холерными О-сыворотками. Активность токсина определяли биологическим методом – постановкой реакции Крейга на кроликах породы шиншилла.

Препарат Ф1 получали из штамма-продуцента живой чумной вакцины *Yersinia pestis* EV (pFra+, pCad+, pPst+) и рекомбинантного штамма *Yersinia pestis* KM277(EV11MpFSK-3) Km<sup>r</sup>. Штаммы получены из ГКПБ «Микроб». В предварительных малообъемных экспериментах нами была показана перспективность использования рекомбинантных штаммов-продуцентов Ф1 чумного микроба, в частности штамма *Y. pestis* KM 277, который отличался высоким уровнем синтеза антигена по сравнению с *Y. pestis* EV [3].

Накопление биомассы вакцинного штамма чумного микроба осуществляли в реакторе У-6 (250 л) с объемом питательной среды 125 л (Россия) на бульоне Хоттингера или казеиновом бульоне, рН 7,4. Выращивание проводили в течение 27 ч при температуре 37 °С при непрерывной аэрации и механическом перемешивании. В результате через 28 ч культивирования было получено 100 л биомассы с концентрацией 10 млрд м.к./мл, активность Ф1 составила 1/4 в РДП с чумной лошадиной агглютинирующей сывороткой. Глубинное культивирование штамма *Y. pestis* KM 277 проводили по аналогичной для вакцинного штамма схеме с модификациями. Температура выращивания в этом случае составляла 28 °С, в питательную среду на всех этапах культивирования добавляли канамицин (до 25 ед./мл). В результате через 22 ч культивирования было получено 100 л биомассы с концентрацией 35 млрд м.к./мл, активность Ф1 составила 1/128 в РДП с чумной лошадиной агглютинирующей сывороткой, 1/10<sup>6</sup> в РНГА.

Биомассу в обоих случаях инактивировали формалином (0,6 %). После определения специфической стерильности культуральную жидкость отделяли от клеточек на сепараторе АСГ 3М при 9000 об./мин, а затем фильтровали через патронный фильтр 0,22 микрон («Технофильтр», Россия).

Концентрацию белка на всех этапах получения ХТ и Ф1 определяли по методу Лоури при 750 нм с применением набора реактивов «Bio-Rad DC Protein Assay» (США).

### Результаты и обсуждение

Стандартная схема выделения холерного токсина из стерильного фильтрата культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569 В биовара Инаба включает в себя осаждение при низком значении рН в присутствии гексаметафосфата натрия (ГМФ), сепарацию и диализ в течение 24 ч, с последующей очисткой препарата ионообменной хроматографией на фосфоцеллюлозе [10, 11]. Недостатками является работа с большими объемами сырья, что значительно затрудняет и удорожает первоначальный этап осаждения ХТ.

В нашей работе было подобрано ультрафильтрационное оборудование для получения освобожденного от примесей и концентрированного сырья. В процессе выделения холерного токсина из культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569 В биовара Инаба с использованием ультрафильтрации культуральную жидкость (28,5 л), после стерилизующей фильтрации и контроля специфической стерильности, пропускали через ядерные мембраны 500 Å (вместо снятых с производства УАМ-500) по описанной ранее методике [4]. На этом этапе проходило отсечение фракции, содержащей О-антиген. Концентрирование полученного фильтрата проводили на ультрафильтрационной колонке F10HPS с полисульфоновыми волокнами («Fresenius», Германия, пропускающая способность от 0 до 20 кДа). Из полученного концентрата объемом 700 мл осаждали ХТ методом изоэлектрической преципитации в присутствии ГМФ [11] и диализовали.

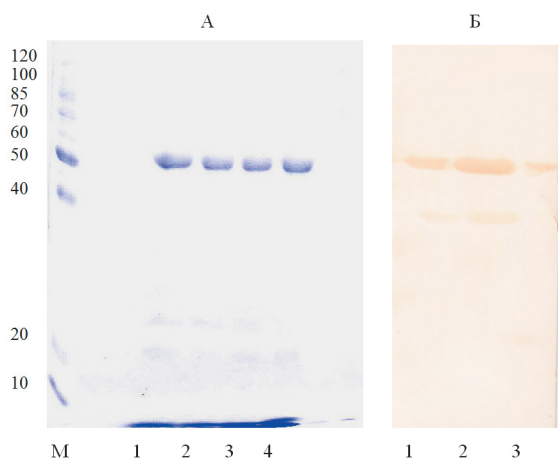
В табл. 1 представлен анализ содержания холерного токсина и О-антигена на этапах выделения

Таблица 1

Анализ содержания холерного токсина и О-антигена на этапах выделения из культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569 В биовара Инаба

Проба	РДП АХС сер 08	РДП «О» сер 42	Белок, мг/мл	РНГА АХС 0,8	РНГА «О» сер 65	Реакция Крейга
Культуральная жидкость	1/4	1/4 ±1/8	0,90	<1/10	±1/40	96000
Мембранная ультрафильтрация						
Фильтрат	1/4	–	0,14	±1/40	±1/40	64000
Концентрат	1/2	1/32	0,76	<1/10	<1/100	32000
Колоночная ультрафильтрация						
Фильтрат	–	–	0,02	–	–	–
Концентрат	1/128 ±1/256	1/4	6,9	1/640	1/160	128000
Холерный токсин жидкий	1/320 ±1/640	–	3,5	>1/1792	<1/10	128000
Холерный токсин сухой	1/320	–	3,3	1/832	–	>128000

Примечание: «–» – отрицательный результат; реакция Крейга – усредненный обратный титр.



SDS-PAGE (А) и иммуноблоттинг (Б) препаратов ХТ, полученных различными методами:

1, 4 – препарат ХТ, полученный методом ультрафильтрации, 2 – методом мембранной фильтрации, 3 – без использования фильтрационных методов, М – маркеры от 10 до 200 кДа («Fermentas», EU)

из культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569 В биовара Инаба с использованием процессов ультрафильтрации. На этапе мембранной фильтрации происходит освобождение от О-антигена. При этом большая часть токсина остается в фильтрате, что подтверждается в реакциях РДП, РНГА с АХС и в реакции Крейга. Тест на холерогенность препарата холерного токсина на кроликах-сосунках оказался положительным. Последующая колоночная ультрафильтрация на колонке F10HPS позволяет без потерь сконцентрировать продукт в 60 раз.

Анализ активности в ДОТ-ИФА с антитоксической холерной сывороткой показал, что препарат ХТ, полученный с использованием ультрафильтрации, не уступает аналогичному препарату, полученному по стандартной методике: 1,5–3,1 нг/мл (титр 1/640000–1/320000) и 28 нг/мл (1/20000) соответственно. Проведенный анализ чистоты препаратов ХТ, полученных разными методами, в SDS-PAGE (по Lemmli) и иммуноблоттинге (по Towbin) с АХС, показал идентичность всех исследуемых образцов (рисунок).

Следующим этапом работы была оценка эффективности применения ультрафильтрационных методов для выделения Ф1 чумного микроба. Данный антиген уникален для возбудителя чумы, относится к протективным и диагностически значимым анти-

генам. Выделение Ф1 из культуральной жидкости проводили осаждением в изоэлектрической точке по модифицированному методу М.М.Титенко с соавт. [5], из клеточной массы – солевой экстракцией из ацетонвысушенных клеток с последующим осаждением сульфатом аммония по методу Е.Е.Вайкер *et al.* [7]. В первом случае рН культуральной жидкости доводили до 5,0, осадок отделяли центрифугированием, рН супернатанта доводили до 7,0, а затем 3-кратно переосаждали при рН 4,1. Во втором случае клеточную массу обезвоживали холодным ацетоном, а затем проводили экстракцию капсульного антигена 2,5 % раствором хлорида натрия и осаждение его сульфатом аммония при 40 % насыщении раствора с последующим диализом.

Для модернизации получения препарата Ф1 из штамма-продуцента живой вакцины *Y. pestis* EV культуральную жидкость после сепарации (этап № 1) фильтровали через патронный фильтр 0,22 микрон («Технофильтр», Россия). Полученный фильтрат концентрировали (этап № 2) на колонке F10HPS. Осаждение препарата Ф1 из концентрата (этап № 3) проводили в изоточке. При выделении препарата Ф1 из штамма *Y. pestis* KM 277 культуральную жидкость (100 л) после сепарирования фильтровали с использованием фильтра Сальникова с 3 пластинами фильтровального картона для освобождения от клеточного дебриса с последующей фильтрацией через патронный фильтр 0,8-0,45-0,22 микрон («Технофильтр», Россия), этап № 1. Необходимость применения дополнительной очистки возникла из-за большой концентрации биомассы. Полученный фильтрат культуральной жидкости концентрировали на колонке F10HPS (этап № 2). Осаждение препарата Ф1 из концентрата проводили в изоточке (этап № 3) аналогично препарату из *Y. pestis* EV.

Использование ультрафильтрации для получения препарата Ф1 чумного микроба из культуральной жидкости позволяет без потерь сконцентрировать продукт в 40 раз (в результате из 20 л культуральной жидкости получен концентрат объемом 500 мл). При последующем осаждении получено до 200 мл полуфабриката Ф1. Активность антигена в РНГА и содержание белка контролировали на всех этапах выделения (табл. 2).

Таким образом, применение методов ультрафильтрации позволяет снизить потери на этапах выделения и очистки ХТ холерного вибриона и Ф1

Таблица 2

Содержание Ф1 на этапах выделения из культуральной жидкости (20 л) штамма-продуцента живой вакцины *Y. pestis* EV и штамма *Y. pestis* KM 277

Этап	Проба	Объем, л	<i>Y. pestis</i> EV		<i>Y. pestis</i> KM 277	
			Концентрация белка, мг/мл	РНГА	Концентрация белка, мг/мл	РНГА
1	Культуральная жидкость	20	0,9±0,05	1/10000	1,32±0,05	1/1000000
2	Фильтрат	19,5	0,02	–	0,5	1/3200
	Концентрат	0,5	2,1±0,05	1/80000	10,0±0,05	1/10 <sup>9</sup>
3	Полуфабрикат Ф1	0,2	3,5±0,05	1/160000 ± 1/320000	14,6±0,05	1/4×10 <sup>9</sup>

чумного микроба, концентрирование сырья или полуфабриката позволяет уменьшить трудозатраты, что ведет к повышению производительности и экономической эффективности.

Другие перспективные направления использования процессов ультрафильтрации на этапах производства МИБП в Рос НИПЧИ «Микроб»: получение активного компонента дрожжевого аутолизата; очистка F(ab')<sub>2</sub> фрагментов антирабических иммуноглобулинов от продуктов гидролиза; получение перспективного антигена сибиреязвенного микроба.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громова О.В., Джанаридзе М.Н., Дятлов И.А. и др. Способ получения О-антигена холерного очищенного. Патент № 2143280 РФ. Оpubл. 27.12.1999.
2. Дытнерский Ю.И. Обратный осмос и ультрафильтрация. М.: «Химия»; 1978. 352 с.
3. Еремин С.А., Волох О.А., Авдеева Н.Г. и др. Пути совершенствования производства чумной химической вакцины. В кн.: Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний. Нижний Новгород: Изд-во Нижегород. гос. ун-та им. Лобачевского; 2004. С. 317–21.
4. Строганов В.В., Космаенко О.М., Тихонов Н.Г. и др. Экспериментальное изучение ультрафильтрационной установки для получения очищенного холерного экзотоксина. В кн.: Профилактика особо опасных инф. Саратов; 1980. С. 52–9.
5. Титенко М.М., Вейнблат В.И., Веренков М.С., Васенин А.С. Препаративный метод выделения и очистки капсульного антигена возбудителя чумы при помощи изоэлектрической преципитации. В кн.: Диагн. и профилактика особо опасных инф. Саратов; 1983. С. 34–9.
6. 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.
7. Baker E.E., Sommer H. et al. Studies on immunization against plague. 1. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. J. Immunol. 1952; 68:131–45.
8. Brou A., Jaffrin M.Y., Ding L.H., Courtois J. Microfiltration and ultrafiltration of polysaccharides produced by fermentation using a rotating disk dynamic filtration system. Biotechnol. Bioeng. 2003; 82(4):429–37.

9. Harinarayan C., Skidmore K., Kao Y., Zydney A.L. et al. Small molecule clearance in ultrafiltration/diafiltration in relation to protein interaction: Study of citrate binding to a Fab. Biotechnol. Bioeng. 2009; 102(6):1718–22.

10. Mekalanos J.J., Collier R.J., Romig W.R. Purification of cholera toxin and its subunits: new methods of preparation and the use of hypertextinogenic mutants. Infect. Immun. 1978; 20:552–9.

11. Rappoport R.S., Bonde G., McCann T. et al. Development of a purified cholera toxoid. II. Preparation of a stable, antigenic toxoid by reaction of purified toxin with glutaraldehyde. Infect. Immun. 1974; 9:304–17.

12. Zydney A.L., Kuriyel R. Protein concentration and buffer exchange using ultrafiltration. In: Desai M.A., editor. Downstream Processing of Proteins: Methods and Protocols. Humana Press; 2000. P. 23–34. (Methods in Biotechnology; vol. 9). DOI: 10.1007/978-1-59259-027-8\_3.

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

1. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A. et al. [Method of obtainment of cholera O-antigen purified]. RF Patent 2143280. 26 May 1999.
2. Dytner'skiy Yu. I. [Reverse Osmosis and Ultrafiltration]. M.: "Khimiya"; 1978. 352 p.
3. Eremin S.A., Volokh O.A., Avdeeva N.G. et al. [Ways of development of cholera chemical vaccine production]. In: [New Technologies in Prophylaxis, Diagnostics, Epidemiological Surveillance and Treatment of Infectious Diseases]. Nizhnyy Novgorod: Izd. Nizh. Gos. Univer. Imeni Lobachevskogo; 2004. P. 317–21.
4. Stroganov V.V., Kosmaenko O.M., Tikhonov N.G. et al. [Experimental studies of the ultrafiltration module for the obtainment of purified cholera exotoxin]. In: [Prophylaxis of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. Saratov; 1980. P. 52–9.
5. Titenko M.M., Veynblat V.I., Verenkov M.S., Vasenin A.S. [Preparative method of isolation and purification of plague agent capsular antigen using isoelectric precipitation]. In: [Diagnostics and Prophylaxis of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. Saratov; 1983. P. 34–9.

#### Authors:

Shepelev I.A., Eremin S.A., Vasin Yu.G., Volokh O.A., Alenkina T.V., Belyakova N.I., Kuznetsova E.M., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

#### Об авторах:

Шепелёв И.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Волох О.А., Алёнкина Т.В., Белякова Н.И., Кузнецова Е.М., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 12.10.10.