УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДА ПОЛИРИБОЗИЛРИБИТОЛФОСФАТА, ИСПОЛЬЗУЕМОГО В ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИН ПРОТИВ ГЕМОФИЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

А. А. Белянкин ✉, Е. Л. Салимова, А. Д. Конон, В. П. Трухин

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов, Санкт-Петербург, Россия

Производство вакцин требует постоянного усовершенствования методов и инструментов, пересмотра и модернизации существующих технологий, позволяющих получать качественный продукт для обеспечения здоровья населения. Целью работы было усовершенствование стадии получения полисахарида полирибозилрибитолфосфата (PRP) — активного компонента вакцин для профилактики гемофильной инфекции. Изучено влияние на выход PRP следующих факторов: концентрации растворенного кислорода в культуральной жидкости, способа регулирования концентрации глюкозы во время культивирования, источников белкового питания микроорганизма-продуцента, стабильности полисахарида на стадии инактивации культуральной жидкости в процессе получения полисахаридной вакцины для профилактики гемофильной инфекции. Выход PRP в культуральной жидкости увеличен на 10%, скорость накопления биомассы во время культивирования в ферментере — на 25%, время культивирования сокращено на 6,5 ч. Потери PRP на стадии инактивации культуральной жидкости сокращены на 80%. Предложен новый состав питательной среды на основе запатентованного состава, соответствующий актуальным требованиям нормативной документации.

Ключевые слова: *Haemophilus influenzae* тип b, полирибозилрибитолфосфат, питательная среда, вакцина, культивирование, пептон, гемин, протопорфирин

Вклад авторов: А. А. Белянкин — сбор информации, проведение экспериментальных работ и обработка их результатов; Е. Л. Салимова, А. Д. Конон — научное и техническое консультирование; В. П. Трухин — общее руководство.

✉ **Для корреспонденции:** Андрей Андреевич Белянкин
ул. Свободы, д. 52, г. Санкт-Петербург, 198320; a.a.belyankin@spbniivs.ru

Статья получена: 30.08.2021 **Статья принята к печати:** 15.09.2021 **Опубликована онлайн:** 17.10.2021

DOI: 10.47183/mes.2021.037

IMPROVEMENT OF THE PROCESS OF PRODUCTION OF POLYSACCHARIDE POLYRIBOSYL RIBITOL PHOSPHATE USED IN THE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* VACCINES

Belyankin AA ✉, Salimova EL, Konon AD, Trukhin VP

St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Serums and Bacterial Preparations Production Company, St. Petersburg, Russia

The production of vaccines requires constant improvement of methods and tools, revision and modernization of the current technology with the aim to improve quality of the product made for the benefit of public health. The purposяe of this work was to improve the process of production of polysaccharide polyribosyl ribitol phosphate (PRP), which is the active agent of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccines. We investigated how PRP yield depends on the following factors: concentration of dissolved oxygen in the culture liquid, glucose concentration control method applied in cultivation, source of protein for the producer microorganism, stability of the polysaccharide at the culture liquid inactivation stage. As a result, we managed to increase the PRP yield in the culture liquid by 10%, ensured a 25% boost of the biomass accumulation rate during cultivation in the fermenter and reduced the cultivation time by 6.5 hours. The PRP loss rate at the culture liquid inactivation stage was reduced by 80%. Relying on the patented composition, we invented a new composition of the nutrient medium that meets the current regulatory requirements.

Keywords: *Haemophilus influenzae* type b, polyribosyl ribitol phosphate, nutrient medium, vaccine, cultivation, peptone, hemin, protoporphyrin

Author contribution: Belyankin AA — collection of information, experimental work and processing of their results; Salimova EL, Konon AD — scientific and technical consulting; Trukhin VP — general management.

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrey A. Belyankin
Svobody, 52, St. Petersburg, 198320; a.a.belyankin@spbniivs.ru

Received: 30.08.2021 **Accepted:** 15.09.2021 **Published online:** 17.10.2021

DOI: 10.47183/mes.2021.037

Гемофильная палочка (*Haemophilus influenzae* тип b) является возбудителем тяжелых форм менингитов и пневмоний у детей. До широкого внедрения вакцинации инфекции, вызванные *Haemophilus influenzae* тип b, были причиной 8,13 млн случаев развития инвазивных заболеваний среди детей в возрасте до 5 лет и 371 тыс. случаев смерти. Внедрение вакцинации в 136 странах позволило добиться снижения смертельных случаев на 45,28% [1]. Гемофильная инфекция опасна риском осложнений (тяжелая глухота у детей в 10% случаев) [2]. Гемофильная палочка отличается высокой антибиотикорезистентностью, что усложняет лечение гемофильных инфекций с помощью антиинфекционной химиотерапии [3, 4].

Для профилактики гемофильной инфекции используют комбинированные вакцины. В России зарегистрированы три препарата (Инфанрикс Гекса, аАКДС-Геп В+ Hib, Пентаксим), при этом моновакцины для профилактики гемофильной инфекции отсутствуют. Моновакцины для профилактики гемофильной инфекции необходимы для пациентов с непереносимостью каких-либо компонентов комбинированных вакцин. В настоящие время вакцинация против гемофильной инфекции недостаточна [5], поэтому для надежного обеспечения потребности в вакцинах для профилактики гемофильной инфекции требуется отечественное производство вакцин для профилактики гемофильной инфекции с использованием современных биотехнологических разработок.

Оптимизация биотехнологического производства основана на увеличении количества получаемого продукта за одну производственную серию без потерь в его качестве, а также на сокращении времени производства получаемого продукта. Полисахарид полирибозилрибитолфосфат (PRP) как активный компонент входит в состав вакцин для профилактики опасной детской гемофильной инфекции

[6–8]. Он вызывает эффективный иммунный ответ при конъюгации с белком-носителем, относится к веществам, получаемым микробным синтезом на биотехнологическом производстве. Количество произведенного полисахарида напрямую зависит от технологии производства. Основными стадиями, влияющими на выход целевого продукта, являются ферментация, по завершении которой ожидается максимальное количество PRP, а также выделение и очистка, на которых минимизируют потери.

Решение задач, стоящих перед разработчиком лекарственных препаратов, должно опираться на требования, изложенные в нормативной документации: требования и рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [9], правила надлежащей производственной практики, а также фармакопейные статьи [10, 11]. В Государственной фармакопее РФ XIV издания впервые вышла фармакопейная статья, регламентирующая производство и контроль качества вакцины для профилактики гемофильной инфекции [11]. Качество процесса производства вакцины для профилактики гемофильной инфекции определяет основная биотехнологическая стадия — культивирование культуры-продуцента в ферментере с целью синтеза PRP. Основная задача на данной стадии — получение максимального количества полисахарида, соответствующего требованиям спецификации.

На количество и качество получаемого PRP может повлиять множество факторов: концентрация растворенного в культуральной жидкости кислорода во время культивирования; концентрация глюкозы, а также способ добавления дополнительных питательных веществ в культуральную жидкость во время культивирования; источник азотного питания и факторы роста в питательной среде; условия культивирования, инактивации культуральной жидкости на стабильность целевого продукта.

Цель данной работы — усовершенствовать технологию получения PRP за счет оптимизации стадии культивирования культуры-продуцента в ферментере.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценка количества полисахарида

Количественное содержание целевого полисахарида PRP определяли орциноловым методом определения рибоз [12]. Для количественного определения полисахарида в культуральной жидкости проводили пробоподготовку: осаждение полисахарида в культуральной жидкости раствором цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ), центрифугирование, удаление верхнего слоя и последующее растворение осадка, содержащего PRP [13, 14].

Микроорганизм-продуцент

Для производства полисахарида используют природный возбудитель гемофильной инфекции — *Haemophilus influenzae* тип b. Микроорганизм *Haemophilus influenzae* тип b — грамотрицательная коккобацилла, ауксотроф (требует наличия в среде факторов роста — гемина и никотинамидадениндинуклеотида (НАД)), факультативный анаэроб. В работе использовали штамм *Haemophilus influenzae* SPB тип b, депонированный в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ФБУН ГНЦПМБ под номером В-7884 [15].

Культивирование

Посевной материал для культивирования в лабораторном ферментере готовили следующим образом: в 150 мл синтетической жидкой питательной среды, разлитой в колбы, добавляли 1 мл предварительно размороженной культуры из криопробирки (рабочий посевной материал). Засеянную питательную среду устанавливали на шейкер-инкубатор Unimax 1010 (Heidolph; Германия) на 6 ч, контролируя температуру и число оборотов в минуту. Посевной материал проверяли по показателям «Оптическая плотность» и «Микробиологическая чистота». Посевной материал в полном объеме (150 мл) пересевали в лабораторный ферментер Biostat A (Sartorius Stedim Biotech; Германия). Культивирование проводили в лабораторном ферментере объемом 2,0 л в течение 18 ч, при непрерывной подаче кислорода и перемешивании, поддерживая pH на уровне 7,2 ± 0,2. На этапе изучения влияния концентрации кислорода в культуральной жидкости во время культивирования поддерживали концентрацию растворенного кислорода на уровне 10, 30 и 60%. Аппаратурное оформление ферментера включало в себя колбу из боросиликатного стекла (UniVessel), штатив и крышку из нержавеющей стали марки AISI 304, перемешивание культуральной жидкости обеспечивали шестилопастной двухъярусной мешалкой, стерильный сжатый воздух подавали в культуральную жидкость через барботер. Нагрев и охлаждение культуральной жидкости во время культивирования обеспечивали за счет охлаждающего теплообменника, выполненного из нержавеющей стали марки AISI 304 и нагревательной пластины, установленной на внешнюю поверхность колбы ферментера. Необходимые значения pH поддерживали с помощью автоматизированной подачи титрующих растворов: 2,0 М раствора NaOH и 1,0 М раствора HCl. Концентрацию глюкозы во время культивирования регулировали ручной подачей раствора подпитки, состоящего из раствора глюкозы и дрожжевого экстракта. Отбор проб во время культивирования осуществляли через пробоотборник, установленный в крышке ферментера.

Питательная среда

В исследованиях использовали жидкую полусинтетическую питательную среду [16], содержащую солевые растворы, источники азотного и углеродного питания, а также факторы роста. В экспериментах по изучению влияния источников азотного питания и факторов роста был

Таблица 1. Влияние аэрации на накопление биомассы *Haemophilus influenzae* тип b и синтез целевого продукта при подготовке посевного материала

Концентрация растворенного кислорода в культуральной жидкости, %	Оптическая плотность культуральной жидкости*	Концентрация ПРФ, мкг/мл*
10	3,232 ± 0,109	350 ± 23
30	4,101 ± 0,095	423 ± 27
60	5,634 ± 0,145	450 ± 21

Примечание: ПРФ — полирибозилрибитолфосфат; * — в таблице дано среднеквадратичное отклонение

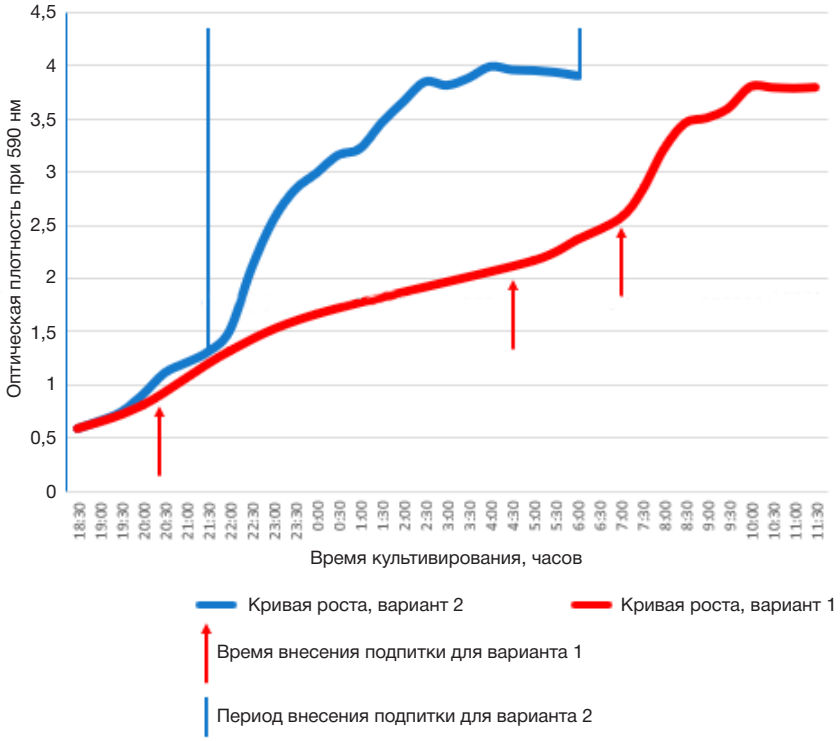

Рис. 1. Кривая роста *Haemophilus influenzae* тип b при культивировании в ферментере с разными способами регулирования концентрации глюкозы

изменен патентный компонентный состав питательной среды: пептон животного происхождения заменен на растительный (соевый) пептон (Sigma-Aldrich, P6463; Германия); свиной гемин — на протопорфирин IX.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Haemophilus influenzae тип b — факультативный анаэроб, поэтому можно влиять на его рост и биосинтез целевого продукта за счет регулирования аэрации во время культивирования. Для этого на первом этапе изучали влияние аэрации на накопление биомассы и синтез целевого продукта — полисахарида PRP. Предполагалось, что изменением концентрации кислорода в культуральной жидкости можно будет регулировать биохимические процессы микроорганизма-продуцента и стимулировать его на накопление биомассы (целевой продукт —полисахарид, являющийся внешней защитной оболочкой бактерии) или регулировать ускоренный синтез целевого продукта при нахождении продуцента в стрессовых условиях.

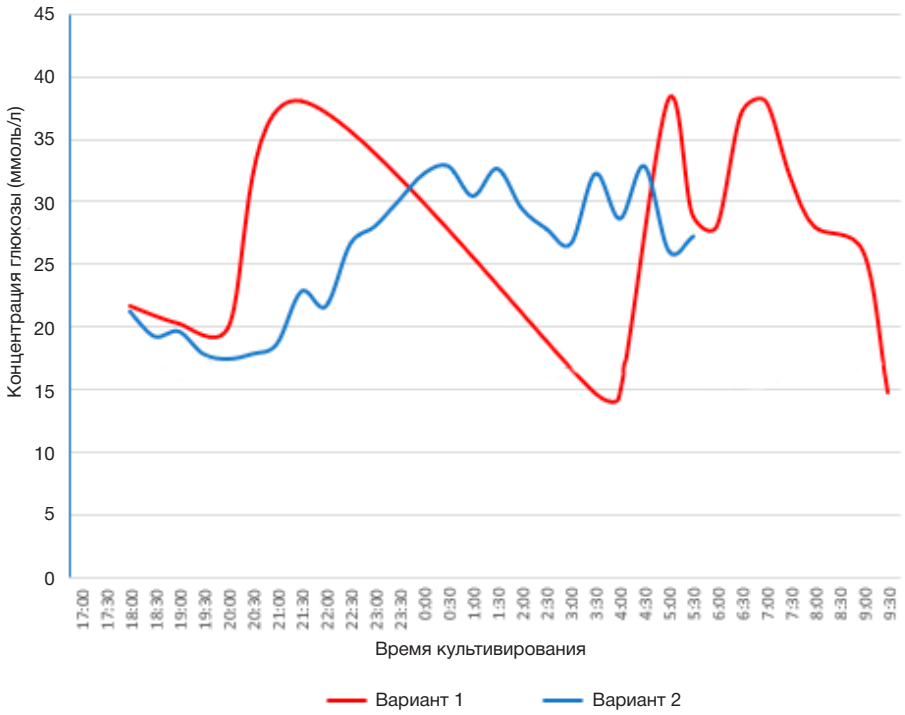

Рис. 2. Концентрация глюкозы в культуральной жидкости во время культивирования *Haemophilus influenzae* тип b в ферментере с разными способами регулирования концентрации глюкозы

Таблица 2. Результаты культивирования *Haemophilus influenzae* тип b на питательных средах, содержащих разные источники белкового азота

Пептон	ОП[1] до культивирования	ОП[1] после культивирования	Разница ОП[1]	Концентрация ПРФ, мкг/мл	Содержание ПРФ, %
Из животного сырья	0,245 ± 0,034	1,150 ± 0,097	0,905 ± 0,063	307,5 ± 5,3	100
Соевый	1,213 ± 0,085	2,092 ± 0,102	0,879 ± 0,017	288,2 ± 7,4	93

Примечание: [1] — оптическая плотность.

Насыщение культуральной жидкости кислородом осуществляли с помощью барботажа жидкости стерильным сжатым воздухом, а также перемешиванием двухъярусной шестилопастной мешалкой (аппаратурное исполнение ферментера Biostat A). Результаты экспериментальных работ по изучению влияния концентрации растворенного в культуральной жидкости кислорода во время культивирования представлены в табл. 1.

При увеличении аэрации за счет раннего начала интенсивного перемешивания и подачи стерильного сжатого воздуха с помощью барботажа (для поддержания концентрации кислорода на уровне 60%) происходит существенное увеличение накопления биомассы (в 1,3 раза), при этом синтез целевого продукта увеличивался несущественно (максимально на 10%) (см. табл. 1).

На следующем этапе изучили влияние концентрации глюкозы в культуральной жидкости на выход PRP при культивировании *Haemophilus influenzae* тип b.

В качестве подпитки для культивирования *Haemophilus influenzae* SPB тип b B-7884 использовали раствор глюкозы и дрожжевого экстракта. Глюкоза выполняет роль источника углерода, а дрожжевой экстракт — источника азота, витаминов и микроэлементов. Предполагается, что внесение большого объема подпитки, например, в начале экспоненциальной фазы, сможет существенно ускорить образование биомассы за счет высокой концентрации питательных веществ в культуральной жидкости. Регулируемое внесение подпитки на протяжении всего культивирования позволит постепенно добавлять питательные вещества в культуральную жидкость, реагируя на потребности микроорганизмов в глюкозе в текущий момент культивирования.

Для изучения влияния способа внесения подпитки сравнили два способа добавления: большими объемами на определенных этапах культивирования (по достижении определенного значения оптической плотности) (вариант 1) и малыми объемами на протяжении всего культивирования, для поддержания концентрации глюкозы в пределах 12–34 ммоль/л на протяжении всего культивирования (вариант 2). Результаты сравнения указанных способов представлены на рис. 1 и 2.

Согласно полученным результатам, используя первый способ подачи подпитки, удалось достичь оптической плотности культуральной жидкости 3,8 ± 0,2 и поддерживать ее в течение 1 ч культивирования (достижение оптической плотности до значений 3,8 ± 0,2 и продолжительное стабильное значение этого параметра свидетельствует о достижении стационарной фазы) за 16 ч. Используя второй способ подачи подпитки, при культивировании удалось быстрее добиться необходимых для достижения стационарной фазы значений оптической плотности, достигнув стационарной фазы за 12,5 ч.

На следующем этапе изучили влияние различных источников азотного питания и факторов роста на биосинтез PRP.

Фармакопейная статья, регламентирующая производство и контроль качества вакцины для профилактики гемофильной инфекции, включает требования к показателям качества PRP, рекомендации к производству PRP, в том числе к составу питательных сред, применяющихся для культивирования. Среди них — отсутствие в составе питательных сред любых продуктов животного происхождения, для исключения риска прионного заражения. В питательных средах, использующихся для культивирования *Haemophilus influenzae* тип b B-7884, содержатся некоторые продукты животного происхождения. Одним из таких компонентов является пептон (из мясного сырья), а также X-фактор роста — гемин, получаемый из животного сырья (чаще всего, свиного или говяжьего). Для соблюдения требований нормативной документации необходимо изучить влияние происхождения источников азота и факторов роста в питательной среде на рост биомассы и биосинтез целевого продукта. Вместо пептонов из животного сырья можно использовать растительные пептоны: гороховый, пшеничный, соевый и протеозопептон. Указанные пептоны могут существенно различаться по химическому составу, а так как накопление биомассы и синтез PRP *Haemophilus influenzae* тип b зависят от аминокислотного состава среды [17–19], химический состав пептонов может оказать существенное влияние на получение целевого продукта.

Важно также оценить влияние источника происхождения X-фактора в питательной среде на рост биомассы *Haemophilus influenzae* тип b и биосинтез PRP. X-фактор принимает участие в синтезе цитохрома C и других дыхательных ферментов, содержащих железо. У *Haemophilus influenzae* тип b присутствует фермент феррохелатаза, функция которого — преобразовать протопорфирин IX в гемин [20]. Следовательно, в составе питательных сред для культивирования *Haemophilus influenzae* тип b можно применять протопорфирин IX вместо гемина [20]. Изначально в качестве вещества, выполняющего роль X-фактора, использовали гемин, полученный из крови крупного рогатого скота.

Таблица 3. Результаты культивирования с использованием различных веществ X-факторов

Питательная среда	ОП[1] до культивирования	ОП[1] после культивирования	Разница ОП[1]	Содержание ПРФ, мкг/мл	Содержание ПРФ, %
Геминовая среда[2]	0,343 ± 0,024	1,649 ± 0,101	1,306 ± 0,077	307,5 ± 10,5	100
Протопорфириновая среда[3]	1,015 ± 0,092	1,757 ± 0,145	0,742 ± 0,053	300,1 ± 11,3	98

Примечание: [1] — оптическая плотность; [2] — среда патентного состава; [3] — среда патентного состава, вместо гемина содержащая протопорфирин с той же концентрацией.

Потенциально такой источник сырья может быть опасным с точки зрения прионного заражения. Для минимизации влияния риска прионного заражения используют гемин, полученный из крови свиней [21]. Однако использование сырья свиного происхождения недопустимо в ряде стран, что ограничивает импорт вакцины, поэтому замена гемина на протопорфирин может быть перспективной.

Для оценки перспективы замены пептона из животного сырья растительным пептоном провели серии экспериментов. Контрольной средой выступала питательная среда, содержащая пептон из животного сырья и дрожжевой экстракт в соответствии с патентом [16] в соотношении 15 : 2. Для питательных сред, содержащих растительный пептон, использовали то же соотношение пептона и дрожжевого экстракта. Культивирование проводили в качалочных колбах на шейкере-инкубаторе в течение 6 часов, при температуре (35 ± 2) — и при постоянном перемешивании качалочных колб со скоростью 150 об./мин. Результаты экспериментальных работ по оценке перспективы замены пептона представлены в табл. 2.

Использование питательной среды на основе соевого пептона привело к получению схожих результатов культивирования, как и при использовании пептона из животного сырья.

Далее были проведены экспериментальные работы по замене гемина (вещества X-фактора) на протопорфирин IX. Культивирование проводили в качалочных колбах на шейкере-инкубаторе в течение 6 часов, при температуре (35 ± 2) — и при постоянном перемешивании качалочных колб со скоростью 150 об./мин.

Результаты влияния источника X-фактора роста на рост биомассы приведены в табл. 3.

Использование питательной среды с протопорфирином IX в качестве X-фактора дало похожие результаты культивирования, как и в случае с использованием гемина (патентная среда).

По результатам экспериментальных работ был предложен новый состав питательной среды, соответствующий рекомендациям нормативной документации: изменен источник азотного питания и источник X-фактора роста. Результаты сравнения двух питательных сред представлены в табл. 4.

Результаты проведенного эксперимента показали незначительное (на 8%) снижение продуктивности *Haemophilus influenzae* тип b в питательной среде без компонентов животного происхождения.

Далее определяли возможность уменьшения потерь PRP на стадии инактивации культуральной жидкости.

За стадией ферментации, для выделения целевого продукта, следуют стадии очистки. В зависимости от характера взаимодействий с очищаемым продуктом, например, химическим (осаждение, экстракция) и механическим (фильтрация), неизбежно следуют потери целевого продукта без возможности их восполнения, так как стадия биологических превращений (биосинтез) уже завершена. Требования, предъявляемые к продуктам, полученным с использованием патогенных микроорганизмов, регулируют полное отсутствие живых патогенных микроорганизмов в готовом продукте. Для устранения риска наличия живых микроорганизмов производители вакцин чаще всего используют метод инактивации, полностью убивая в культуральной жидкости все живые микроорганизмы после культивирования. Инактивация, независимо от способа выполнения (химически или термически), неизбежно связана с потерями целевого продукта. Так, во время инактивации при воздействии высоких температур PRP может деполимеризоваться и разрушаться. Известно, что полисахарид PRP стабильнее в кислой среде (pH 6,5 и ниже), где его деполимеризация, согласно математической модели, практически отсутствует [22].

После завершения процесса культивирования в ферментере pH культуральной жидкости был снижен до 6,5 с помощью подачи титрующих агентов. Затем культуральную жидкость передали на стадию инактивации. В качестве контроля использовали данные культивирования без изменения pH до его завершения (pH 7,2 ± 0,2). Полученные результаты представлены в табл. 5.

За счет снижения pH при инактивации потери на этой стадии были уменьшены на 80%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение влияния концентрации растворенного в культуральной жидкости кислорода во время культивирования

Как демонстрируют проведенные эксперименты (см. табл. 1), зависимость накопления биомассы и синтеза PRP может быть связана с тем, что культура *Haemophilus influenzae* SPB тип b B-7884 активно потребляет кислород для окисления питательных веществ, использующихся в процессах анаболизма для образования новых клеток, и синтез целевого продукта замедляется. Кроме того, увеличившееся количество биомассы может повлиять на параметры последующих стадий выделения и очистки, существенно их затруднив из-за возросшей нагрузки на оборудование и материалы, что повысит потери целевого продукта на этих стадиях.

Уменьшение концентрации растворенного в культуральной жидкости кислорода до 30% привело к снижению накопления биомассы на 27% и незначительному уменьшению синтеза целевого продукта (до 6%), что позволило получить достаточное количество PRP, выделить его и очистить. Снижение концентрации растворенного в культуральной жидкости кислорода до 10% привело к значительному снижению уровня как биомассы, так и полисахарида PRP.

Таблица 4. Сравнение двух питательных сред для культивирования *Haemophilus influenzae* тип b по продуктивности и накоплению биомассы

Питательная среда	Оптическая плотность до культивирования	Оптическая плотность после культивирования	Прирост оптической плотности	Содержание ПРФ, мкг/мл	Содержание ПРФ, %
Патентного состава	0,352 ± 0,023	1,767 ± 0,125	1,41 ± 0,102	448,5	100%
Без компонентов животного происхождения[1]	3,064 ± 0,164	4,456 ± 0,312	1,39 ± 0,148	427,2	92,25%

Примечание: [1] — среда патентного состава, с заменой мясного пептона на соевый, и свиного гемина на протопорфирин IX.

Таблица 5. Изучение влияния pH культуральной жидкости при проведении инактивации

pH при инактивации	ПРФ до инактивации, мкг/мл	ПРФ после инактивации, мкг/мл	Потери ПРФ при инактивации
7,2 ± 0,2	405,6 ± 12,6	305,2 ± 10,3	100,4 ± 11,3 мкг/мл
6,5 ± 0,1	407,4 ± 14,1	388,6 ± 9,4	18,8 ± 12,7 мкг/мл

Полученные результаты о влиянии концентрации кислорода в культуральной жидкости во время культивирования возможно использовать для оптимизации процесса получения производственной культуры, для обеспечения максимально возможного выхода полисахарида PRP при наименьших усложнениях дальнейших стадий выделения и очистки, спровоцированных увеличением количества биомассы.

Изучение влияния концентрации глюкозы в культуральной жидкости на выход PRP при культивировании *Haemophilus influenzae* тип b

Быстрое достижение стационарной фазы при втором способе подачи подпитки (см. рис. 1) связано с поддержанием определенной концентрации глюкозы в культуральной жидкости (см. рис. 2). При внесении большого количества подпитки в культуральную жидкость (вариант 1) происходит резкое увеличение концентрации глюкозы, что может ингибировать рост культуры. При поддержании постоянного уровня глюкозы (вариант 2) резкого увеличения концентрации глюкозы и, следовательно, ингибирования роста культуры можно избежать. Выход PRP после культивирования при использовании варианта 1 составил 403,2 мкг/мл, при использовании варианта 2 — 443,5 мкг/мл. Полученные результаты позволят оптимизировать стратегию подачи глюкозы во время культивирования.

Изучение влияния различных источников азотного питания и факторов роста на биосинтез PRP

Исходя из результатов экспериментов (табл. 2–4), замена компонентов животного происхождения на растительные в питательной среде для культивирования *Haemophilus influenzae* тип b привела к несущественному (менее 9 %) снижению количества получаемого полисахарида PRP. Несмотря на это, показана принципиальная возможность замены некоторых составляющих питательной среды на компоненты неживотного происхождения, что позволит производству вакцин для профилактики гемофильной инфекции соответствовать последним требованиям нормативной документации.

Изучение способа уменьшения потерь PRP на стадии инактивации культуральной жидкости

На основании полученных результатов экспериментальных работ (см. табл. 5), возможно предложить способ снижения потерь PRP на стадии инактивации за счет уменьшения pH культуральной жидкости до 6,5 ± 0,1 после завершения культивирования. Но, несмотря на это, необходимо отметить, что непосредственно проводить культивирование при таких значениях pH нецелесообразно, так как накопление полисахарида в таких условиях происходит медленнее [23].

ВЫВОДЫ

В ходе работы предложено несколько способов оптимизации процесса получения полисахарида PRP при культивировании *Haemophilus influenzae* SPB тип b B-7884. Результаты позволяют оптимизировать получение полисахарида PRP в соответствии с последними требованиями нормативной документации. Выход PRP в культуральной жидкости увеличен на 10%. Скорость накопления биомассы при культивировании в ферментере увеличена на 25%, время культивирования сокращено на 6,5 ч. Потери PRP на стадии инактивации культуральной жидкости сокращены на 80%. Предложен состав новой питательной среды, соответствующей последним требованиям нормативной документации. Результаты, полученные в этом исследовании, позволят усовершенствовать технологический процесс получения полисахарида PRP, активного компонента вакцин против гемофильной инфекции.

Литература

1. Баранов А. А. и др. Вакцинопрофилактика гемофильной инфекции типа b. М., 2020; 33 с.
2. Лобзин Ю. В. Управляемые и социально значимые инфекции: проблемы и пути решения. Бюллетень медицинской науки. 2019; 3 (15): 39–43.
3. Сивая О. В., Козлов Р. С., Кречикова О. И., Иванчик Н. В., Катосова Л. К., Гудкова Л. В. Антибиотикорезистентность Haemophilus influenzae в России: результаты многоцентрового проспективного исследования ПеГАС. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014; (1): 57–69.
4. Страчунский Л. С., Белоусов Ю. Б., Козлов С. Н., редакторы. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Смоленск, 2007; 464 с.
5. Королева И. С., Королева М. А., Мельникова А. А. Эпидемиология гнойных бактериальных менингитов в период вакцинопрофилактики пневмококковой и гемофильной инфекций в Российской Федерации. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2017; (6): 63–8.
6. Федосеенко М. В., Галицкая М. Г., Намазова Л. С. Эпоха конъюгированных вакцин: международный опыт успешного применения. Педиатрическая фармакология. 2008; 6: 6–14.
7. Granoff D. Haemophilus influenzae type b polysaccharide vaccines. The Journal of Pediatrics. 1985; 107 (3): 330–6.
8. Weekly epidemiological record. Haemophilus influenzae type b (Hib) Vaccination Position Paper — September 2013. 2013; 88 (39): 413–28.
9. World Health Organization Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series. 2000; 897: 27–60.
10. European Pharmacopoeia 8.0. Council of Europe, Strasbourg, 2014. V. 1; 1380 p.
11. Вакцина гемофильная тип b конъюгированная, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 4. ФС.3.3.1.0055.18. Доступно по ссылке: http://femb.ru/femb/

pharmacopea.php (дата обращения: 16.02.2020).
12. ОФС.1.2.3.0019.15. Определение сахаров спектрофотометрическим методом. Федеральная электронная медицинская библиотека. Доступно по ссылке: http://www.femb.ru/feml (дата обращения: 31.04.2020).
13. Riza A. Isolation and purification of capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type b (Hib) by hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) precipitation and chromatography. In: Riza A, Nurainy N, editors. Proceed Intern Semin Chemist. 2008: 294–6.
14. Конон А. Д. и др. Оптимизация методики определения концентрации полирибозилрибитолфосфата в процессе производства субстанции для полисахаридных вакцин. Инновации в здоровье нации. 2017: 194–8.
15. Трухин В. П., Салимова Е. Л., Конон А. Д., авторы; Штамм Haemophilus influenzae SPB тип в – высокоактивный продуцент капсульного полисахарида полирибозилрибитолфосфата. Патент РФ № 2624014. 06.30.2017.
16. Трухин В. П., Салимова Е. Л., Конон А. Д., авторы; Способ получения вакцины гемофильной тип b конъюгированной. Патент РФ №: 2704452. 28.10.2019.
17. Орлова О. Е., Ястребова Н. Е., Елкина С. И. Специфические характеристики состава питательной среды для культивирования Haemophilis influenzae тип b с точки зрения бактериального метаболизма. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2001; 3: 111–7.
18. Esmaily F, Aminian M, Tavangar AR, Hadi A, editors. Comparison of bacterial biomass and PRP production between different isolates of Haemophilus influenzae type b (Hib) under different culture conditionsю. Archives of Razi Institute. 2011; 66: 43–49.
19. Орлова О. Е. и др. Культивирование Haemophilus influenzae, серотипа В, в амино-пептидной полусинтетической питательной среде. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2001; 3: 56–8.
20. Loeb MR. Ferrochelatase activity and protoporphyrin IX utilization in Haemophilus influenza. Journal of bacteriology. 1995; 177 (12): 3613–15.
21. Beri S, Gandhi D, Sharma P, Gundpatil D, Goel S, Gairola S. Comparability studies of hemin from two different origins porcine and bovine in the production of Haemophilus influenzae type b (Hib) polysaccharide. Biologicals. 2020; 67: 38–41. DOI: 10.1016/j.biologicals.2020.07.006. PMID: 32768281.
22. de Oliveira Cintra F, Takagi M. Study of the chemical stability of the capsular polysaccharide produced by Haemophilus influenzae type b. Carbohydrate polymers. 2015; 116: 167–72.
23. Орлова О. Е. и др. Динамика роста Haemophilus influenzae серотипа В и синтез капсульного полисахарида в процессе культивирования в синтетической питательной среде. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2001; 2: 75.

References

1. Baranov AA, i dr. Vakcinoprofilaktika gemofil'noj infekcii tipa b. M., 2020; 33 s. Russuan.
2. Lobzin YuV. Upravljaemye i social'no znachimye infekcii: problemy i puti reshenija. Bjulleten' medicinskoj nauki. 2019; 3 (15): 39–43.
3. Sivaja OV, Kozlov RS, Krechikova OI, Ivanchik NV, Katosova LK, Gudkova LV. Antibiotikorezistentnost' Haemophilus influenzae v Rossii: rezul'taty mnogocentrovogo prospektivnogo issledovanija PeGAS. Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. 2014; (1): 57–69. Russuan.
4. Strachunskij LS, Belousov YuB, Kozlov SN, redaktory. Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfekcionnoj himioterapii. Smolensk, 2007; 464 s. Russuan.
5. Koroleva IS, Koroleva MA, Melnikova AA. Jepidemiologija gnojnyh bakterial'nyh meningitov v period vakcinoprofilaktiki pnevmokokkovoj i gemofil'noj infekcij v Rossijskoj Federacii. Jepidemiologija i infekcionnye bolezni. Aktual'nye voprosy. 2017; (6): 63–8. Russuan.
6. Fedoseenko MV, Galickaya MG, Namazova LS. Jepoha kon"jugirovannyh vakcin: mezhdunarodnyj opyt uspeshnogo primenenija. Pediatricheskaja farmakologija. 2008; 6: 6–14. Russuan.
7. Granoff D. Haemophilus influenzae type b polysaccharide vaccines. The Journal of Pediatrics. 1985; 107 (3): 330–6.
8. Weekly epidemiological record. Haemophilus influenzae type b (Hib) Vaccination Position Paper — September 2013. 2013; 88 (39): 413–28.
9. World Health Organization Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series. 2000; 897: 27–60.
10. European Pharmacopoeia 8.0. Council of Europe, Strasbourg, 2014. V. 1; 1380 p.
11. Vakcina gemofil'naja tip b kon"jugirovannaja, liofilizat dlja prigotovlenija rastvora dlja vnutrimyshechnogo vvedenija. Gosudarstvennaja farmakopeja RF XIV izd. Tom 4. FS.3.3.1.0055.18. Dostupno po ssylke: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (data obrashhenija: 16.02.2020). Russuan.
12. OFS.1.2.3.0019.15. Opredelenie saharov spektrofotometricheskim metodom. Federal'naja jelektronnaja medicinskaja biblioteka. Dostupno po ssylke: http://www.femb.ru/feml (data obrashhenija: 31.04.2020). Russuan.
13. Riza A. Isolation and purification of capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type b (Hib) by hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) precipitation and chromatography. In: Riza A, Nurainy N, editors. Proceed Intern Semin Chemist. 2008: 294–6.
14. Konon A. D. i dr. Optimizacija metodiki opredelenija koncentracii poliribozilribitolfosfata v processe proizvodstva substancii dlja polisaharidnyh vakcin. Innovacii v zdorov'e nacii. 2017: 194–8. Russuan.
15. Truhin VP, Salimova EL, Konon AD, avtory; Shtamm Haemophilus influenzae SPB tip v — vysokoaktivnyj producent kapsul'nogo polisaharida poliribozilribitolfosfata. Patent RF # 2624014. 06.30.2017. Russuan.
16. Truhin VP, Salimova EL, Konon AD, avtory; Sposob poluchenija vakciny gemofil'noj tip b kon"jugirovannoj. Patent RF #: 2704452. 28.10.2019. Russuan.
17. Orlova OE, Yastrebova NE, Elkina SI. Specificheskie harakteristiki sostava pitatel'noj sredy dlja kul'tivirovanija Haemophilis influenzae tip b s tochki zrenija bakterial'nogo metabolizma. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2001; 3: 111–7. Russuan.
18. Esmaily F, Aminian M, Tavangar AR, Hadi A, editors. Comparison of bacterial biomass and PRP production between different isolates of Haemophilus influenzae type b (Hib) under different culture conditionsю. Archives of Razi Institute. 2011; 66: 43–49.
19. Orlova OE, i dr. Kul'tivirovanie Haemophilus influenzae, serotipa B, v amino-peptidnoj polusinteticheskoj pitatel'noj srede. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2001; 3: 56–8. Russuan.
20. Loeb MR. Ferrochelatase activity and protoporphyrin IX utilization in Haemophilus influenza. Journal of bacteriology. 1995; 177 (12): 3613–15.
21. Beri S, Gandhi D, Sharma P, Gundpatil D, Goel S, Gairola S. Comparability studies of hemin from two different origins porcine and bovine in the production of Haemophilus influenzae type b (Hib) polysaccharide. Biologicals. 2020; 67: 38–41. DOI: 10.1016/j.biologicals.2020.07.006. PMID: 32768281.
22. de Oliveira Cintra F, Takagi M. Study of the chemical stability of the capsular polysaccharide produced by Haemophilus influenzae type b. Carbohydrate polymers. 2015; 116: 167–72.
23. Orlova OE, i dr. Dinamika rosta Haemophilus influenzae serotipa B i sintez kapsul'nogo polisaharida v processe kul'tivirovanija v sinteticheskoj pitatel'noj srede. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2001; 2: 75. Russuan.