

УДК 57.088.3

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИРИБОЗИЛРИБИТОЛФОСФАТА В КАЧЕСТВЕ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИН

Е.Л. Салимова, А.Д. Конон, В.П. Трухин, И.В. Красильников

Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов»

Федерального медико-биологического агентства,

198320, Россия, Санкт-Петербург, г. Красное Село, ул. Свободы, д. 52

E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

Несмотря на мировую практику, в Российской Федерации иммунизация против гемофильной инфекции проводится только у детей из групп риска, что может быть связано с отсутствием производства данной вакцины в РФ. Поэтому разработка технологии получения полиривозилрибифосфата (ПРФ, действующее вещество Hib-вакцины) остается актуальной. Ранее сотрудниками ФГУП СПБНИИВС ФМБА России был выделен и идентифицирован штамм *Haemophilus influenzae* SPB тип b B-7884, подобраны условия его культивирования и первичного выделения ПРФ из культуральной жидкости. Цель работы – изучение возможности исключения стадии центрифугирования для отделения биомассы *H. influenzae* SPB тип b B-7884 перед осветлением на каскаде фильтровальных дисков, а также разработка последующих этапов выделения ПРФ из полученного промежуточного продукта. **Материалы и методы.** Выделение ПРФ из инактивированной культуральной жидкости штамма B-7884 проводили при помощи центрифугирования, фильтрации, осаждения, гомогенизации, экстракции при различных условиях. Концентрацию ПРФ в промежуточных продуктах определяли орцинововым методом, подлинность – при помощи реакции латекс-агглютинации. **Результаты и обсуждение.** Подобрана оптимальная схема выделения и очистки активной фармацевтической субстанции ПРФ, включающая фильтрацию через каскад глубинных фильтров Zeta plus LP 60 (0,3–0,6 мкм) и Zeta plus LP 90 (0,1–0,3 мкм), концентрирование и диафильтрацию на ультрафильтрационных кассетах с номинальным отсечением по молекулярной массе 30 кДа, осаждение 10% раствором цетилтрииметиламмония бромида (5% по объему) с последующей гомогенизацией полученного осадка (в присутствии 12,5% этанола от объема концентраты) и экстракцией (32,5% этанола), фильтрацию через глубинные фильтры Zeta Plus SP 30 и угольные фильтры Zeta Plus Carbon R53, а также осаждение 1,0% (по объему) 4,0 M раствором натрия хлорида и заморозку при $-(20\pm2)^\circ\text{C}$. **Заключение.** Полученные результаты станут основой для дальнейшей наработки субстанции полисахарида и позволят приступить к следующему этапу разработки технологии вакцины против *Haemophilus influenzae* тип b – конъюгации с белком-носителем.

Ключевые слова: *Haemophilus influenzae* тип b, активная фармацевтическая субстанция, полиривозилрибифосфат, цетилтрииметиламмония бромид, глубинная фильтрация, концентрирование и диафильтрация

Для цитирования:

Салимова Е.Л., Конон А.Д.,
Трухин В.П., Красильников И.В.
**ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИРИБОЗИЛРИБИТОЛФОСФАТА В КАЧЕСТВЕ АКТИВНОЙ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ДЛЯ
ПРОИЗВОДСТВА ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИН.**
Фармация и фармакология. 2018;6(1):47-62.
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-1-47-62
© Салимова Е.Л., Конон А.Д.,
Трухин В.П., Красильников И.В., 2018

For citation:

Salimova E.L., Konon A.D., Truhin V.P., Krasilnikov I.V.
**TECHNOLOGY OF OBTAINING
POLYRIBOSYL-RIBITOL PHOSPHATE AS
AN ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT
FOR THE PRODUCTION OF POLYSACCHARIDE
VACCINES.**
Pharmacy & Pharmacology. 2018;6(1):47-62. (In Russ.)
DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-1-47-62

TECHNOLOGY OF OBTAINING POLYRIBOSYLРИBITOL PHOSPHATE AS AN ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT FOR THE PRODUCTION OF POLYSACCHARIDE VACCINES

E.L. Salimova, A.D. Konon, V.P. Truhin, I.V. Krasilnikov

*The federal state unitary enterprise "Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations" of Federal medical and biologic agency
52, Svoboda Str., Krasnoe Selo, St.-Petersburg, Russia, 198320
E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru*

*Despite the world practice, in the Russian Federation immunization against hemophilic infection is carried out only for the children from risk groups, which may be due to the lack of production of this vaccine in the Russian Federation. Therefore, the development of technology for the preparation of polyribosylribitol phosphate (PRP, the active substance of the Hib vaccine) remains relevant. Earlier, the employees of the federal state unitary enterprise "Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations" of Federal medical and biologic agency of Russia isolated and identified the strain of *Haemophilus influenzae* SPB type b B-7884. The conditions for cultivation of the strain B-7884 and primary isolation of PRP from the culture liquid were arranged. The aim of the work was to study the possibility of excluding the centrifugation stage for separating *H. influenzae* SPB type b B-7884 biomass before clarification on the cascade of filter discs, and the development of subsequent stages of PRP isolation from the obtained intermediate product. Materials and methods. PRP isolation from an inactivated culture liquid of strain B-7884 was carried out by centrifugation, filtration, precipitation, homogenization, extraction under various conditions. The concentration of PRP in the intermediate products was determined by the orcinol method, the identity was determined by the latex agglutination test. Results and discussion. The optimal scheme for isolation and purification of the active pharmaceutical ingredient PRP, including filtration through the cascade of deep filters Zeta plus LP 60 (0.3–0.6 μm) and Zeta plus LP 90 (0.1–0.3 μm), concentration and diafiltration on ultrafiltration cassettes with nominal molecular weight cut-off of 30 kDa, precipitation with 10% cetyltrimethylammonium bromide solution (5% v/v), with subsequent homogenization of the obtained precipitate (in the presence of 12.5% of ethanol from the concentrate volume) and extraction (32.5% ethanol), filtration through depth filters Zeta Plus SP 30 and carbon filters Zeta Plus Carbon R53, and precipitation by 1.0% (v/v) 4.0 M sodium chloride solution and freezing at $-(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, was developed. Conclusion. The obtained results will become the basis for the further development of the polysaccharide substance and allow us to proceed to the next stage in the development of the vaccine against *Haemophilus influenzae* type b – conjugation with the carrier protein.*

Keywords: *Haemophilus influenzae* type b, active pharmaceutical ingredient, polyribosylribitol phosphate, cetyltrimethylammonium bromide, deep filtration, concentration and diafiltration

ВВЕДЕНИЕ. По данным Всемирной организации здравоохранения на сегодняшний день около 190 стран в мире включили в национальные календари вакцинацию против гемофильной палочки (*Haemophilus influenzae* тип b, *Hib*), которая вызывает тяжелые формы пневмонии и менингита у детей в возрасте до 5 лет [1–7].

В Российской Федерации вакцинация против *Hib* является необязательной [8–10]. Важным фактором, сдерживающим повсеместное внедрение Хиб-вакцины, является отсутствие локального крупномасштабного производства данного препарата на территории РФ. Поэтому разработка и усовершенствование технологии производства субстанции полирибозилрибитолфосфата (ПРФ) – капсульного полисахарида бактерии *H. influenzae* тип b и действующего вещества вакцины – особо актуальна.

Ранее сотрудниками ФГУП СПБНИИВС ФМБА России был выделен и идентифицирован штамм *H. influenzae* SPB тип b, депонированный в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ФБУН ГНЦПМБ под номером B-7884 [11, 12]. Подобраны условия синтеза капсул-

ного полисахарида ПРФ штаммом B-7884 [13], а также проведены предварительные работы по подбору оптимальной системы фильтрации для осветления промежуточного продукта в процессе выделения ПРФ [14].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ – изучение возможности исключения стадии центрифугирования для отделения биомассы *H. influenzae* SPB тип b B-7884 перед осветлением на каскаде фильтровальных дисков, а также разработка последующих этапов выделения ПРФ из полученного промежуточного продукта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Культивирование *H. influenzae* SPB тип b B-7884 проводили в полу-синтетической жидкой питательной среде [12, 13] в колбах на шейкер-инкубаторе CERTOMAT IS (производитель «Sartorius») при температуре $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$ и (150 ± 10) об/мин на протяжении 15–17 ч до получения культуры жидкой с оптической плотностью при длине волны 590 нм не менее 1,2. В качестве посевного материала использовали культуру *H. influenzae* SPB тип b B-7884, выращенную на питательной среде аналогичного состава до середины экспоненциальной фазы роста. Объем вносимого

посевного материала – 10% (по объему). Для инактивации полученную культуральную жидкость в колбах подвергали нагреванию до $(55\pm5)^\circ\text{C}$ и выдерживали (15 ± 3) минут без перемешивания на водяной бане (производитель «GFL»). После инактивации устанавливали температуру на уровне $(8\pm2)^\circ\text{C}$. Контроль процесса инактивации проводили путем прямого посева на селективную питательную среду и инкубации в присутствии 5% CO_2 при температуре $(35\pm2)^\circ\text{C}$ (в CO_2 -инкубаторе Sanyo MCO-15AC) на протяжении 48 ч. По истечению времени инкубации на чашках должны отсутствовать колонии, характерные для *H. influenzae* тип b. Часть полученной инактивированной культуры направляли на центрифугирование при (4500 ± 200) об/мин и температуре $(5\pm3)^\circ\text{C}$ (центрифуга Beckman coulter Avanti J-E) для отделения биомассы с последующей фильтрацией через каскад фильтровальных дисков Zeta plus LP 60 ($0,3\text{--}0,6$ мкм, производитель «3M Purification») и Zeta plus LP 90 ($0,1\text{--}0,3$ мкм, производитель «3M Purification») с помощью насоса «Watson-Marlow 323E». В некоторых вариантах фильтрацию через каскад фильтров проводили сразу после инактивации культуры.

Полученный промежуточный продукт подвергали концентрированию (в 10 раз) и диафильтрации (разбавление водой для инъекций в соотношении 1:1 с последующим концентрированием до первоначального объема) на установке тангенциальной ультрафильтрации Vivaflow 200 (производитель «Sartorius») с名义альным отсечением по молекулярной массе 30 и 100 кДа (в зависимости от варианта). Полисахарид из концентрата выделяли путем осаждения 10% раствором цетилtrimетиламмония бромида (ЦТАБ) в количестве 5% (по объему). Добавление раствора ЦТАБ проводили при постоянном перемешивании при (150 ± 50) об/мин на магнитной мешалке ES-6120 с подогревом (производитель «Экохим») при температуре $(5\pm3)^\circ\text{C}$, далее смесь оставляли при температуре $(5\pm3)^\circ\text{C}$ на 12–16 часов до выпадения осадка. Полученный осадок ПРФ собирали центрифугированием в течение 30 минут при скорости вращения ротора (4500 ± 200) об/мин и температуре $(5\pm3)^\circ\text{C}$. Из центрифужных стаканов осадок извлекали в емкость для гомогенизации с помощью металлической лопаточки (шпатель). Центрифужные стаканы ополаскивали охлажденным этиловым спиртом концентрации не менее 96% и сливали в емкость для гомогенизации с осадком. Общее добавленное количество спирта этилового составляло 7,5–20,0% от объема концентрата, полученного на этапе концентрирования и диафильтрации. Далее осадок гомогенизовали при помощи гомогенизатора RW 16 basic (производитель «IKA») при скорости вращения лопасти прибора (6000 ± 500) об/мин при $(5\pm3)^\circ\text{C}$ до полного его растворения. Экстракцию ПРФ проводили спиртом этиловым с концентрацией не менее 96%. Общее добавленное количество спирта этилового составило 25,0–40,0% от объема промежуточного продукта, полученного на этапе концентрирования и диафильтрации. После до-

бавления рассчитанного объема спирта этилового полученную смесь в течение (13 ± 1) ч перемешивали на магнитной мешалке при вращении магнитного элемента со скоростью (275 ± 25) об/мин при комнатной температуре. После окончания экстракции приступали к отделению осадка центрифугированием при скорости вращения ротора (4500 ± 200) об/мин при температуре $(5\pm3)^\circ\text{C}$ в течение 0,5–1,0 ч. Полученный супернатант фильтровали через глубинные фильтры Zeta Plus SP 30 (производитель «3M Purification») и угольные фильтры Zeta Plus Carbon R53 (производитель «3M Purification») и Seitz AKS2 (производитель «Pall»), после чего определяли оптическую плотность полученного фильтрата (при длине волны 275 нм). К полученному фильтрату добавляли 0,5–5,0% (по объему) 4,0 М раствора натрия хлорида, содержащимое бутыли осторожно встряхивали вручную и оставляли при температуре $(5\pm3)^\circ\text{C}$ на (13 ± 1) час в холодной комнате. Осадок отделяли центрифугированием в течение 30 минут при скорости вращения ротора (4500 ± 200) об/мин и температуре $(5\pm3)^\circ\text{C}$. Супернатант сливал, осадок собирали в стеклянные флаконы и замораживали в низкотемпературном ходильнике UF V 500 (производитель «Binder») при температуре $-(20\pm2)^\circ\text{C}$.

Определение концентрации рибозы и полирибозилрибитолфосфата в промежуточных продуктах проводили орциноловым методом, как описано ранее [15]. Оптическую плотность в промежуточных продуктах определяли спектрофотометрически при длине волны 275 и 590 нм (спектрофотометр HITACHI U-2900).

Подтверждение подлинности полученного ПРФ проводили при помощи латекс-агглютинации с использованием коммерческого набора WellcogenTM *H. influenzae* b ZL21/R30858801. Реакцию проводили согласно руководству по эксплуатации реагента.

Для реализации метрологического обеспечения научно-исследовательской работы использовали измерительное оборудование и приборы с действующими сертификатами поверки.

Все измерения проводили минимум в трех повторностях. Статистическую обработку результатов проводили согласно ГФ XIII ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». Расчет граничных значений доверительного интервала проводили по критерию Стьюдента (уровень значимости $p=0,05$) в программе Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для оценки возможности исключения стадии центрифугирования при отделении биомассы из инактивированной культуральной жидкости *H. influenzae* SPB тип b B-7884 определяли концентрацию ПРФ в промежуточных продуктах до центрифугирования и/или глубинной фильтрации и после.

Показано, что потери по количественному содержанию полисахарида после фильтрации через каскад фильтров без стадии центрифугирования практически не отличались от таковых с предварительным

осаждением бактериальной массы (табл. 1). Отметим, что оптическая плотность супернатанта и фильтрата отличалась незначительно и была в пределах 0,2–0,4, что свидетельствует об эффективном удалении биомассы глубинной фильтрацией на картонных фильтрах даже без стадии предварительного центрифугирования. Возможность исключения стадии центрифугирования для отделения биомассы можно объяснить тем, что для фильтрации используется каскад фильтров с размером пор 0,3–0,6 мкм и 0,1–0,3 мкм

(номинальный стерилизующий фильтр), полностью обеспечивающий задержку бактериальной массы. Кроме того, чуть более низкие значения оптической плотности могут быть связаны с осветляющими свойствами картона при глубинной фильтрации, чего нельзя добиться центрифугированием. Исключение стадии центрифугирования позволит сократить материальные и временные затраты на производство субстанции, повысив технико-экономические показатели на данной стадии.

Таблица 1 – Влияние исключения стадии центрифугирования перед каскадной фильтрацией на потери по ПРФ

| Серия промежуточного продукта | Центрифугирование перед фильтрацией | Потери по концентрации ПРФ, % |
|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| 011217/Ф | Да (Контроль) | 10,4±0,7 |
| | Нет | 11,0±0,9 |
| 021217/Ф | Да (Контроль) | 8,0±0,9 |
| | Нет | 9,8±1,0 |
| 031217/Ф | Да (Контроль) | 9,0±0,9 |
| | Нет | 8,0±0,9 |

В патенте [16] описана похожая схема отделения биомассы с последующим осветлением, однако для фильтрации используются полые волокна. Преимуществом используемых нами картонных фильтровальных дисков является эффективное удаление взвешенных частиц за счет как глубинного характера фильтрации, так и электрокинетической адсорбции. Тогда как фильтрация через полые волокна может привести к увеличению потерь за счет большей площади поверхности, контактирующей с продуктом.

Одним из основных этапов выделения ПРФ, согласно данным литературы, является осаждение целевого полисахарида раствором катионного детергента ЦТАБ [17–20]. Механизмы взаимодействия полисахаридов и ЦТАБ подробно изучены и описаны в литературе [21–24]. Согласно [24], осаждение происходит после достижения раствора ЦТАБ критической концентрации мицеллообразования и нейтрализации свободного заряда полианионного полисахарида с последующим образованием агрегатов, выпадающих в осадок.

Мы предположили, что для оптимизации этапа осаждения целесообразно фильтрат предварительно сконцентрировать, что позволит уменьшить затраты на реагенты и упростит процесс. Для этого выбрали метод тангенциальной ультрафильтрации, который кроме концентрирования позволяет избавиться от балластных веществ. При выборе порога отсечения мембран исходили из того, что ПРФ является высокомолекулярным полисахаридом с молекулярной массой по разным источникам от 450 до 1200 кДа [25, 26], а примеси, присутствующие в фильтрате – низкомолекулярные остатки питательной среды, клеточные структуры, имеющие молекулярную массу

до 30 кДа. Например, молекулярная масса липополисахарида, который может придавать продукту пирогенность, составляет 10–20 кДа [27]. Поэтому для концентрирования и диафильтрации использовали кассеты с порогом отсечения 30 и 100 кДа. Большой порог отсечения не целесообразен, т.к. возможны потери по целевому продукту, находящемуся в растворе в виде олигосахаридов и коротких полисахаридов.

Установлено, что при использовании мембранны с порогом отсечения 30 кДа концентрация полисахарида в полученном промежуточном продукте была выше на 16–22%, чем после концентрирования и диафильтрации на мембране 100 кДа (рис. 1). Мы предполагаем, что культура *H. influenzae* SPB тип b B-7884 синтезирует ПРФ с различным количеством звеньев в полисахаридной цепочке, и потери при концентрировании и диафильтрации через мембрану 100 кДа могут быть связаны с удалением из промежуточного продукта полисахаридов с молекулярной массой около 100 кДа. Кроме того, согласно данным литературы низкомолекулярные полисахариды ПРФ (50 и 100 кДа), а также олигосахариды (10 кДа) после конъюгации с белком носителем проявляют более высокую иммуногенность по сравнению с конъюгатом, в состав которого входит нативный высокомолекулярный ПРФ (450–600 кДа) [26].

В работе [16] для ультрафильтрации использовали мембранны с порогом отсечения 50 кДа. Учитывая, что мембранны имеют неоднородную пористость и возможен «проскок» молекул с большей молекулярной массой, чем порог отсечения, по нашему мнению, использование ультрафильтрационной кассеты 50 кДа может также привести к потерям по низкомолекулярным полисахаридам.

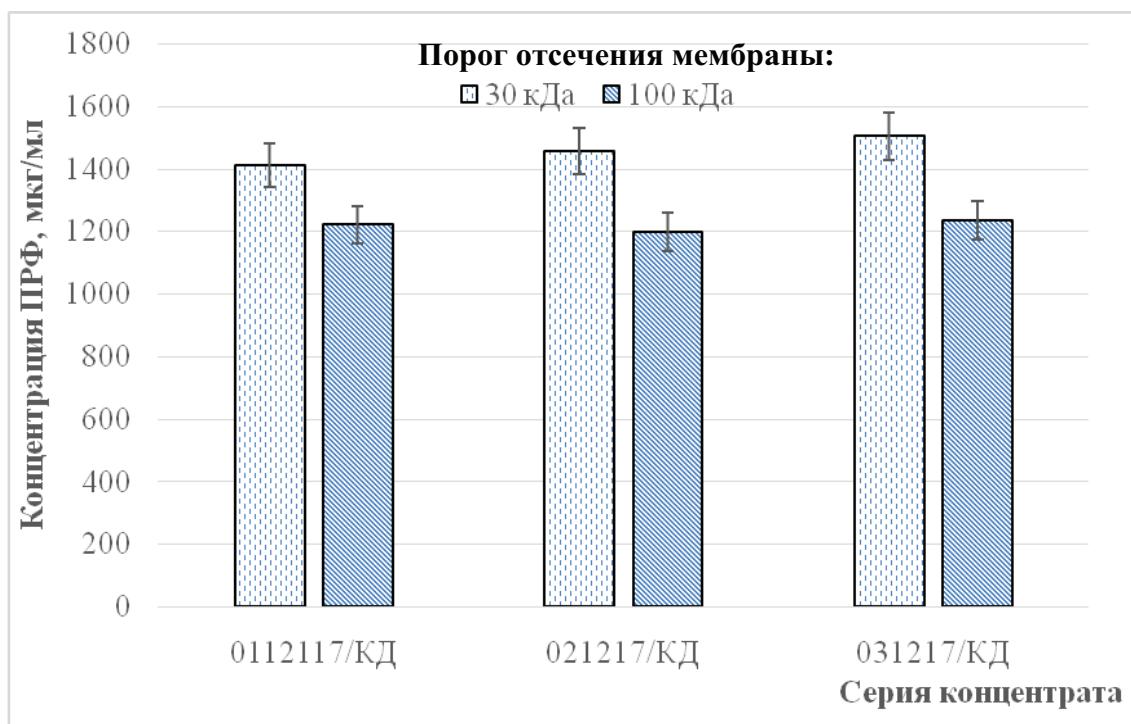


Рисунок 1 – Концентрация полирибозилрибитолфосфата (ПРФ) в концентрате в зависимости от порога отсечения мембранны на этапе концентрирования и диафильтрации (для трех серий)

На следующем этапе отрабатывали процесс осаждения ПРФ 10% раствором ЦТАБ на трех сериях концентрата. Показано, что после добавления раствора дегидрата и отделения осадка полисахарида центрифугированием количество ПРФ в супернатанте составило 0,004–0,010 мкг/мл, что свидетельствует о практически полном осаждении целевого продукта. В литературе описаны технологии, в которых для осаждения ПРФ также используется раствор ЦТАБ [18], в некоторых вариантах с добавлением дополнительных веществ, например, 30% раствора целита [17]. В работе [28] указывается дополнительная обработка промежуточного продукта ледяным раствором смеси этанола и метанола (95,22% и 4,78% соответственно) и гидроксил апатитом. Преимуществом используемого в данной работе способа выделения ПРФ является его одностадийность без применения

дополнительных веществ, примесные остатки которых требуют удаления на последующих стадиях очистки продукта. Авторы работы [19] отделение осадка, осажденного ЦТАБ, проводили при помощи фильтрации через глубинные фильтры. Использование центрифугирования для данной цели является более приемлемым в связи с большей технологичностью этапа сбора осадка и соответственно меньшими потерями.

На следующем этапе проводили подбор оптимальной концентрации этанола для гомогенизации и экстракции ПРФ из промежуточного продукта, полученного после осаждения ЦТАБ. При этом концентрацию этанола для экстракции оставляли неизменной, тогда как гомогенизацию проводили с добавлением этанола в количестве 7,5–20,0% от объема концентрата (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние концентрации этанола, добавленного на стадии гомогенизации, на количество экстрагированного ПРФ

| Количество добавленного этанола, % | Концентрация ПРФ (мг/мл) в промежуточном продукте серии | | |
|---------------------------------------|---|-----------|-----------|
| | 011217/Э | 021217/Э | 031217/Э |
| 7,5 | 1,00±0,12 | 0,90±0,15 | 0,92±0,14 |
| 10,0 | 1,24±0,14 | 1,22±0,10 | 1,12±0,16 |
| 12,5 | 1,80±0,09 | 1,74±0,07 | 1,78±0,10 |
| 15,0 | 1,72±0,10 | 1,90±0,20 | 1,60±0,09 |
| 17,5 | 1,74±0,14 | 1,70±0,09 | 1,80±0,12 |
| 20,0 | 1,62±0,10 | 1,70±0,12 | 1,50±0,08 |

Примечание. Определение ПРФ проводили после экстракции полисахарида этанолом в количестве 30,0% от объема концентрата

Установлено, что максимальное количество экстрагируемого ПРФ (1,6–1,8 мг/мл) наблюдали при добавлении этанола в количестве 12,5–17,5%. С точки зрения экономической целесообразности, в последующей работе использовали 12,5% этанола.

Мы предположили, что уменьшить потери выделяемого полисахарида возможно путем подбора оптимального количества этанола на стадии экстракции. Действительно, увеличение объема этанола до

32,5% позволило увеличить количество экстрагируемого ПРФ на 20–22% (рис. 2).

Учитывая, что полученный супернатант после удаления осадка центрифугированием был темного цвета и содержал незначительное количество неосажденных частиц, мы предположили, что осветлить данный промежуточный продукт возможно при помощи угольных фильтров с предварительной фильтрацией через глубинный фильтр с диаметром пор около 0,4 мкм.

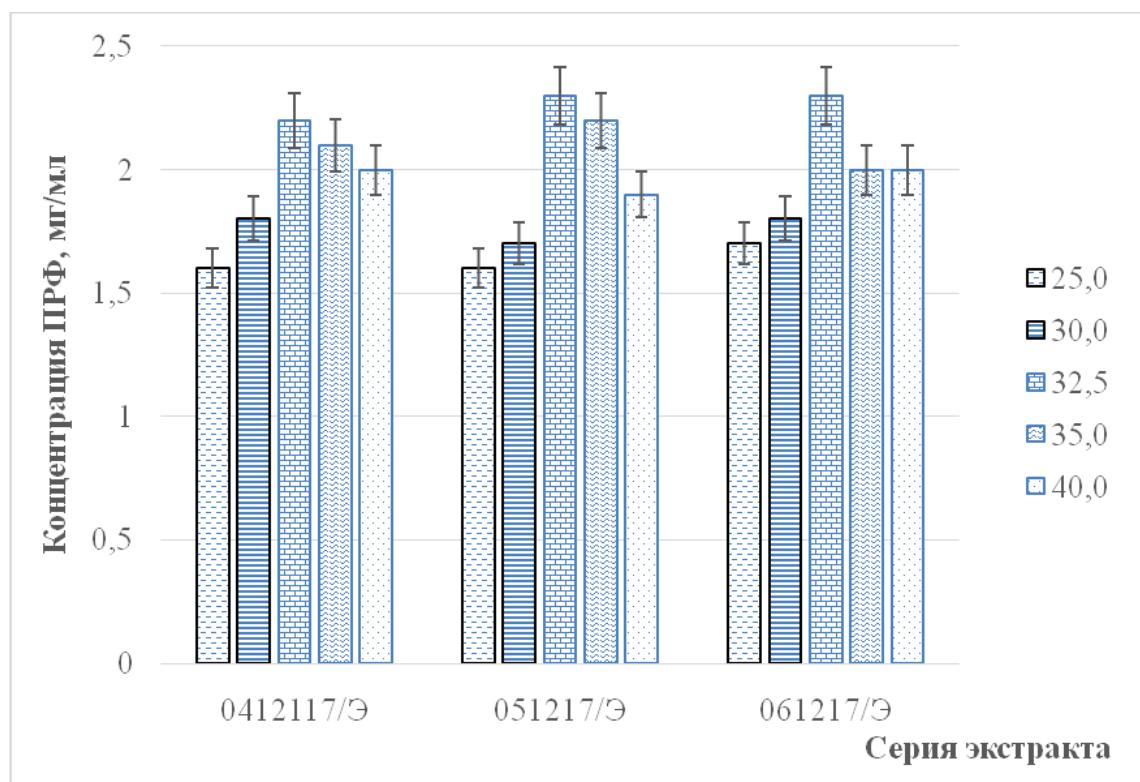


Рисунок 2 – Влияние концентрации этанола, используемого для экстракции полирибозилрибитолфосфата (ПРФ), на количество выделенного полисахарида (для трех серий)

В таблице 3 приведены данные по потерям ПРФ после фильтрации через угольные фильтры двух производителей, а также по количеству циклов, необходимых для достижения оптической плотности фильтрата менее 0,15 (при длине волны 275 нм). Установлено, что меньшее количество циклов для

осветления потребовалось при использовании карбонового фильтра Seitz AKS2 (Pall), однако потери ПРФ были выше, чем после фильтрации через Zeta Plus Carbon R53 (3M Purification). Поэтому в дальнейшем для отработки технологии рекомендовано использовать фильтры Zeta Plus Carbon R53.

Таблица 3 – Осветление промежуточного продукта после экстракции путем фильтрации через карбоновые фильтры различных фирм-производителей

| Серия фильтрата | Карбоновый фильтр | | | |
|-----------------|---|---------------|----------------------|---------------|
| | Zeta Plus Carbon R53 (3M Purification) | | Seitz AKS2 (Pall) | |
| | Потери, % | Кол-во циклов | Потери, % | Кол-во циклов |
| 011217/Ф/У | 6,2±1,0 | 6 | 11,0±0,9 | 5 |
| 021217/Ф/У | 5,0±0,9 | 6 | 8,6±1,1 | 5 |
| 031217/Ф/У | 5,2±1,0 | 6 | 10,0±0,9 | 5 |

На следующем этапе проводили выделение ПРФ путем осаждения 4,0 М раствором хлори-

да натрия разного объема (1–5 %, по объему, табл. 4).

Таблица 4 – Влияние концентрации 4,0 М раствора хлорида натрия на количество осажденного полисахарида

| Количество добавленного 4,0 М NaCl, % | Содержание рибозы (%) в промежуточном продукте серии | | |
|--|--|----------|----------|
| | 011217/O | 021217/O | 031217/O |
| 0,5 | 12,0±0,9 | 14,0±0,9 | 12,2±1,0 |
| 1,0 | 22,0±0,9 | 23,2±1,0 | 21,8±1,0 |
| 2,0 | 15,2±1,0 | 15,0±0,9 | 14,4±0,7 |
| 3,0 | 11,0±1,2 | 10,6±1,1 | 10,4±0,7 |
| 4,0 | 8,0±1,2 | 7,2±0,6 | 8,0±0,9 |
| 5,0 | 5,0±0,9 | 5,8±1,0 | 6,0±0,9 |

Примечание. Определение содержания рибозы проводили в 0,5 г осадка после осаждения раствором хлорида натрия с последующим отделением осадка центрифугированием

Показано, что максимальное количество полисахарида (определяли по содержанию рибозы, 22–23%) осаждалось при добавлении 1,0% (по объему) раствора натрия хлорида. При увеличении количества добавленного раствора соли количество полученного осадка увеличивалось, однако содержание рибозы в нем было низкое, что можно объяснить выпадением

в осадок значительного количества хлорида натрия и уменьшения доли ПРФ в нем.

Далее полученный осадок после осаждения 4,0 М раствором натрия хлорида (1%, по объему) замораживали при температуре $-(20\pm 2)^\circ\text{C}$. При помощи реакции латекс-агглютинации подтверждена подлинность полученного продукта (рис. 3).



**Рисунок 3 – Подтверждение подлинности полученной активной фармацевтической субстанции ПРФ.
А – образец; Б – контроль (положительная реакция латекс-агглютинации)**

Полученный продукт может использоваться в качестве активной фармацевтической субстанции при производстве конъюгированной полисахаридной вакцины. Отметим, что в литературе предлагается лиофильное/вакуумное высушивание полученного осадка [16, 19, 28], что может увеличить срок хранения субстанции. Изучению данного вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В результате проведенной работы была подобрана технологическая цепочка для выделения и очистки полисахарида полирибозилтрибитолфосфата, используемого в качестве активной фармацевтической субстанции при производствеmono- и комбинированных вакцин против гемофильной инфекции.

Полученные результаты станут основой для дальнейшей наработки субстанции полисахарида и позволяют приступить к следующему этапу разработки технологии вакцины против *Haemophilus influenzae* тип b-конъюгации с белком-носителем.

БЛАГОДАРНОСТИ. Авторский коллектив выражает благодарность первому заместителю директора СПбНИИВС Евтушенко Анатолию Эдуардовичу и советнику директора СПбНИИВС Петровскому Станиславу Викторовичу за обеспечение консультационной поддержки со специалистами, занимающимися разработкой технологий получения полисахаридных вакцин на мировом уровне.

INTRODUCTION. According to the data of World Health Organization, about 190 countries in the world have included in the national calendars vaccination against *Haemophilus influenzae* type b (Hib), which causes severe forms of pneumonia and meningitis in children under 5 years of age [1–7].

In the Russian Federation, vaccination against Hib is optional [8–10]. An important factor restraining mainstreaming of the Hib vaccine is the lack of local large-scale production of this product on the territory of the Russian Federation. Therefore, the development and improvement of the technology for the production of the polyribosylribitol phosphatesubstance (PRP) – capsular polysaccharide of the bacterium *H. influenzae* type b and the active ingredient of the vaccine – is particularly relevant.

Earlier, the employees of the federal state unitary enterprise “Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia isolated and identified the strain *H. influenzae* SPB type b, deposited in the National collection of pathogenic microorganisms and cell cultures of FBIS SRCAMB under the number of B-7884 [11, 12]. The conditions for synthesis of capsular polysaccharide PRP by strain B-7884 were arranged. [13], and preliminary work on the arrangement of the optimal filtration system for clarifying of the intermediate production in the process of PRP isolation was carried out [14].

THE AIM OF THE WORK was to study the possibility of excluding the centrifugation stage for separating *H. influenzae* SPB type b B-7884 biomass before clarification on the cascade of filter discs, and the development of subsequent stages of PRP isolation from the obtained intermediate product.

MATERIALS AND METHODS. The cultivation of *H. influenzae* SPB type b B-7884 was carried out in a semisynthetic liquid culture medium [12, 13] in flasks on the shaker incubator CERTOMAT IS (manufacturer “Sartorius”) at the temperature (35 ± 2)°C and (150 ± 10) rpm for 15–17 hours to obtain the culture liquid with the optical density not less than 1.2 at the wavelength of 590 nm. The *H. influenzae* SPB type b B-7884 culture, grown on a growth medium with similar composition to the middle of the exponential growth phase, was used as the seed. The volume of the inserted seed was 10% (v/v). For inactivation, the obtained culture liquid in the flasks was heated up to (55 ± 5)°C and held (15 ± 3) minutes without stirring the water bath (manufacturer “GFL”). After the inactivation, the temperature was set at the level of (8 ± 2)°C. The inactivation was monitored by direct seeding on the selective culture medium and incubation in the presence of 5% CO₂ at the temperature of 35 ± 2 °C (in the Sanyo MCO-15AC CO₂ incubator) for 48 hours. After the end of incubation time, the colonies typical for *H. influenzae* type b should not be present on the plates. Some portion of the inactivated culture was sent to the centrifugation at (4.500 ± 200) rpm and (5 ± 3)°C (centrifuge Beckman coulter Avanti JE) to separate the biomass with subsequent filtration through

a cascade of filter disks Zeta plus LP 60 (0.3–0.6 µm, manufacturer “3M Purification”) and Zeta plus LP 90 (0.1–0.3 µm, manufacturer “3M Purification”) using the pump “Watson-Marlow 323E”. In some cases, filtration through the cascade of filters was carried out right after the inactivation of the culture.

The obtained intermediate product was subjected to concentration (10 times) and diafiltration (dilution with water for injection at a ratio of 1:1 with subsequent concentration to the original volume) on a facility for tangential ultrafiltration Vivaflow 200 (manufacturer “Sartorius”) with nominal molecular weight cut-off of 30 and 100 kDa (depending on the variant). The polysaccharide from the concentrate was isolated by precipitation with a 10% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) solution in the amount of 5% (v/v). The addition of the CTAB solution was carried out with constant stirring at (150 ± 50) rpm with a magnetic stirring device ES-6120 with heated (manufacturer “Ekohim”) at the temperature of (5 ± 3)°C, then the mixture was left at the temperature of (5 ± 3)°C for 12–16 hours until precipitation occurred. The obtained precipitate of PRP was collected by centrifugation for 30 minutes at the rotor speed (4500 ± 200) rpm and the temperature of (5 ± 3)°C. The precipitate was removed from the centrifuge beaker to the homogenization vessel by a metal spatula. The centrifuge beaker were rinsed with chilled ethanol with concentration not less than 96%, and poured into the vessel for homogenization with precipitate. The total added amount of ethanol was 7.5–20.0% of the volume of the concentrate obtained in the concentration and diafiltration step. Further, the precipitate was homogenized using a RW 16 basic homogenizer (manufacturer “IKA”) at the blade speed of the instrument (6000 ± 500) rpm at (5 ± 3)°C until the precipitate was completely dissolved. Extraction of PRP was carried out with ethanol with concentration not less than 96%. The total added amount of ethanol was 25.0–40.0% of the volume of the concentrate obtained in the concentration and diafiltration step. After adding the calculated volume of ethanol, the obtained mixture was agitated for 13 ± 1 h on a magnetic stirrer when a magnetic element was rotated at the speed (275 ± 25) rpm at the room temperature. After the extraction had been finished, the precipitate was separated by centrifugation at the rotor speed (4500 ± 200) rpm, at the temperature of (5 ± 3)°C, for 0.5–1.0 h. The obtained supernatant was filtered through deep filters of Zeta Plus SP 30 (3M Purification) and carbon filters of Zeta Plus Carbon R53 (manufacturer “3M Purification”) and Seitz AKS2 (manufacturer “Pall”), afterwards the optical density of the resulting filtrate was determined (at the wavelength of 275 nm). 0.5–5.0% (v/v) of 4.0 M sodium chloride solution was added to the filtrate, the contents of the bottle were gently shaken by hand and left at the temperature of (5 ± 3)°C for (13 ± 1) h in a cold room. The precipitate was separated by centrifugation for 30 minutes at the rotor speed (4500 ± 200) rpm and the temperature of (5 ± 3)°C. The supernatant was drained, the precipitate collected in glass vials and frozen in a low temperature refrigerator

UF V 500 (manufactured "Binder") at the temperature of $-(20\pm 2)^\circ\text{C}$.

The determination of the concentration of ribose and polyribosylribitol phosphate in the intermediate products was performed by the orcinol method as described above [15]. The optical density in the intermediate products was determined spectrophotometrically at the wavelength of 275 and 590 nm (spectrophotometer HITACHIU-2900).

The confirmation of the identity of the obtained PRP was carried out by latex agglutination using a commercial kit Wellcogen™ *H. influenzae* b ZL21/R30858801. The reaction was carried out according to the reagent manual.

To implement the metrological support of the research, measuring equipment and instruments with valid verification certificates were used.

All the measurements were made in at least three replicates. Statistical processing of the results was carried out according to SPh XIII GPA.1.1.0013.15 "Statistical processing of the results of a chemical experiment". The calculation of the boundary values of the confidence interval was carried out according to the Student's test (the level of significance $p = 0.05$) in the Excel program.

RESULTS AND DISCUSSION. In order to assess the possibility of excluding the centrifugation stage in separating the biomass from the inactivated culture liquid

of *H. influenzae* SPB type b B-7884, the concentration of PRP in the intermediate products was determined before and after centrifugation and/or depth filtration.

It was shown that the losses by quantitative contents of the polysaccharide after filtration through the cascade of filters without the centrifugation stage did not differ from those with preliminary precipitation of the bacterial mass (Table 1). It should be noted that the optical density of the supernatant and the filtrate were not significantly different and within the range of 0.2–0.4, which indicates effective removal of biomass by deep filtration on cardboard filters even without the stage of preliminary centrifugation.

The possibility of excluding the stage of centrifugation for the separation of biomass can be explained by using the cascade of filters with a pore size of 0.3–0.6 μm and 0.1–0.3 μm (a nominal sterilizing filter) for filtration, which completely ensures the retention of bacterial mass. In addition, slightly lower values of optical density can be associated with clarifying properties of cardboard during deep filtration, which cannot be achieved by centrifugation. Exclusion of the stage of centrifugation will reduce the material and time costs for the production of the substance, increasing the technical and economic indicators at this stage.

Table 1 – Effect of exclusion of the centrifugation stage before cascade filtration on PRP losses

| Intermediate product batch | Centrifugation before filtration | Losses in PRP concentration, % |
|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 011217/F | Yes (Control) | 10.4±0.7 |
| | No | 11.0±0.9 |
| 021217/F | Yes (Control) | 8.0±0.9 |
| | No | 9.8±1.0 |
| 031217/F | Yes (Control) | 9.0±0.9 |
| | No | 8.0±0.9 |

A similar scheme for separation of biomass followed by clarification is described in the patent [16], but for filtration hollow fibers are used. The advantage of the cardboard filter discs, used by us, is the effective removal of suspended particles due to both the deep nature of filtration and electrokinetic adsorption, whereas filtration through hollow fibers can lead to increased losses due to a larger surface area contacting with the product.

One of the main stages in the separation of PRP according to literature data is the precipitation of the target polysaccharide with a solution of the cationic detergent CTAB [17–20]. The mechanisms of interaction of polysaccharides and CTAB are studied and described in literature in detail [21–24]. According to [24], precipitation occurs after reaching the CTAB solution in a critical micelle concentration and neutralizing the free charge of the polyanionic polysaccharide, with subsequent formation of precipitated aggregates.

We supposed that in order to optimize the deposition stage, it is expedient to pre-concentrate the filtrate, which will allow reducing the costs of reagents and simplify the process. For this purpose, a method of tangential ultrafiltration has been chosen which allows getting out of ballast substances in addition to concentrating. During

the selection of the cut off threshold of membranes we based on the fact that PRP is a high molecular weight polysaccharide with a molecular mass from 450 to 1,200 kDa (in different sources) [25, 26], while the impurities present in the filtrate are low molecular weight residues of the growth medium, the cell structures having a molecular weight up to 30 kDa. For example, the molecular weight of the lipopolysaccharide, which can impart pyrogenicity of the product, is 10–20 kDa [27]. Therefore, for concentration and diafiltration the cassettes with a cut-off threshold of 30 and 100 kDa were used. The larger cut-off threshold is not advisable, because of losses on the target product, found in the solution in the form of oligosaccharides and short polysaccharides.

It was found out that the concentration of polysaccharide in the resulting intermediate product after using a membrane with a cut-off threshold of 30 kDa was higher by 16–22% than after the concentration and diafiltration on a 100 kDa membrane (fig. 1). We assume that the *H. influenzae* SPB type b B-7884 culture synthesizes PRP with a different number of units in the polysaccharide chain, and losses during concentration and diafiltration through a 100 kDa membrane can be associated with the removal of polysaccharides from the intermediate product with a

molecular weight about 100 kDa. In addition, according to the literature data, the low molecular weight polysaccharides PRP (50 and 100 kDa) as well as oligosaccha-

rides (10 kDa) after conjugation with carrier protein show a higher immunogenicity than the conjugates that include native high molecular weight PRP (450–600 kDa) [26].

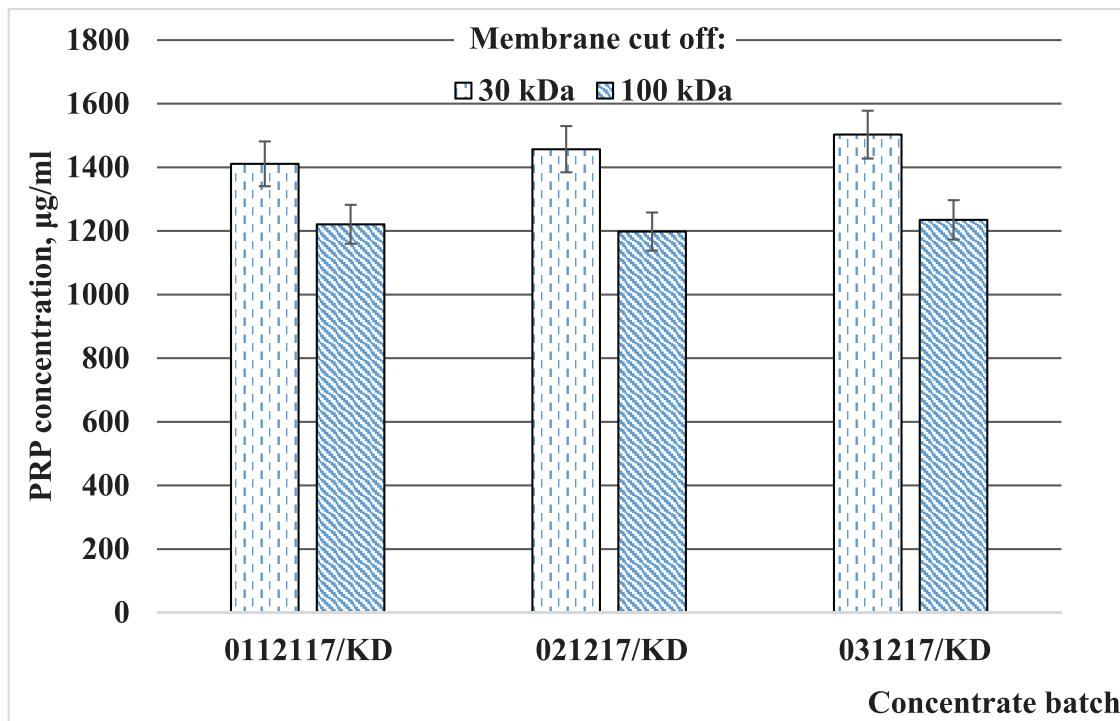


Figure 1 – Concentration of polyribosylribitol phosphate (PRP) in the concentrate, depending on the cut-off threshold of the membrane during the concentration and diafiltration stage (for three series)

In the work [16], a membrane with a cut-off threshold of 50 kDa was used for ultrafiltration. Considering that the membranes have a non-uniform porosity and a “breakthrough” of molecules with a higher molecular mass than the cutoff threshold is possible, in our opinion the use of an ultrafiltration cassette of 50 kDa can also lead to losses in low-molecular polysaccharides.

At the next stage, the PRP precipitation process was tried out with the 10% solution of CTAB on three batches of the concentrate. It was shown that after addition of the detergent solution and separation of the polysaccharide precipitate by centrifugation, the amount of PRP in the supernatant was 0.004–0.010 µg/ml, which indicates that the desired product was almost completely precipitated. In the literature there are described technologies according to which CTAB solution is also used for precipitation of PRP [18], and in some cases some additional substances are used, for example, 30% solution of celite [17]. In one of the works [28] the additional treatment of the intermediate product with an ice raster of a mixture of ethanol and methanol (95.22% and 4.78%, respectively) and hydroxyl apatite is indicated. The advantage of the PRP separation method used in this work is a one-step process without using additional substances, the impurity residues of which require removal in the subsequent stages of the product purification. The authors of another work [19] separated the precipitate (precipitated by

CTAB) by filtration through deep filters. Using the centrifugation for this purpose is more acceptable due to the higher processability of the stage of precipitate collection and, accordingly, smaller losses.

In the next stage the optimal ethanol concentration was selected for homogenization and extraction of PRP from the intermediate product obtained after CTAB precipitation. The concentration of ethanol for extraction was kept unchanged, while homogenization was carried out with the addition of ethanol in the amount of 7.5–20.0% of the concentrate volume (Table 2).

It was found out that the maximum amount of extractable PRP (1.6–1.8 mg/ml) was observed with the addition of ethanol in the amount of 12.5–17.5%. From the point of view of economic expediency, 12.5% ethanol was used in the subsequent work.

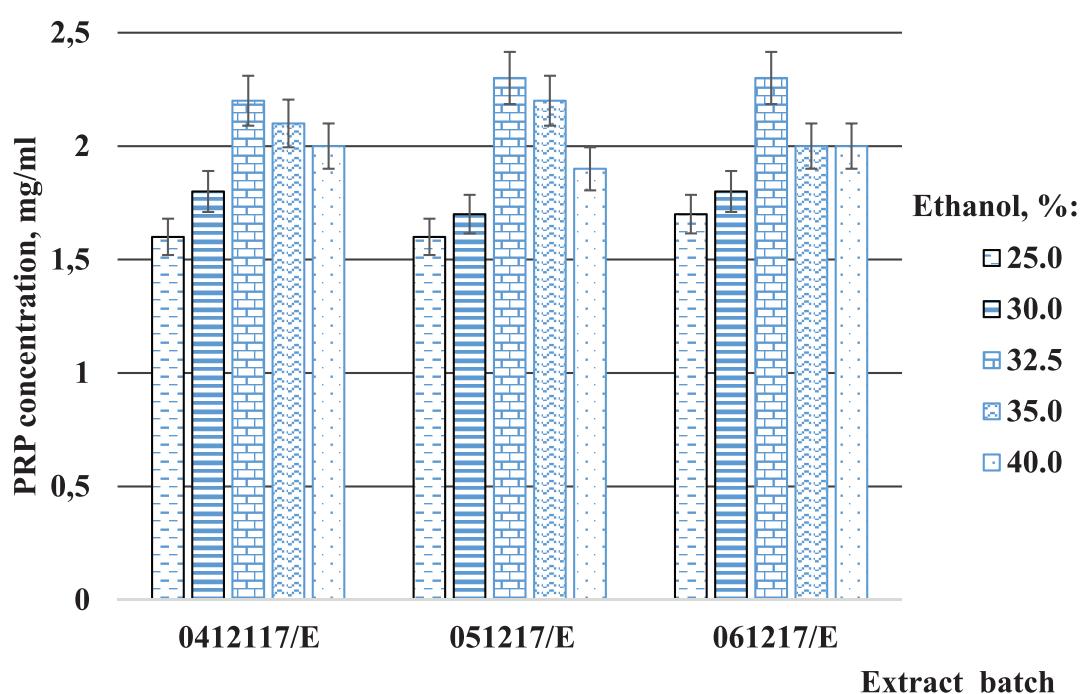
We supposed that it is possible to reduce the loss of the eliminated polysaccharide by selecting the optimum amount of ethanol at the extraction stage. Indeed, the increase in the volume of ethanol to 32.5% allowed increasing the amount of extracted PRP by 20–22% (Fig. 2).

Considering the fact that the obtained supernatant, after removing the precipitate by centrifugation, was dark in color and contained a small amount of unsettled particles, we assumed that this intermediate product could be clarified by carbon filters with prefiltration through a depth filter with a pore diameter about 0.4 µm.

Table 2 – Effect of the concentration of ethanol added in the homogenization stage, on the amount of extracted PRP

| The amount of added ethanol, % | Concentration of PRP (mg/ml) in the intermediate product of the batch | | |
|--------------------------------|---|-----------|-----------|
| | 011217/E | 021217/E | 031217/E |
| 7.5 | 1.00±0.12 | 0.90±0.15 | 0.92±0.14 |
| 10.0 | 1.24±0.14 | 1.22±0.10 | 1.12±0.16 |
| 12.5 | 1.80±0.09 | 1.74±0.07 | 1.78±0.10 |
| 15.0 | 1.72±0.10 | 1.90±0.20 | 1.60±0.09 |
| 17.5 | 1.74±0.14 | 1.70±0.09 | 1.80±0.12 |
| 20.0 | 1.62±0.10 | 1.70±0.12 | 1.50±0.08 |

Note. The determination of PRP was carried out after extraction of the polysaccharide with ethanol in the amount of 30.0% of the concentrate volume

**Figure 2 – Effect of the concentration of ethanol used for the extraction of polyribosylribitol phosphate (PRP) on the amount of the isolated polysaccharide (for three batches)**

In Table 3 the data on PRP losses after filtration through carbon filters of two manufacturers, as well as the number of cycles necessary to achieve the optical density of the filtrate less than 0.15 (at the wavelength of 275 nm) are shown. It was found out that fewer cy-

cles were required for clarification using the carbon filter Seitz AKS2 (Pall), but the PRP losses were higher than after filtration through Zeta Plus Carbon R53 (3M Purification). Therefore, Zeta Plus Carbon R53 filters are recommended for trying out the technology in the future.

Table 3 – Clarification of the intermediate product after extraction by filtration through carbon filters of various manufacturers

| Filtratebatch | Carbonfilter | | | |
|---------------|---|-------------|----------------------|-------------|
| | Zeta Plus Carbon R53 (3M Purification) | | Seitz AKS2 (Pall) | |
| | Losses, % | N of cycles | Losses, % | N of cycles |
| 011217/F/Y | 6.2±1.0 | 6 | 11.0±0.9 | 5 |
| 021217/F/Y | 5.0±0.9 | 6 | 8.6±1.1 | 5 |
| 031217/F/Y | 5.2±1.0 | 6 | 10.0±0.9 | 5 |

In the next stage, PRP was isolated by precipitation with different volume of a 4.0 M sodium chloride solution (1—5%, v/v, Table 4).

Table 4 –Effect of 4.0 M sodium chloride solution concentration on the amount of precipitated polysaccharide

| The amount of added 4.0 M NaCl, % | The content of ribose (%) in the intermediate product of the batch | | |
|-----------------------------------|--|----------|----------|
| | 011217/O | 021217/O | 031217/O |
| 0.5 | 12.0±0.9 | 14.0±0.9 | 12.2±1.0 |
| 1.0 | 22.0±0.9 | 23.2±1.0 | 21.8±1.0 |
| 2.0 | 15.2±1.0 | 15.0±0.9 | 14.4±0.7 |
| 3.0 | 11.0±1.2 | 10.6±1.1 | 10.4±0.7 |
| 4.0 | 8.0±1.2 | 7.2±0.6 | 8.0±0.9 |
| 5.0 | 5.0±0.9 | 5.8±1.0 | 6.0±0.9 |

Note. The ribose contents were determined in 0.5 g of the precipitate after precipitation with sodium chloride solution with subsequent separation of the precipitate by centrifugation

It was shown that the maximum amount of polysaccharide (determined by the contents of ribose, 22–23%) was precipitated by the addition of 1.0% (v/v) of sodium chloride solution. With increasing the amount of added salt solution, the amount of the obtained precipitate increased, but the ribose contents in it were low. It can be explained by the precipitation of a significant amount of

sodium chloride and the decrease of the PRP proportion in it.

Further on, the obtained precipitate after precipitation with 4.0 M sodium chloride solution (1% v/v) was frozen at the temperature of -(20±2)°C. Using the latex agglutination test, the identity of the obtained product was confirmed (Fig. 3).



Figure 3 – Confirmation of the identity of the obtained active pharmaceutical ingredient PRP. A – the sample; B – control (positive reaction of latex agglutination)

The obtained product can be used as an active pharmaceutical ingredient in the production of a conjugated polysaccharide vaccine. It should be noted that in the literature lyophilic/vacuum drying of the obtained precipitate is proposed [16, 19, 28]. It can increase the shelf life of the substance. Our further research will be devoted to the study of this problem.

CONCLUSION. As a result of the work, the technological chain was worked out in order to isolate and purify polysaccharide polyribosylribitol phosphate, used as an active pharmaceutical ingredient in the manufacture of mono- and combined vaccines against hemophilic infection. The obtained results will become the basis for the further development of the poly-

saccharide substance and allow us to proceed to the next stage in the development of the vaccine against *Haemophilus influenzae* type b – conjugation with the carrier protein.

ACKNOWLEDGMENTS. The authors' team expresses gratitude to the first deputy director of SPbNIIVS A.E. Yevtushenko and the adviser to the director of the Federal state unitary enterprise "Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations" of Federal medical and biologic agency of Russia S.V. Petrovskii, for providing consulting support with specialists involved in developing of technologies for obtaining polysaccharide vaccines at the world level.

Библиографический список

1. World Health Organization: Immunization, Vaccines and Biologicals. *Haemophilus influenzae type b (Hib)*. URL: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/sentinel/Hib/en/ (дата обращения: 29.01.2018).
2. Yang Y., Pan X., Cheng W., Yang Y., Scherpbier R.W., Zhu X., Chen Y., Zhou Y., Jiang Q. *Haemophilus influenzae type b carriage and burden of its related diseases in Chinese children: Systematic review and meta-analysis* // *Vaccine*. 2017. Vol. 35. Is. 46. P. 6275–6282. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.057
3. Wang S., Tafalla M., Hanssens L., Dolhain J. *A review of Haemophilus influenzae disease in Europe from 2000-2014: challenges, successes and the contribution of hexavalent combination vaccines* // *Expert Rev Vaccines*. 2017. Vol. 16. Is. 11. P. 1095–1105. DOI: 10.1080/14760584.2017.1383157
4. Chongmelaxme B., Hammanee M., Phooaphirak W., Kotirum S., Hutubessy R., Chaiyakunapruk N. *Economic evaluations of Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine: a systematic review* // *J Med Econ*. 2017. Vol. 20 Is. 10. P. 1094–1106. DOI: 10.1080/13696998.2017.1359181
5. Sakata H., Adachi Y., Morozumi M., Ubukata K. *Invasive Haemophilus influenzae infections in children in Kamikawa subprefecture, Hokkaido, Japan, 2006-2015: The effectiveness of H. influenzae type b vaccine* // *J Infect Chemother*. 2017. Vol. 23. Is. 7. P. 459–462. DOI: 10.1016/j.jiac.2017.03.019
6. Yohou K.S., Aka N.L., Noufe S., Douba A., Assi Assi B., Dagnan S.N. *Evaluation of introduction of the Haemophilus influenzae vaccine in Côte d'Ivoire [Article in French]* // *Sante Publique*. 2016. Vol. 28. Is. 5. P. 655–664.
7. Casey R.M., Dumolard L., Danovaro-Holliday M.C., Gacic-Dobo M., Diallo M.S., Hampton L.M., Wallace A.S. *Global Routine Vaccination Coverage, 2015* // *Morb Mortal Wkly Rep (MMWR)*. 2016. Vol. 65. Is. 45. P. 1270–1273. DOI: 10.15585/mmwr.mm6545a5
8. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. МР 3.3.1.0001-10 Эпидемиология и вакционопрофилактика гемофильной инфекции типа б. М, 2010. 32 с.
9. Союз педиатров России. Федеральные клинические рекомендации по вакционопрофилактике гемофильной инфекции типа б у детей. URL: http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_gemib.pdf (дата обращения: 29.01.2018).
10. Приказ Минздрава России от 21.03.2014 № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям».
11. Салимова Е.Л., Конон А.Д., Трухин В.П., Петровский С.В., Красильников И.В. *Haemophilus influenzae SPB тип b B-7884 – производственный штамм полисахаридных вакцин* // Актуальная биотехнология. 2016. № 3 (18). С. 77–81.
12. Трухин В.П., Петровский С.В., Красильников И.В., Начарова Е.П., Евтушенко Ф.Э., Салимова Е.Л., Конон А.Д., Уйба С.В. Штамм *Haemophilus influenzae* SPB тип b – высокоактивный продуцент капсульного полисахарида полирибозилрибитолфосфата. Пат. 2624014 Рос. Федерации N 2016113658; заявл. 08.04.2016; опубл. 30.06.2017, Бюл. N 19. 8 с.
13. Конон А.Д., Салимова Е.Л., Трухин В.П., Петровский С.В., Красильников И.В. Особенности культивирования *Haemophilus influenzae* SPB тип b B-7884 – продуцента полирибозилрибитолфосфата // Актуальная биотехнология. 2016. № 3 (18). С. 67–71.
14. Салимова Е.Л., Конон А.Д., Басакина И.И., Красильников И.В. Выделение целевого продукта полисахарида полирибозилрибитолфосфата из культуральной жидкости *Haemophilus influenzae* тип b с целью производства субстанции для полисахаридных вакцин // V Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации» (г. Санкт-Петербург, 8–9 ноября 2017 г.). С. 337–340.
15. Конон А.Д., Салимова Е.Л., Басакина И.И., Красильников И.В. Оптимизация методики определения концентрации полирибозилрибитолфосфата в процессе производства субстанции для полисахаридных вакцин // V Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации» (г. Санкт-Петербург, 8–9 ноября 2017 г.). С. 194–198.
16. Junqiang L., Qian S., Qiumin Zh., Yabing L., Hejun L., Yongjie J., inventor; Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., assignee. *Haemophilus influenzae type B polysaccharide conjugate vaccine preparation method*. CN103623404 (B). 2016 Aug 03.
17. Acep R., Neni N. *Isolation and purification of capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) by hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) precipitation and chromatography / Proceeding of The International Seminar on Chemistry. 2008 Oct: 294–296.*
18. Hamidi A., Beurret M.F., inventor; De Staat Der Nederlanden, Vert. Door De Minister Van Vws, assignee. *Process for producing a capsular polysaccharide for use in conjugate vaccines*. United States patent. US 7582459 B2. 2009 Sep 1.
19. Ella K.M., Ramasamy V., Naidu M.G., Sarma A.D., inventor; Bharat Biotech International Limited, assignee. *Non-alcoholic vaccine compositions free from animal- origin and process for preparation thereof / World intellectual property organization WO 2014009971 (A2)*. 2014 Jan 16.

20. Wieruszewski J.M., Talaga P., Lippens G. Development of a high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance identity assay of the capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae* type b present in cetylvinyl precipitate // Anal Biochem. 2005. Vol. 338. Is. 1. P. 20-25. DOI: 10.1016/j.ab.2004.10.038
21. Biswas S.C., Chattoraj D.K. Polysaccharide-surfactant interaction. 2. Binding of cationic surfactants to carboxymethyl cellulose and dextrin // Langmuir. 1997. Vol. 13. P. 4512-4519.
22. Bao H., Li L., Gan L.H., Zhang H. Interactions between ionic surfactants and polysaccharides in aqueous solutions // Macromolecules. 2008. Vol. 41. Is. 23. P. 9406-9412.
23. Maulik S., Jana P., Moulik S., Chattoraj D. Biopolymer-surfactant interaction. I. Kinetics of binding of cetyltrimethyl ammonium bromide with carboxymethylcellulose // Biopolymers. 1995. Vol. 35. P. 533-541. DOI: 10.1002/bip.360350512
24. Noyes A., Boesch A., Godavarti R., Titchener-Hooker N., Coffman J., Mukhopadhyay T. High throughput quantification of capsular polysaccharides for multivalent vaccines using precipitation with a cationic surfactant // Vaccine. 2013. Vol. 31. Is. 48. P. 5659-5665. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.09.075
25. Rana R., Dalal J., Singh D., Kumar N., Hanif S., Joshi N., Chhikara M.K. Development and characterization of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine prepared using different polysaccharide chain lengths // Vaccine. 2015. Vol. 33. Is. 23. P. 2646-2654. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.04.031
26. Abdelhameed A.S., Adams G.G., Morris G.A., Almutairi F.M., Duvivier P., Conrath K., Harding S.E. A glycoconjugate of *Haemophilus influenzae* Type b capsular polysaccharide with tetanus toxoid protein: hydrodynamic properties mainly influenced by the carbohydrate // Sci Rep. 2016. Vol. 6. P. 22208. DOI: 10.1038/srep22208
27. SigmaAldrich: Glycobiology Analysis Manual, 2nd Edition. Lipopolysaccharides. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biology/Glycobiology/glycobiology-pdf/lipopolsaccharides.pdf> (дата обращения: 29.01.2018).
28. Arsang A., Tabatabaie A., Vaziri F., Nejati M., Zolfaghari M.R., Fateh A., Jamnani F.R., Bahrmand A.R., Siadat S.D. Optimization of large scale production of *Haemophilus influenzae* type b polyribosyl-ribitol phosphate // Minerva Biotechnologica. 2017. Vol. 29. Is. 1. P. 17-23. DOI: 10.23736/S1120-4826.16.01855-3

References

1. World Health Organization: Immunization, Vaccines and Biologicals. *Haemophilus influenzae* type b (Hib). [Internet]. [cited 2018 Jan 29]. Available from: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/sentinel/Hib/en/.
2. Yang Y, Pan X, Cheng W, Yang Y, Scherpel RW, Zhu X, Chen Y, Zhou Y, Jiang Q. *Haemophilus influenzae* type b carriage and burden of its related diseases in Chinese children: Systematic review and meta-analysis. Vaccine. 2017 Nov 1;35(46):6275-82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.057
3. Wang S, Tafalla M, Hanssens L, Dolhain J. A review of *Haemophilus influenzae* disease in Europe from 2000-2014: challenges, successes and the contribution of hexavalent combination vaccines. Expert Rev Vaccines. 2017 Nov;16(11):1095-105. DOI: 10.1080/14760584.2017.1383157
4. Chongmelaxme B, Hammanee M, Phoaphirak W, Kotirum S, Hutubessy R, Chaiyakunapruk N. Economic evaluations of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine: a systematic review. J Med Econ. 2017 Oct;20(10):1094-106. DOI: 10.1080/13696998.2017.1359181
5. Sakata H, Adachi Y, Morozumi M, Ubukata K. Invasive *Haemophilus influenzae* infections in children in Kamikawa subprefecture, Hokkaido, Japan, 2006-2015: The effectiveness of *H. influenzae* type b vaccine. J Infect Chemother. 2017 Jul;23(7):459-62. DOI: 10.1016/j.jiac.2017.03.019
6. Yohou KS, Aka NL, Noufe S, Douba A, Assi Assi B, Dagnan SN. Evaluation of introduction of the *Haemophilus influenzae* vaccine in Côte d'Ivoire [Article in French]. Sante Publique. 2016 Nov 25;28(5):655-64.
7. Casey RM, Dumolard L, Danovaro-Holliday MC, Gacic-Dobo M, Diallo MS, Hampton LM, Wallace AS. Global Routine Vaccination Coverage, 2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2016 Nov 18;65(45):1270-3. DOI: 10.15585/mmwr.mm6545a5
8. Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitelj i blagopoluchiya cheloveka [Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.] MP 3.3.1.0001-10 Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika gemofil'noj infekcii tipa b [Epidemiology and vaccine prophylaxis for hemophilic infection of type b]. Moscow, 2010. 32 p. Russian.
9. Soyuz pediatrov Rossii [Union of pediatricians of Russia]. Federal'nye klinicheskie rekomendacii po vakcinoprofilaktike gemofil'noj infekcii tipa b u detej [Federal clinical recommendations for the vaccination of *Haemophilic type-b* infection in children]. [Internet]. [cited 2018 Jan 29]. Available from: http://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_gemib.pdf. Russian.
10. Prikaz Minzdrava Rossii ot 21.03.2014 № 125n «Ob utverzhdenii nacional'nogo kalendarja profilakticheskikh privivok i kalendarja profilakticheskikh privivok po epihemiceskim pokazaniyam» [Order of the Ministry of health of the Russian Federation of March 21, 2014 No. 125n “On the approval of the national calendar of preventive vaccinations and the calendar of preventive vaccinations for epidemic indications”]. Russian.

11. Salimova EL, Konon AD, Truhin VP, Petrovskii SV, Krasilnikov IV. Haemophilus influenzae SPB tip b V-7884 – proizvodstvennyj shtamm polisaharidnyh vakcin [Haemophilus influenzae SPB type b V-7884 – master seed strain of polysaccharide vaccines]. Actual biotechnology. 2016;3(18):77–81. Russian.
12. Trukhin VP, Petrovskii SV, Krasilnikov IV, Nacharova EP, Yevtushenko AE, Salimova EL, Konon AD, Ujba SV. inventor; Shtamm Haemophilus influenzae SPB tip b – vysokoaktivnyj producent kapsul'nogo polisaharida poliribozilribitolfosfata [The Haemophilus influenzae SPB type b strain is a highly active producer of the capsular polysaccharide polyribosyl ribitol phosphate]. Russian Federation RU 2624014. 2017 Jun 30. Russian.
13. Konon AD, Salimova EL, Truhin VP, Petrovskii SV, Krasilnikov IV. Osobennosti kul'tivirovaniya Haemophilus influenzae SPB tip b V-7884 – producenta poliribozilribitolfosfata [Features of Haemophilus influenzae SPB type b B-7884 cultivation – a producer of polyribosylribitol phosphate]. Actual biotechnology. 2016;3(18):67–71. Russian.
14. Salimova EL, Konon AD, Basakina II, Krasilnikov IV. Vydenie celevogo produkta polisaharida poliribozilribitolfosfata iz kul'tural'noj zhidkosti Haemophilus influenzae tip b s cel'yu proizvodstva substancii dlya polisaharidnyh vakcin [Isolation of the target product polyribosylribitol phosphate polysaccharide from a culture liquid of Haemophilus influenzae type b to produce a substance for polysaccharide vaccines]. V Vserossijskaya nauchno-prakticheskaya konferenciya s mezhdunarodnym uchastiem «Innovacii v zdorov'e nacii» (St. Petersburg, November 8-9, 2017). P. 337–340. Russian.
15. Konon AD, Salimova EL, Basakina II, Krasilnikov IV. Optimizaciya metodiki opredeleniya koncentracii poliribozilribitolfosfata v processe proizvodstva substancii dlya polisaharidnyh vakcin [Optimization of the method for determining the concentration of polyribosylribitol phosphate in the production of a substance for polysaccharide vaccines]. V Vserossijskaya nauchno-prakticheskaya konferenciya s mezhdunarodnym uchastiem «Innovacii v zdorov'e nacii» (St. Petersburg, November 8–9, 2017). P. 194–198. Russian.
16. Junqiang L, Qian S, Qiumin Zh, Yabing L, Hejun L, Yongjie J, inventor; Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., assignee. Haemophilus influenzae type B polysaccharide conjugate vaccine preparation method. CN103623404 (B). 2016 Aug 03.
17. Acep R, Neni N. Isolation and purification of capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type b (Hib) by hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) precipitation and chromatography. Proceeding of The International Seminar on Chemistry. 2008 Oct: 294–6.
18. Hamidi A, Beurret MF, inventor; De Staat Der Nederlanden, Vert. Door De Minister Van Vws, assignee. Process for producing a capsular polysaccharide for use in conjugate vaccines. United States patent. US 7582459 B2. 2009 Sep 1.
19. Ella KM, Ramasamy V, Naidu MG, Sarma AD, inventor; Bharat Biotech International Limited, assignee. Non-alcoholic vaccine compositions free from animal- origin and process for preparation thereof. World intellectual property organization WO 2014009971 (A2). 2014 Jan 16.
20. Wieruszkeski JM, Talaga P, Lippens G. Development of a high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance identity assay of the capsular polysaccharide from Haemophilus influenzae type b present in cetavlon precipitate. Anal Biochem. 2005 Mar 1;338(1):20–5. DOI: 10.1016/j.ab.2004.10.038
21. Biswas SC, Chattoraj DK. Polysaccharide-surfactant interaction. 2. Binding of cationic surfactants to carboxymethyl cellulose and dextrin. Langmuir. 1997;13:4512–9.
22. Bao H, Li L, Gan LH, Zhang H. Interactions between ionic surfactants and polysaccharides in aqueous solutions. Macromolecules. 2008;41(23):9406–12.
23. Maulik S, Jana P, Moulik S, Chattoraj D. Biopolymer-surfactant interaction. I. Kinetics of binding of cetyltrimethyl ammonium bromide with carboxymethylcellulose. Biopolymers. 1995;35:533–41. DOI: 10.1002/bip.360350512
24. Noyes A, Boesch A, Godavarti R, Titchener-Hooker N, Coffman J, Mukhopadhyay T. High throughput quantification of capsular polysaccharides for multivalent vaccines using precipitation with a cationic surfactant. Vaccine. 2013 Nov 19;31(48):5659–65. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.09.075
25. Rana R, Dalal J, Singh D, Kumar N, Hanif S, Joshi N, Chhikara MK .Development and characterization of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine prepared using different polysaccharide chain lengths. Vaccine. 2015 May 28;33(23):2646–54. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.04.031
26. Abdelhameed AS, Adams GG, Morris GA, Almutairi FM, Duvivier P, Conrath K, Harding SE. A glycoconjugate of Haemophilus influenzae Type b capsular polysaccharide with tetanus toxoid protein: hydrodynamic properties mainly influenced by the carbohydrate. Sci Rep. 2016 Feb 26;6:22208. DOI: 10.1038/srep22208
27. Sigma Aldrich: Glycobiology Analysis Manual, 2nd Edition. Lipopolysaccharides. [Internet]. [cited 2018 Jan 29]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biology/Glycobiology/glycobiology-pdf/lipopopolysaccharides.pdf>.
28. Arsang A, Tabatabaei A, Vaziri F, Nejati M, Zolfaghari MR, Fateh A, Jamnani FR, Bahrmand AR, Siadat SD. Optimization of large scale production of Haemophilus influenzae type b polyribosyl-ribitol phosphate. Minerva Biotechnologica. 2017 March;29(1):17–23. DOI: 10.23736/S1120-4826.16.01855-3

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Салимова Елена Леонидовна – начальник цеха «Комбинированные вакцины» Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, получение субстанций, выделение активного вещества. E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

Конон Анастасия Дмитриевна – кандидат технических наук, ведущий инженер-технолог цеха «Комбинированные вакцины» Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, получение субстанций, выделение активного вещества. E-mail: a.d.konon@spbniivs.ru

Трухин Виктор Павлович – директор Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, технологии вирусных вакцин.

Красильников Игорь Викторович – доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по международным отношениям Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России. Область научных интересов: биотехнология, технологии микробного синтеза, технологии вирусных вакцин, рекомбинантные вакцины. E-mail: i.v.krasilnikov@spbniivs.ru

Поступила в редакцию: 30.01.2018

Принята к печати: 15.02.2018

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Salimova Elena Leonidovna – head of the department “Combined Vaccines” of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, obtaining of substances, isolation of active substance. E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

Konon Anastasiia Dmitrievna – PhD (Engineering), leading process engineer of the department “Combined Vaccines” of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, obtaining of substances, isolation of active substance. E-mail: a.d.konon@spbniivs.ru

Truhin Viktor Pavlovich – director of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, technologies of viral vaccines.

Krasilnikov Igor Viktorovich – PhD (Biology), professor; deputy director for international relations of the federal state unitary enterprise “The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations” of Federal medical and biologic agency of Russia. Research interests: biotechnology, technologies of microbial synthesis, technologies of viral vaccines, recombinant vaccines. E-mail: i.v.krasilnikov@spbniivs.ru

Received: 30.01.2018

Accepted for publication: 15.02.2018