

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ ПО ПРИНЦИПУ «КРОСС-ФЛОУ» ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ О-АНТИГЕНА В ПРОИЗВОДСТВЕ ХОЛЕРНОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

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

Показана возможность применения метода ультрафильтрации по принципу «кросс-флоу» для концентрирования О-антигена штамма холерного вибриона М-41 Огава из безмикробного центрифугата. Проведена оптимизация технологического процесса концентрирования. Отработаны режимы консервации и очистки ультрафильтрационной установки. Определены перспективы внедрения метода ультрафильтрации по принципу «кросс-флоу» в технологию производства холерной бивалентной химической вакцины.

Ключевые слова: вакцина холерная, О-антиген, концентрирование «кросс-флоу».

A.V.Komissarov, S.A.Eremin, Yu.A.Aleshina, Yu.G.Vasin, O.D.Klokova, N.I.Beliakova

Experimental Evaluation of Application of “Cross-Flow” Ultrafiltration Method for O Antigen Concentrating in Cholera Chemical Bivalent Vaccine Production

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov

Demonstrated is possibility to apply “cross-flow” ultrafiltration method for O antigen of *Vibrio cholerae* M-41 Ogawa concentrating from germ-free centrifugate. Technological process of concentrating was optimized. Worked out were the regimes of conservation and cleaning of the ultrafiltration device. The prospects of “cross-flow” ultrafiltration method introduction in technology of cholera chemical bivalent vaccine production were determined.

Key words: cholera vaccine, O antigen, “cross-flow” concentrating.

В связи с распространением холеры в мире в последние годы, особенно в развивающихся странах, ВОЗ рекомендует разработку и использование вакцинных препаратов орального применения. В настоящее время в Российской Федерации для вакцинации и ревакцинации населения по эпидемическим показаниям используют вакцину холерную бивалентную химическую таблетированную [1]. Отечественная химическая вакцина, состоящая из смеси холерогена-анатоксина и О-антигена холерного вибриона сероваров Инаба и Огава, не уступает по эффективности оральной химической вакцине WC-rBS, состоящей из убитых вирулентных клеток *Vibrio cholerae* O1 (классического биовара и Эль Тор; сероваров Инаба и Огава) и очищенной рекомбинантной В-субъединицы холерного токсина [2].

Одним из недостатков существующей технологии производства отечественной холерной бивалентной химической вакцины являются многоступенчатые и затратные этапы выделения нативных антигенов. Данный недостаток частично был устранен разработкой масштабируемой технологии получения компонента холерных химических вакцин – О-антигена холерного вибриона с использованием ультрафильтрационных модулей на полых волокнах УВА-ПС-20-1040 [3]. Однако в настоящее время производство модулей УВА прекращено. Из всего многообразия современных ультрафильтрационных технологий наше внимание привлек метод концентрирования антигенов ультрафильтрацией по принципу «кросс-флоу». Данный метод успешно ис-

пользовался для концентрирования антигенов, выделенных из штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* [4], протективного антигена сибиреязвенного микроба [5]. Использование мембранных модулей с разным размером пор позволяет концентрировать антигены с различной молекулярной массой. Все это определяет актуальность исследований, направленных на внедрение в производственный процесс новой технологии концентрирования антигенных компонентов холерной химической вакцины ультрафильтрацией по принципу «кросс-флоу».

Целью исследования было определение условий концентрирования ультрафильтрацией по принципу «кросс-флоу» О-АГ холерного вибриона серовара Огава из безмикробного центрифугата и оценка возможности использования этого метода в производстве холерной химической вакцины.

Материалы и методы

В работе использовали сухие фракции О-антигена и безмикробные центрифугаты, полученные при производственном выращивании штамма *V. cholerae* М-41 Огава. Серологическую активность О-антигена холерного вибриона определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) по Оухтерлони и реакции непрямой агглютинации (РНГА) с О1-сывороткой. Определение формальдегида, перекиси водорода, величины рН и мутности проводили в соответствии с методами, изложенными в нормативной докумен-

тации (Методические указания МУК 4.1/4.2.588-96, 1998). Для концентрирования О-антигена применяли установку для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-009 фирмы Владисарт, снаряженной мембранными модулями из триацетата целлюлозы с номинальной отсечкой по молекулярной массе 20 кДа, с площадью фильтрации равной 0,1 и 0,2 м².

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований определили скорость отведения фильтрата дистиллированной воды на не бывшем в эксплуатации мембранном модуле с площадью фильтрации равной 0,1 м², которая составила (16,50±0,05) дм³ в час при давлении на входе и выходе фильтрационной установки – ФУ (1,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см² соответственно.

Для оценки возможности концентрирования нативного О-антигена холерного вибриона, содержащегося в центрифугате после удаления клеточной биомассы, была выбрана следующая модель безмикробного центрифугата: 5 г сухой фракции О-антигена, полученного при производстве вакцины холерной бивалентной химической таблетированной, растворяли в 7 дм³ ферментативного казеинового гидролизата (0,2 % аминного азота, 0,5 % хлорида натрия и 0,05 % двузамещенного фосфата натрия), рН 7,6, что соответствовало содержанию О-антигена в безмикробном центрифугате, и добавляли формалин до конечной концентрации 0,2 %, что также соответствовало показателям качества безмикробного центрифугата, получаемого при производстве холерной химической вакцины. Критерием окончания процесса выбрали уменьшение объема смоделированного безмикробного центрифугата в 10 раз. Удаление примесей с молекулярной массой менее 20 кДа на первоначальном этапе проводили при давлении на входе и выходе фильтрационной установки (1,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см² соответственно. Содержание О-антигена в смоделированном безмикробном центрифугате в РИД с О1-сывороткой составляло 1:8. Процесс концентрирования прошел за 5 ч. Полученный по-

луфабрикат имел следующие показатели качества: рН (7,5±0,1), титр О-антигена в РИД с О1-сывороткой 1:64. В фильтрате О-антиген не обнаружен.

С целью интенсификации процесса мембранного концентрирования О-антигена была проведена процедура «сканирования давления», заключающаяся в выборе оптимального соотношения давления на входе и выходе фильтрационной установки. Проведенные исследования показали, что оптимальными параметрами для концентрирования О-антигена являются: давление на входе (2,5±0,1) и на выходе (0,5±0,1) кгс/см² соответственно. Установленные параметры позволили сократить время концентрирования с 5 до 3 ч, при сохранении показателей качества определенных ранее. Для определения возможной сорбции О-антигена внутри пор мембранного модуля провели его отмывку через установку путем рециркуляции дистиллированной водой объемом 0,5 дм³. В концентрате О-антиген не обнаружен, это дает основания предполагать, что О-антиген не сорбируется на мембранном модуле.

Далее было необходимо отработать процесс очистки и консервации мембранных модулей и в целом установки для хранения между производственными циклами. Для очистки мембранных модулей после завершения процесса концентрирования использовали (5,5±0,5) % раствор перекиси водорода. Установлено, что обработка установки способом рециркуляции данным раствором продолжительностью 30–40 мин, с последующей отмывкой системы дистиллированной водой объемом 5 дм³ при давлении на входе и выходе фильтрационной установки (1,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см² соответственно, не оказывает влияния на скорость отведения фильтрата и составляет по дистиллированной воде (16,50±0,05) дм³ в час. В пробах после промывки установки перекиси водорода не обнаружено. В качестве консерванта использовали (2,5±0,5) % раствор формальдегида. В ходе экспериментов установлено, что химическая обработка установки способом рециркуляции одного из указанных веществ продолжительностью (35±5) мин, с последующей отмывкой системы перед пуском в эксплуатацию дистиллиро-

Таблица 1

Характеристики концентрированных О-антигенов, полученных по экспериментальной и регламентной технологии

Показатель	Реактор № 17									Реактор № 18								
	БМЦ			концентрат			фильтрат			БМЦ			концентрат			фильтрат		
	Р	Э	Н	Р	Э	Н	Р	Э	Н	Р	Э	Н	Р	Э	Н	Р	Э	Н
Содержание О-антигена в РИД с О1-сывороткой, обратный титр	8	8	8	64	64	–	0	0	0	8	8	8	64	64	–	0	0	0
Мутность (ОД)	0,3	0,3	–	–	0,55	–	0,05	0,06	0,04±0,02	0,31	0,31	–	–	0,49	–	0,06	0,06	0,04±0,02
рН	7,26	7,26	7,0±0,3	7,3	7,23	7,0±0,3	7,2	7,26	7,0±0,3	7,3	7,3	7,0±0,3	7,3	7,22	7,0±0,3	7,1	7,2	7,0±0,3

Примечание. БМЦ – безмикробный центрифугат, Р – значение показателя, полученного по регламентной технологии, Э – значение показателя, полученного в эксперименте, Н – нормируемое значение показателя в соответствии с регламентом производства, прочерк – требования отсутствуют.

Характеристики сухих препаратов О-антигена, полученных по экспериментальной и регламентной технологии

Показатель	Реактор № 17		Реактор № 18		Н
	Р	Э	Р	Э	
Активность О-антигена в РНГА с О1-сывороткой, обратный титр	112	256	224	256	≥100
Объем диализованного препарата, мл	4320	220	4000	220	–
Вес сухого препарата, г	71	5	60	7	–

Примечание. Р – значение показателя, полученного по регламентной технологии, Э – значение показателя, полученного по экспериментальной технологии, Н – нормируемое значение показателя в соответствии с регламентом производства, прочерк – требования отсутствуют.

ванной водой объемом 5 дм³ при давлении на входе и выходе фильтрационной установки (1,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см² соответственно, является оптимальным режимом консервации мембранных модулей и в целом установки. Остаточное содержание формалина в системе составляло от 0,001 до 0,007 %.

На следующем этапе было проведено концентрирование безмикробных центрифугатов, полученных при производственном выращивании в ферментере холерного вибриона штамма *V. cholerae* М-41 Огава. Технологические режимы концентрирования соответствовали определенным при процедуре «сканирования давления». Объем безмикробного центрифугата составлял 7 дм³. Концентрирование до 0,7 дм³ прошло за 3 ч, что соответствует данным, полученным ранее при концентрировании модельного безмикробного центрифугата. Показатели качества препаратов О-антигена, определенные при проведении данного эксперимента, представлены в табл. 1. Их значения соответствуют нормируемым и не отличаются от полученных по регламентной технологии.

Далее концентрированные препараты О-антигена, полученные по традиционной и экспериментальной технологиям, были диализованы, простерилизованы и лиофильно высушены. Характеристики сухих препаратов О-антигена представлены в табл. 2, из данных которой можно сделать выводы, что значения показателей экспериментальных сухих препаратов О-антигена соответствуют нормируемым, а активность и выход (по соотношению веса сухого полуфабриката к объему диализованного препарата) превышают значения показателей препаратов О-антигена, полученных по регламентной технологии.

Известно, что концентрирование ультрафильтрацией по принципу «кросс-флоу» является линейно-масштабируемым процессом (по площади фильтрации) [6]. Использование ФУ с общей площадью фильтрации 0,2 м² позволило нам сконцентрировать безмикробный центрифугат с 7 до 0,7 дм³ за 1,5 ч, что подтвердило данные литературы. Произведен расчет необходимой площади фильтрации для концентрирования 500 дм³ безмикробного центрифугата (количество продукта, полученного за один цикл выращивания штамма продуцента О-АГ холерного вибриона на двух производственных ферментерах) в 10 раз за 6 ч. Для концентрирования указанного объема

необходима установка с площадью фильтрации 4 м².

Таким образом, определены условия концентрирования ультрафильтрацией по принципу «кросс-флоу» О-антигена холерного вибриона серовара Огава из безмикробного центрифугата и показана принципиальная возможность внедрения этого метода в промышленную технологию производства холерной бивалентной химической вакцины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медуницин Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х; 2004. 448 с.
2. 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.
3. Дятлов И.А., Нижегородцев С.А., Громова О.В. и др. Разработка ультрафильтрационной технологии получения О-антигена холерного вибриона для производства вакцин. Пробл. особо опасных инф. 2001; 2(82):133–9.
4. Егорова Н.Б., Семенов Б.Ф., Курбатова Е.А. и др. Поликомпонентная вакцина для иммунопрофилактики и иммунотерапии заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами. Патент РФ 2209081. Оpubл. 27.07.2003.
5. Шевцов А.Н., Боровский Д.В., Дармов И.В. и др. Усовершенствование технологии получения сибиреязвенного протективного антигена. Биотехнология. 2009; 6:68–71.
6. 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. Medunitsyn N.V. [Vaccinology]. M.: Triada-X; 2004. 448 p.
2. Kutuyev 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.
3. Dyatlov I.A., Nizhegorodtsev S.A., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Butov A.S., Kolova O.D., Beliakova N.I. [Development of ultrafiltration technology of cholera vibrio O antigen obtaining for vaccine production]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2001; 2(82):133–9.
4. Egorova N.B., Semenov B.F., Kurbatova E.A., Efremova V.N., Kaverina K.G., Mikhailova N.A. [Polycomponent vaccine for immunoprophylaxis and immunotherapy of diseases caused by opportunistic microorganisms] RF Patent 2209081. 27.07.2003.
5. Shevtsov A.N., Borovskii D.V., Darmov I.V. et al. [Improvement of technology of the anthrax protective antigen production]. Biotechkhologia. 2009; 6:68–71.
6. Cherkasov A.N., Pasechnik V.A. [Membranes and Sorbents in Biotechnology]. L.: Khimia; 1991. 239 p.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 03.02.10.