

На правах рукописи



БИБИКОВ ДМИТРИЙ НИКОЛАЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ, ЛИОФИЛИЗАЦИИ И МЕТОДОВ ОЦЕНКИ
КАЧЕСТВА
ВАКЦИННОГО ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ**

03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»
03.02.03 «Микробиология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск - 2021

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»)

Научные руководители

Комиссаров Александр Владимирович, доктор биологических наук (специальность 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»), профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник отдела экспериментальных фармацевтических форм

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук (специальность 03.02.03 – «Микробиология»), Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая отделом профилактических препаратов

Официальные оппоненты:

Неминушая Лариса Анатольевна, доктор биологических наук (специальность 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»), доцент, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», ведущий научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств для ветеринарии и животноводства, Московская область, Щелковский р-н, пос. Биокомбината

Саяпина Лидия Васильевна, доктор медицинских наук (специальность 03.02.03 – «Микробиология»), старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, главный эксперт, г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь

Защита состоится «8» октября 2021 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

Автореферат разослан « » _____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 350.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследований и степень ее разработанности. В настоящее время в Российской Федерации заболеваемость туляремией носит спорадический характер, однако настораживает тенденция к увеличению заболеваемости и повышению количества выделяемых штаммов *Francisella tularensis*, циркулирующих в природных очагах. В 2019 г. эпизоотические проявления туляремийной инфекции выявлены в 51 субъекте Российской Федерации (Кудрявцева Т.Ю. и др., 2020).

На сегодняшний день единственной зарегистрированной и разрешенной к применению в России вакциной является вакцина живая туляремийная сухая производства НПО «Микроген», созданная на основе вакцинного штамма 15 в научно-исследовательском институте эпидемиологии и гигиены (Мокриевич А.Н. и др., 2019). Вакцинация против туляремии включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Ежегодно в России вакцинируют и ревакцинируют около 1 млн человек (Мещерякова И.С., 2010; Мокриевич А.Н. и др., 2019).

Эксперты НЦЭСМП при анализе современного состояния вакцинопрофилактики особо опасных инфекций указывают на ряд проблем и вопросов, требующих решения, среди которых – вопрос производства туляремийной вакцины: «...рассматривается возможность закрытия производства туляремийной и бруцеллезной вакцин в НПО «Микроген» (филиал в Омске) и введение новой производственной площадки на базе НПО «Вирион» (филиал в Томске), в котором отсутствуют специалисты, имеющие опыт работы с туляремийным и бруцеллезным микробами...» (Саяпина Л.В. и др., 2016). В то же время РосНИПЧИ «Микроб», имеющий многолетний практический опыт производства профилактических вакцинных препаратов, располагает специалистами, обладающими необходимыми компетенциями в области работы с возбудителем туляремии. Подтверждением этому являются научные публикации, посвященные биотехнологическим, микробиологическим и другим процедурам, необходимым для производства ЖТВ (Волох О.А. и др., 2014; Еремин С.А. и др., 2006; Кузнецова Е.М. и др., 2011, 2012; Шепелев И.А. и др., 2003, 2010). В связи с вышеназванным, проведение комплекса мероприятий (научных, организационных и так далее) по организации на базе РосНИПЧИ «Микроб», по крайней мере, резервного производства данного иммунобиологического лекарственного препарата является актуальным.

Основным компонентом вакцины туляремийной живой сухой являются клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ. В технологии производства ЖТВ получение биомассы осуществляют в полужидких питательных средах в культуральных флаконах с аэрацией (Олсуфьев Н.Г., 1975). Недостатком культивирования возбудителя туляремии в полужидких средах является неравномерное распределение микроорганизмов и питательной среды по объему сосуда. Выращиваемая культура гетерогенна в физиологическом отношении. Эффективность полужидких сред, применяемых для производства вакцины, невелика – после 18 ч выращивания концентрация микроорганизмов увеличивается в 5-6 раз (Олсуфьев Н.Г., 1975; Колядицкая Л.С. и др., 1957). В условиях глубинного культивирования в биореакторе эффективно применение жидких питательных сред, использование которых даже без перемешивания позволяет увеличить выход биомассы, добиться большей однородности популяции микроорганизмов (Баснакьян И.А., 1992).

Питательные среды, используемые при выращивании микроорганизмов в производстве вакцин, наряду с основной задачей – обеспечение максимального накопления биомассы, не должны приводить к увеличению стоимости готового препарата. В институте «Микроб» проведены экспериментальные исследования по конструированию питательных сред на основе гидролизата фибрина, являющегося побочным продуктом производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина, и показана их эффективность при культивировании холерных вибрионов (Антонычева М.В. и др., 2010; Жулидов И.М. и др., 2012). В связи с этим, исследования по созданию питательной среды на основе гидролизата фибрина для выращивания *F. tularensis* 15 НИИЭГ, имеют под собой определенную научно-практическую базу.

Технология производства туляремийной вакцины предусматривает получение посевных культур I, II и III генерации штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, процесса накопления биомассы, необходимой для приготовления микробной взвеси определенной концентрации, последующим розливом, замораживанием, сублимационным высушиванием, герметизацией и упаковкой препарата, при этом количество микробных клеток в 1 мл готовой лекарственной формы препарата должно быть (20 ± 10) млрд (ФС.3.3.1.0019.15, 2015).

Отсутствие стадии концентрирования туляремийного микроба в технологии производства вакцины обладает рядом отрицательных моментов:

потенциальность выбраковки биомассы после процесса ее накопления в случае недостаточной для приготовления готовой лекарственной формы концентрации микроорганизма;

возможная повышенная реактогенность вакцины из-за наличия питательной среды после выращивания микроорганизмов.

Одним из перспективных направлений, применяемых в технологиях производства вакцин, является концентрирование целевых препаратов тангенциальной фильтрацией. Применение фильтрующих элементов с разным размером пор дает возможность концентрировать биологические препараты с различной молекулярной массой, практически без потерь целевого продукта. Рядом ученых подтверждена возможность применения вышеназванного метода для концентрирования бактериальных культур (Анкер А.А. и др., 1998; Гаврилов В.А., 2016; Коваленко В.Н. и др., 2001; Лещенко А.А. и др., 2006, 2014; Пиков А.В. и др., 2009). Таким образом, актуальность научных исследований по разработке экспериментальной технологии концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ тангенциальной фильтрацией является очевидной.

Биофармацевтическая композиция туляремийной вакцины представляет собой многокомпонентную смесь, состоящую из клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а также вспомогательных веществ (сахароза, натрия глутамата моногидрат, тиомочевина, желатин) (Инструкция по применению..., 2017). Отсутствие научной литературы по обоснованию параметров процесса лиофилизации ЖТВ, а также выбору качественно-количественного состава среды высушивания диктует необходимость проведения исследований по возможности применения новых криопротекторов и оптимизации процесса сублимационной сушки, которые должны повысить качество готовой лекарственной формы вакцины с одновременным снижением затрат на проведение ее лиофилизации. Актуальным является совершенствование технологии производства ЖТВ, в частности разработки условий концентрирования жизнеспособной биомассы и поиску оптимальных параметров лиофильного высушивания препарата.

На этапе культивирования вакцинного штамма при производстве живых вакцин важное значение имеет информация о физиологическом состоянии культуры микроорганизмов, в частности об ее жизнеспособности. Традиционные методы оценки, как правило, являются длительными процедурами из-за необходимости пересева микроорганизмов и выполнения ряда других операций, не позволяющих технологам получать информацию в режиме реального времени с целью оперативного воздействия на технологический процесс. Данного недостатка лишен ЭО способ анализа, в принцип которого положен постулат о том, что микроорганизмы являются электрофизическими объектами со слоистыми структурами и применения факта изменения оптических характеристик культуральной среды при ориентации бактерий в электрическом поле, функционально связанной со значением индуцированных зарядов. Данное явление было успешно использовано рядом исследователей при оценке физиологического состояния выращиваемой культуры микроорганизмов (Волошин А.Г., 2017; Гулий О.И., 2006; Игнатов С.В., 2010; Лапыш М.Е. и др., 1989; Bunin V.D. et al., 2004).

Определенными перспективами обладает и другой достаточно оперативный метод исследования механических и морфологических свойств бактериальных клеток в ответ на различные воздействия биогенных и абиогенных факторов на них (Никиян А.Н., 2014) – АСМ, успешно примененный для изучения морфогенеза поверхности спор бацилл (Chada V.G.R. et al., 2003), поверхностной вязкоупругости грамотрицательных бактериальных клеток [Vadillo-Rodriguez V. et al., 2008]. Методом АСМ проводились исследования терморезистентности *Azotobacter chroococcum* (Олюнина Л.Н. и др., 2009), ростовых и морфологических характеристик производственных штаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* при использовании гидролизатно-молочной и гидролизатно-соевой питательных сред (Цинберг М.Б. и др., 2003).

В связи с этим, оценка возможности использования новых инструментальных методов контроля – ЭО мониторинга и АСМ для анализа клеток *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ имеет под собой определенную научно-практическую базу.

Современные иммунохимические и молекулярно-генетические методы контроля культур микроорганизмов обладают повышенной чувствительностью и презентативностью. Между тем, отсутствие научной литературы по их использованию в производственных процессах получения туляремийной вакцины ставит вопрос по экспериментальной оценке возможности их применения.

На основании вышеизложенного сформулированы цель и основные задачи исследования.

Цель и задачи исследования.

Цель работы – разработка и совершенствование биотехнологических этапов получения живой туляремийной вакцины.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

1. Экспериментально обосновать состав жидкой питательной среды на основе гидролизата фибрина для культивирования вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ с целью получения биомассы и определить технологические параметры процесса.

2. Разработать технологию концентрирования клеточной массы вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной фильтрации.

3. Разработать технологию сублимационного высушивания бактерий вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ.

4. Экспериментально обосновать возможность применения новых методов контроля биомассы вакцинного штамма туляремийного микроба на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата.

5. Изучить физико-химические, микробиологические и иммунобиологические особенности туляремийного микроба на разрабатываемых биотехнологических этапах и оценить качество готовой лекарственной формы живой туляремийной вакцины.

Научная новизна. Экспериментально обоснованы качественный и количественный состав жидкой питательной среды на основе гидролизата фибрина для глубинного аппаратного культивирования клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (сухой гидролизат фибрина 5 %, глюкоза 1 %, пантотенат кальция 0,005 %, хлорид натрия 0,5 %, цистеин 0,1 %, pH (7,2±0,1), а также технологические параметры (температура, продолжительность, степень аэрации и скорость перемешивания) реализации данного процесса, дающие возможность обеспечивать увеличение биомассы в 17-24 раза.

Впервые для производства живой туляремийной вакцины разработана технологическая процедура концентрирования клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной микрофильтрации.

Разработана технология сублимационного высушивания биомассы вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ во флаконах, защищенная патентом на изобретение РФ № 2716505 «Способ получения лиофилизата вакцины туляремийной живой». Экспериментально обоснован новый биофармацевтический состав живой туляремийной вакцины (состав приведен на 1 мл): клетки штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ – (10±5) млрд клеток; и вспомогательные вещества: трегалоза – 0,1 г; декстран – 0,01 г; хитозан – 0,02 г.

Впервые показана применимость электрооптического метода для определения показателя «жизнеспособность» бактерий вакцинного штамма туляремийного микроба. Выявлено, что метод электрооптического анализа позволяет оперативнее детектировать изменения жизненных показателей культуры клеток в процессе выращивания, чем показатели концентрации биомассы, а динамика показателя «анизотропия поляризуемости» соответствует изменению показателя «жизнеспособность».

Для определения показателя «подлинность» экспериментальной живой туляремийной вакцины показана эффективность применения иммунохимических и молекулярно-генетических методов контроля.

Теоретическая и практическая значимость. Исследования, проведенные в рамках выполнения диссертационной работы, обладают прикладным характером и посвящены разработке и совершенствованию биотехнологических этапов получения живой туляремийной вакцины.

Разработаны состав жидкой питательной среды и технологические параметры глубинного аппаратного культивирования штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а также методические приемы концентрирования туляремийного микроба тангенциальной микрофильтрацией.

Обоснованы и внедрены в практику лабораторного производства состав среды высушивания и технологические характеристики лиофилизации бактерий вакцинного штамма туляремийного микроба во флаконах.

Показана оперативность оценки показателя «жизнеспособность» штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ при использовании электрооптического метода. Время, затраченное на проведение микробиологического анализа, составляет 5-6 сут, электрооптического мониторинга – 30-60 мин.

Предложен алгоритм использования молекулярно-генетических и иммунохимических методов для определения показателя «подлинность» в образцах лабораторных серий живой туляремийной вакцины и на стадиях ее получения. Выявлена информативность методов – полимеразная цепная реакция с электрофоретическим учетом результатов и дот-иммуноанализ с белком А, конъюгированным с золотыми наночастицами.

Основным практически значимым итогом диссертации является создание лабораторной технологической линии по выпуску вакцины туляремийной живой сухой. Предложенные решения нашли свое отражение в лабораторном регламенте на производство «Вакцина туляремийная живая сухая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения», утвержденном директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 17 января 2019 г. По экспериментально обоснованным биотехнологическим процедурам, изложенным в регламенте, произведены 3 лабораторные серии живой туляремийной вакцины, полностью соответствующие требованиям нормативных документов, что позволяет перейти к этапу доклинических исследований.

Результаты экспериментов послужили научной основой для подготовки следующих нормативно-методических документов:

методические рекомендации «Концентрирование туляремийного микроба методом тангенциальной фильтрации», одобренные Учёным советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 1 от 7 марта 2017 г.) и утверждённые директором института 7 марта 2017 г.;

методические рекомендации «Лиофилизация живой туляремийной вакцины», одобренные Учёным советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 3 от 27 апреля 2018 г.) и утверждённые директором института 28 апреля 2018 г.

методические рекомендации «Электрооптический мониторинг жизнеспособности вакцинного штамма туляремийного микроба», одобренные Учёным советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 3 от 5 ноября 2020 г.) и утверждённые директором института 5 ноября 2020 г.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что научно подтверждена необходимость использования в производстве живой туляремийной вакцины новых биотехнологических процедур и методических приемов контроля качества, имеющих целью увеличение стабильности технологии приготовления названного иммунобиологического лекарственного препарата. Изложенные в диссертации результаты изысканий служат теоретической основой для исследований в сфере развития технологических процессов приготовления живых бактериальных вакцин.

Материалы диссертации используются при проведении занятий со студентами, обучающимися по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология» в Саратовском государственном аграрном университете имени Н.И. Вавилова.

Методология и методы исследования. Предметом исследования являлась технология производства туляремийной живой вакцины. Объектом исследования служили биотехнологические процедуры приготовления вакцины: культивирование вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, концентрирование микробной биомассы, лиофилизация биофармацевтической композиции вакцины; процедуры ЭО мониторинга физиологического состояния бактерий, а также иммунохимические и молекулярно-генетические методы контроля культуры туляремийного микроба. Теоретической основой проведенных исследований являлись научные работы российских и иностранных ученых и сведения из нормативных документов по аспектам, освещаемым в диссертации.

Положения, выносимые на защиту.

1. Проведение процесса глубинного аппаратного культивирования клеток вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в разработанной жидкой питательной среде обеспечивают увеличение биомассы в 17-24 раза.

2. Концентрирование биомассы вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной микрофильтрации дает возможность получать суспензию туляремийного микроба с характеристиками, позволяющими ее использование для получения готовой лекарственной формы вакцины.

3. Разработанная биофармацевтическая композиция живой туляремийной вакцины и экспериментально обоснованные параметры ее сублимационного высушивания дают возможность производить лиофилизат препарата, соответствующий нормируемым характеристикам.

4. Электрооптический метод мониторинга физиологического состояния микробной популяции туляремийного микроба дает возможность оперативно анализировать показатели «жизнеспособность» и «концентрация» клеток *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата.

5. Полученные лабораторные серии живой туляремийной вакцины, произведенные по разработанным технологическим процедурам, отвечают нормируемым характеристикам.

Степень достоверности итогов исследований базируется на достаточном количестве полученных опытных результатов, их согласованности с теоретическими данными, статистическом анализе итогов экспериментов и проведении измерений на оборудовании прошедшем метрологическую поверку и калибровку. Выводы диссертации теоретически и экспериментально обоснованы и согласуются с целью и задачами работы.

Апробация результатов. Результаты экспериментов отражены в докладах на ежегодных научно-практических конференциях РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2016-2020) и представлены на научных конференциях и съездах различного уровня: «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2017), «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2017), «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (Санкт-Петербург, 2017), «Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения» (Саратов, 2018), «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ» (Саратов, 2018), V международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, 2018).

Личный вклад автора заключается в определении цели и задач работы, непосредственном участии в нахождении эффективных решений поставленных задач, постановке экспериментов и интерпретации результатов, оформлении научных статей, патента на изобретение, разработке нормативных и методических документов. Некоторые экспериментальные исследования проведены совместно с к.б.н. Кузнецовой Е.М., к.б.н. Уткиным Д.В., к.ф.-м.н. Ерохиным П.Н., к.б.н. Ульяновым А.Ю., Мироновой Н.П., Авдеевой Н.Г., Борисовой С.В., Холматовым К.И. Аминокислотный анализ сухого ферментативного гидролизата фибрина был проведен к.б.н. Н.Ю. Селивановым в ИБФРМ РАН. Автор выносит всем огромную благодарность.

Связь работы с научными программами. Работа выполнена в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» в рамках научно-исследовательских тем 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов», 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы», 83-2-20 «Совершенствование этапов производства и методов контроля лечебно-профилактических и диагностических препаратов в РосНИПЧИ «Микроб».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, из них 4 статьи в журналах из «Перечня изданий, которые входят в международные реферативные базы данных и системы цитирования и в соответствии с пунктом 5 правил формирования перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук», 4 статьи в журналах из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук», 6 публикаций в сборниках и материалах конференций, патент на изобретение РФ № 2716505 «Способ получения лиофилизата вакцины туляремийной живой».

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих в себя материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов, списка используемых литературных источников, включающего 173 наименования. Работа изложена на 162 страницах и иллюстрирована 24 рисунками, 30 таблицами.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Обзор литературы (глава 1)

В обзоре литературы обсуждены методы и технологии процессов культивирования, концентрирования и высушивания живых микробных культур. Проанализированы сведения по культивированию туляремийного микроба и методам контроля физиологического состояния микроорганизмов. Проведенный анализ литературы позволил определить цель и задачи исследования.

2.2 Материалы и методы исследования (глава 2)

В работе использовали штаммы *F. tularensis* 15НИИЭГ, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840, которые получали из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, Россия).

В ходе экспериментов использовали следующие основные методы:

физико-химические – определение pH, времени растворения лиофилизованного препарата и седиментационной устойчивости, показателя «проходимость через иглу», остаточной влажности, точности розлива, наличия вакуума в первичной упаковке осуществляли по стандартным методикам. Определение содержания аминокислот проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. При установлении температуры замерзания и эвтектических температур применяли метод определения удельного электрического сопротивления, разработанный Rey L. (Rey L., 2010);

микробиологические – определение чистоты микробной культуры (наличие посторонних микроорганизмов), концентрации клеток в микробных взвесах, жизнеспособности (процент живых микробных клеток), степени диссоциации культуры, обсемененности бактериями органов животных-биомоделей. Морфологию туляремийного микроба исследовали, применяя световую и атомно-силовую микроскопию. Для оценки физиологического состояния бактерий штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ использовали ЭО способ анализа;

иммунохимические методы – применяли реакцию непрямой гемагглютинации, иммунохроматографический анализ, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ и дот-иммуноанализ;

биологические методы – проведение исследований на мышах и морских свинках, определение веса животных, оценка общего состояния на установление специфической безопасности, прививаемости и иммуногенности вакцины;

молекулярно-генетические методы – постановка полимеразной цепной реакции;

статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли по стандартной методике определения грубых ошибок, а также с вычислением средней арифметической (M); средней ошибки средней арифметической (m). Расчеты осуществляли с помощью Microsoft Office Excel 2010.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Собственно экспериментальные исследования изложены в 4 главах работы.

В главе 3 изложены исследования посвященные совершенствованию одного из важных этапов производства ЖТВ – культивированию клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а также разработке технологической процедуры концентрирования биомассы туляремийного микроба.

Применяли сухой ФГФ со следующими физико-химическими показателями: содержание общего азота – (14,76±0,03) %; аминного азота – (7,39±0,03) %; процент расщепления белка – (50,7±1,7) %; содержание пептона (по шкале Дифко) – (53,7±1,5)%; следы непереваренного белка отсутствовали; сухой остаток – (8,78±0,2) %; хлориды – (0,22±0,01) %; влажность – (2,4±0,2) %; pH – (6,9±0,2). Аминокислотный состав представлен в таблице 1. Анализ данных аминокислотного состава ФГФ показал, что полученный гидролизат содержит необходимый набор аминокислот. Поэтому первым шагом при экспериментальном обосновании состава жидкой питательной среды на основе ФГФ было принято решение об отказе от введения состав среды стимуляторов роста.

Таблица 1 – Аминокислотный состав ФГФ, г/100г воздушно-сухого веса

Аминокислота	Значение характеристики
Аспарагиновая кислота	6,34±1,21
Треонин	3,86±0,36
Серин	4,27±0,87
Глутаминовая кислота	10,35±2,31
Глицин	2,92±0,24
Аланин	3,60±0,36
Валин	4,65±0,83
Метионин	1,06±0,05
Изолейцин	3,19±0,27
Лейцин	7,20±1,33
Тирозин	0,52±0,02
Фенилаланин	3,60±0,51
Лизин	7,22±1,24
Гистидин	1,84±0,12
Аргинин	3,58±0,44
Пролин	4,11±0,71
Цистеин	0,11±0,02
Сумма аминокислот	68,42

Для сравнения эффективности выращивания туляремийного микроба в условиях малообъемного культивирования в колбах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе в питательной среде на основе ФГФ использовали питательные среды на основе ПГРМ и ЭПД с различным содержанием аминного азота. Объем питательной среды составлял (25±1) мл, температура культивирования (37±1) °С, скорость вращения платформы – (200±5) об/мин, время культивирования (24±1) ч, посевная доза составляла не менее (0,5±0,1)×10⁹ м.к./мл среды, имела коэффициент жизнеспособности – (50±0,5) %. Было установлено, что лимитирующим фактором ростовых свойств экспериментальных сред является содержание аминного азота. Оптимальное значение этого показателя должно быть в пределах от (0,320±0,1) % до (0,420±0,1) %. При более высоком или низком содержании аминного азота рост туляремийного микроба резко ограничивается. Питательная среда на основе ПГРМ оказалась менее эффективной по показателям жизнеспособности культуры и прироста биомассы.

При исследовании влияния на рост туляремийного микроба в жидкой питательной среде на основе ФГФ в качестве стимуляторов роста солей кальция, натрия, аминокислот выявлен оптимальный состав среды: сухой гидролизат фибрина 5%, глюкоза 1%, пантотенат кальция 0,005 %, хлорид натрия 0,5%, цистеин 0,1%, рН (7,2±0,1). Данные показаны в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние компонентов питательной среды на рост и характеристики биомассы *F. tularensis* 15 НИИЭГ (n=3)

Аминный азот, %	Стимулирующая добавка	Концентрация биомассы, ×10 ⁹ м.к./мл	Прирост биомассы* за (24±1) ч	Коэффициент жизнеспособности, %
0,320±0,1	глюкоза+пантотенат кальция+хлорид натрия	61,3±1,5	185,5±1,1	96,8±3,75
	глюкоза+пантотенат кальция+цистеин+хлорид натрия	100,0±2,0	268,3±1,3	94,6±3,7
	глюкоза+глюконат кальция	52,0±1,0	86,7±0,8	31,5±1,5

Примечание. *Прирост биомассы указан в относительных единицах, за единицу взята концентрация исходной культуры, точность измерения 5 %.

Логичным этапом работы была апробация разработанной питательной среды на основе ФГФ при аппаратном глубинном культивировании штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в ферментерах с рабочими объемами 1,0 и 50 л.

Параметры культивирования в лабораторном биореакторе с рабочим объемом 1,0 л были приняты следующие: скорость перемешивания (250 ± 50) об/мин, температура 37°C . Аэрацию проводили воздухом в количестве (0,7-1,0) л на 1 л питательной среды в течение всего времени культивирования, за исключением первых 4 ч и последнего часа, когда ее значения были 0,5 л на 1,0 л среды. Коррекцию pH не проводили, поскольку наблюдаемый диапазон соответствовал оптимуму роста туляремийного микроба. В качестве посевного материала использовали 48-часовую агаровую культуру, начальная концентрация клеток составляла $(0,8 \pm 0,1) \times 10^9$ м.к./мл среды, коэффициент жизнеспособности – $(51 \pm 0,5) \%$.

При культивировании без подкормки время культивирования составило (22 ± 1) ч. Максимальная концентрация наблюдалась на 20 ч выращивания и составила $(14,5 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к. на 1 мл среды. Эффективность культивирования по приросту биомассы составила 17 раз. При культивировании вакцинного штамма туляремийного микроба с подкормкой выход биомассы увеличился на 100 %, время достижения максимума концентрации уменьшилось на 2 ч. Эффективность культивирования по приросту биомассы составила 24 раза.

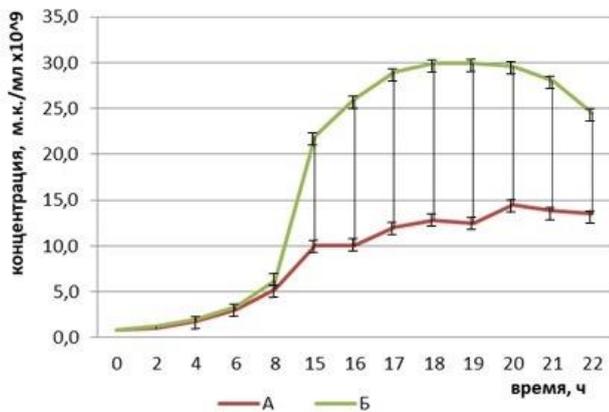


Рисунок 1 – Кривая роста *F. tularensis* 15 НИИЭГ в лабораторном ферментере
А – без подкормки,
Б – с подкормкой 40 % глюкозой

После окончания процесса культивирования в биореакторе с рабочим объемом 1,0 л нативная культура вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ имела следующие характеристики: pH ($6,8 \pm 0,1$), концентрация микробных клеток $(30 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл среды, показатель жизнеспособности составил $(96 \pm 0,5) \%$. Степень диссоциации составляла $(92 \pm 1) \%$ SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших.

Наибольший выход биомассы при культивировании в биореакторе с рабочим объемом 50 л был достигнут при следующих параметрах культивирования: pH среды ($7,1 \pm 1,0$), температура ($37 \pm 0,5$) $^\circ\text{C}$, аэрация среды ($0,65 \pm 0,15$) л/мин, скорость вращения мешалки (400 ± 100) об/мин. Содержание растворенного кислорода в среде поддерживали на уровне $(45 \pm 5) \%$. В качестве посевного материала использовали 16-часовую бульонную культуру со следующими характеристиками: начальная концентрация клеток – $(2 \pm 0,2) \times 10^9$ м.к./мл среды, коэффициент жизнеспособности – $(72 \pm 2) \%$, степень диссоциации – $(98 \pm 1) \%$ SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших. Подкормку осуществляли с четвертого часа и прекращали за один час до окончания культивирования. Время культивирования составило 10 ч при эффективности культивирования по приросту биомассы, равной 17 раз (рисунок 2). В качестве посевного материала использовали 16-часовую бульонную культуру, начальная концентрация клеток составляла 2×10^9 м.к./мл среды.

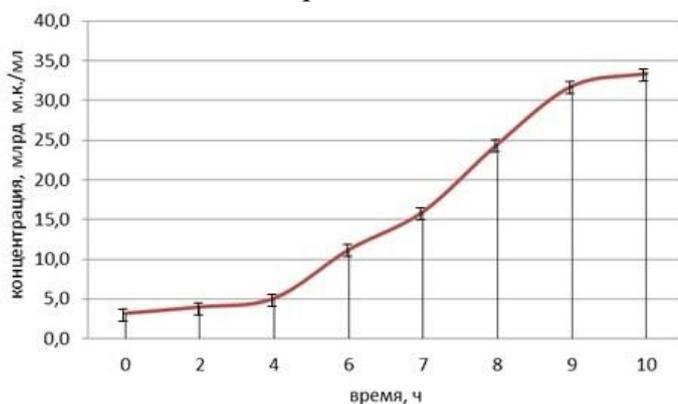


Рисунок 2 – Кривая роста *F. tularensis* 15 НИИЭГ при глубинном культивировании в пилотном биореакторе F3-50 Bionet

После окончания процесса культивирования в биореакторе с рабочим объемом 50 л нативная культура

вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ имела следующие характеристики: рН ($6,8 \pm 0,1$), концентрация – $(33 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл, жизнеспособность составила ($94 \pm 0,5$) %, степень диссоциации – (89 ± 1) % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших. Эффективность культивирования по простоту биомассы составила 17 раз.

Таким образом, глубинное аппаратное культивирование *F. tularensis* 15 НИИЭГ в жидкой питательной среде на основе ФГФ с экспериментально обоснованным ее качественным и количественным составом, а также предложенные технологические параметры реализации данного процесса обеспечили увеличение биомассы в 17-24 раза.

Анализ сведений научной литературы выявил применимость для концентрирования живых бактериальных культур метода тангенциальной фильтрации с использованием микрофильтрационных мембран с порогом отсечки 0,2 мкм. Поэтому для разработки технологии концентрирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ был апробирован именно данный метод. Из достаточно широкого спектра микрофильтрационных мембран мы остановили свой выбор на Vivaflow 200. Была предложена следующая методика проведения процесса, складывающаяся из ряда последовательно выполняющихся операций: промывка мембраны от консервирующего средства, стерилизация мембраны, проведение процесса фильтрации (непосредственно концентрирование), дезинфекция мембраны, очистка мембраны от остатков концентрируемого продукта, консервация мембраны.

Первая и последняя операции проводилась в соответствии с эксплуатационной документацией на фильтрационное оборудование: промывка с помощью циркуляции на проток очищенной воды (из расчёта не менее $10,0 \text{ дм}^3$ на $0,1 \text{ м}^2$ фильтрующей поверхности при условии полного заполнения системы); консервации мембраны – циркуляцией $1,0 \text{ дм}^3$ 5 % раствора этилового спирта через установку в течение 1 часа.

Для стерилизации установки для концентрирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ успешно применен следующий методический прием – стерилизация фильтрационной установки 6 % раствором перекиси водорода путем его рециркуляции в течение 0,5 ч.

Для оценки возможности применения метода тангенциальной фильтрации туляремийного микроба использовали культуру вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученную при ее глубинном культивировании в колбах Эрленмейера (2000 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе. Объем питательной среды составлял (500 ± 10) мл, температура культивирования (37 ± 1) °С, скорость вращения платформы – (150 ± 10) об/мин, время культивирования (24 ± 1) ч, посевная доза составляла $(0,8 \pm 0,1) \times 10^9$ м.к./мл среды, посевная культура имела коэффициент жизнеспособности – ($53 \pm 0,5$) %. Процесс концентрирования осуществляли с применением микрофильтрационного модуля с порогом отсечки 0,2 мкм. Процедуру прекращали при четырехкратном уменьшении объема нативной культуры *F. tularensis*.

Качественно-количественные характеристики туляремийного микроба до и после процесса концентрирования изложены в таблице 3. Анализ данных таблицы показывает, что в полученном концентрате не происходило ухудшения характеристик (в сравнении с нативной культурой вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ после глубинного культивирования). В частности, рН и коэффициент жизнеспособности остаются на прежнем уровне, не происходит контаминации посторонней микрофлорой, а также увеличивается в 4 раза концентрация микробных клеток.

Таблица 3 – Результаты концентрирования биомассы туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ (n=3)

Показатели качества	Культура вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	
	До концентрирования	После концентрирования
рН	$7,0 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,1$
Концентрация микробных клеток, $\times 10^9$ м.к./мл	$35 \pm 0,5$	$135 \pm 1,0$
Жизнеспособность, % живых м.к.	$64 \pm 0,1$	$60 \pm 0,1$
Степень диссоциации, % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших	98 ± 1	98 ± 1
Посторонняя микрофлора	отсутствует	отсутствует

Следует отметить, что контроль специфической стерильности фильтрата свидетельствовал об отсутствии в нем туляремийного микроба, что говорит о правильном подборе размера пор мембран.

Таким образом, представленные данные подтверждают возможность применения сконцентрированной фильтрацией в тангенциальном потоке суспензии культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в качестве полуфабриката для изготовления живой туляремийной вакцины. Поскольку кратность концентрирования – регулируемый параметр, то возможно использование данного технологического приема для стандартизации биомассы по показателю «концентрация» микробных клеток независимо от эффективности этапа культивирования.

Для получения лабораторных серий вакцины 005, 006, 009, 010 по вышеназванным приемам осуществляли концентрирование суспензии культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Качественно-количественные характеристики туляремийного микроба до и после процесса концентрирования изложены в таблице 4. Анализ данных таблицы показывает, что в полученном концентрате не произошло ухудшения характеристик (в сравнении с нативной культурой вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ после глубинного культивирования), при увеличении в 4 раза концентрации микробных клеток.

Таблица 4 – Результаты концентрирования биомассы туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ в производственном процессе получения лабораторных серий вакцины 005, 006, 009, 010

Показатели качества	Культура вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ							
	До концентрирования				После концентрирования			
	Номера серий							
	005	006	009	010	005	006	009	010
рН	7,0							
Концентрация микробных клеток, $\times 10^9$ м.к./мл	35	33	30	33	138	135	124	134
Жизнеспособность, % живых м.к.	62	60	63	61	61	60	62	60
Степень диссоциации, % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших	97	97	94	90	96	97	93	89
Посторонняя микрофлора	отсутствует							

Для получения концентратов биомассы туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ с целью производства лабораторных серий вакцины 01/Э, 02/Э, 03/Э использовали культуру туляремийного микроба, полученную в результате культивирования в пилотном биореакторе F3-50 Bionet. Полученные данные представлены в таблице 5 и свидетельствуют о пригодности полученного концентрата в качестве полуфабриката для изготовления живой туляремийной вакцины.

Таблица 5 – Результаты концентрирования биомассы туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ в производственном процессе получения лабораторных серий вакцины 01/Э, 02/Э, 03/Э

Показатели качества	Культура вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ					
	До концентрирования			После концентрирования		
	Номера серий					
	01/Э	02/Э	03/Э	01/Э	02/Э	03/Э
рН	6,8	6,7	6,9	6,9	6,8	7,0
Концентрация микробных клеток, $\times 10^9$ м.к./мл	31	33	31	125	135	128
Жизнеспособность, % живых м.к.	91	94	93	90	94	92
Степень диссоциации, % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших	89	88	90	89	87	89
Посторонняя микрофлора	отсутствует					

С целью освобождения от остатков питательной среды в концентрате клеточной массы была проведена работа по получению очищенной микробной суспензии *F. tularensis* 15 НИИЭГ, для чего в полученный концентрат клеточной массы добавляли стерильный 0,9 % раствор хлористого натрия рН (7,2±0,1) до восстановления исходного объема нативной культуры. Затем повторно проводили процесс концентрирования до сокращения объема микробного осадка в четыре раза. Полученный концентрат «отмытых» микробных клеток туляремийного микроба был пригоден по всем показателям качества (рН, концентрация микробных клеток, коэффициент жизнеспособности, отсутствие посторонней микрофлоры) для получения ЖТВ.

Для интенсификации режима проведения фильтрации были проведены исследования с вариацией давления на входе продукта в фильтрационную установку. Выявлена максимальная производительность процесса при давлении, равным (2,5±0,1) кгс/см².

Для обеспечения биологической безопасности при концентрировании *F. tularensis* 15 НИИЭГ были отработаны режимы дезинфекции фильтрационной установки. Показана целесообразность проведения обеззараживания следующим образом: рециркуляция через фильтрационную установку 3 % раствора перекиси водорода в течение 1 ч или 6 % раствора с рециркуляцией в течение 0,5 ч с последующей экспозицией на протяжении (17±1) ч.

Для осуществления процедуры очистки микрофильтрационной мембраны успешно применен 1 % раствор «Р-3 ультрасил 11». Показано, что рециркуляция 1,0 дм³ чистящего раствора через установку в течение 0,5 ч обеспечивает очистку микрофильтрационной мембраны.

Значимый научно-практический интерес представляло сравнительное изучение седиментационного, центробежного и фильтрационного методов концентрирования биомассы *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Данные экспериментов позволили сделать вывод о том, что использование микрофильтрации позволяет достигнуть 10-кратное увеличение концентрации микробов в суспензии, при этом время протекания технологического процесса при объеме исходного материала, равным 1,0 дм³, составило не более 1 ч. При применении седиментации 10-кратная степень концентрирования не была достигнута и через 39 сут (время наблюдения). В полуфабрикаты вакцинного препарата, произведенном методом мембранного разделения, не происходило ухудшения характеристик в сравнении с нативной культурой *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученной после ее глубинного культивирования. При использовании центробежного метода 10-кратная степень концентрирования достигалась за то же время, что и при тангенциальной фильтрации. Но жизнеспособность микробной суспензии снижалась на 40 % (таблица 6). Также к недостаткам технологии концентрирования как центробежным, так и седиментационным способами отнесено наличие в надосадочной жидкости клеток *F. tularensis*, что не наблюдалось в фильтрате, полученном после микрофильтрации.

Таблица 6 – Результаты исследований по сравнению методов концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ (n=3)

Метод концентрирования	После концентрирования		
	Концентрация, ×10 ⁹ м.к./мл	Жизнеспособность, % живых м.к.	Степень диссоциации, % (количество SR (белых) колоний)
Центрифугирование	270,9±0,9	58,9±2,2	87,2±2,2
Тангенциальная фильтрация	315,9±0,9	98,2±0,2	81,3±0,5
Седиментация (до ½ объема)	27,2±0,5	85,5±0,5	50±1

В рамках исследований, представленных в главе 3, нашло свое место определение условий и времени хранения концентратов биомассы туляремийного микроба перед проведением процедуры лиофилизации. Исследованы два температурных интервала хранения – от 2 до 8 °С и от 18 до 24 °С. Показано, что оптимальное время хранения концентрированной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ при комнатной температуре составляет не более 3-х сут, в условиях холодильника – не более 6 сут.

Исследование свойств лиофилизатов ЖТВ, полученной с применением разработанных технологических приемов культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ и концентрирования микрофильтрацией, выявило, что после высушивания происходило снижение показателя «жизнеспособность», в среднем, на 30 %. Также параметр «Термостабильность» не соответствовал нормируемым требованиям. Анализ стабильности препарата в течение 2 лет показал, что жизнеспособность снижается до 30-35 % к концу первого года

и до 10-15 % к концу второго года хранения при температуре от 2 до 8 °С. Высказано предположение о том, что это может быть связано с неоптимальными составом среды высушивания (применялась нормируемая ФС.3.3.1.0019.15 «Вакцина туляремийная живая») и условиями сушки препарата, полученного по новым технологическим приемам культивирования и концентрирования, а также запайки ампул (без вакуума).

Позволительно, с определенной долей уверенности, утверждать о востребованности экспериментально разработанных технологических решениях культивирования вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и концентрирования ее биомассы при производстве других живых вакцин.

Глава 4 посвящена разработке технологии сублимационного высушивания туляремийного микроба *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Основываясь на неудовлетворительных результатах сублимационной сушки ЖТВ, полученной с применением разработанных технологических приемов культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ и концентрирования микрофильтрацией были проведены эксперименты по совершенствованию технологии лиофилизации. Первым шагом экспериментов, было осуществление подбора защитных сред высушивания.

Было апробировано 5 вариантов биофармацевтической композиции, содержащих $(20 \pm 10) \times 10^9$ м.к. туляремийного микроба и вспомогательные вещества; трегалоза, декстран, агар-агар в различных концентрациях. Полуфабрикаты вакцины (концентрат вакцинного штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, полученный методом тангенциальной микрофильтрации) разливали по 1 мл в стеклянные флаконы вместимостью 10 мл.

Полученные лиофилизаты были проконтролированы по следующим показателям: внешний вид препарата, остаточная влажность, растворимость, рН, седиментационная устойчивость. Кроме того, флаконы проверяли на наличие вакуума. Во всех флаконах имелся вакуум, значения рН и потери в массе при высушивании находились в нормируемых пределах. Тем не менее, все препараты были отбракованы по следующим показателям: «внешний вид» из-за «вспенивания» лиофилизата и уменьшения объема таблетки, а также отслоения ее от стенок флакона; время растворения и седиментационной устойчивости. Нами было высказано предположение о том, что данный эффект может наблюдаться по следующим причинам: недостаточные высота высушиваемого материала и (или) количество декстрана.

На дальнейшем этапе исследований мы применили следующие варианты сред высушивания: вариант А: трегалоза – 0,1, декстран – 0,0002, агар-агар – 0,0025; вариант В: трегалоза – 0,1, декстран – 0,0002; вариант С: трегалоза – 0,1, декстран – 0,01, агар-агар – 0,0025; вариант D: трегалоза – 0,1, декстран – 0,02; вариант Е: трегалоза – 0,1, декстран – 0,0, хитозан – 0,02. Отличиями методических подходов данного шага исследований были: в 1 мл суспензии было $(10 \pm 5) \times 10^9$ клеток туляремийного микроба, препарат разливали по 2 мл во флаконы. Кроме того, была предпринята попытка использования нового компонента среды высушивания – хитозана.

Характеристики полученных продуктов (потеря в массе при высушивании, время растворения и седиментационной устойчивости, рН, наличие вакуума) соответствовали нормируемым требованиям. У препарата В зафиксировано уменьшение объема таблетки лиофилизата и отслоение ее от стенок флакона. В препарате Е показатель «растворимость» обладал более лучшими значениями – 20 с. У других лиофилизатов он лежал в пределах от 90 до 150 с. Кроме того, в препарате Е не зафиксировано расслоения в течение более 1 ч (время наблюдения). У других образцов данный эффект наблюдался в промежутке времени от 10 до 30 мин. Основываясь на полученных результатах, было отдано предпочтение для дальнейших исследований следующей биофармацевтической композиции (состав приведен на 1 мл): клетки штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ – $(10 \pm 5) \times 10^9$ м.к.; и вспомогательные вещества: трегалоза – 0,1 г; декстран – 0,01 г; хитозан – 0,02 г.

В результате определения эвтектических температур ЖТВ с новым биофармацевтическим составом были получены следующие результаты: температура полного замерзания – минус 40 °С, нижняя и верхняя эвтектическая температуры – минус 35 °С и минус 25 °С, что было сопоставимо с биофармацевтическим составом коммерческой вакцины. В практическом плане знание этих температур позволяет сделать вывод о целесообразности замораживания препарата до минус 40 °С, а также проведения процесса первичной сублимации при значениях температуры, лежащих в интервале от минус 35 °С до минус 25 °С.

Одним из этапов исследований в рамках главы 4 было изучение влияния продолжительности замораживания на качество лиофилизатов туляремийной вакцины. Флаконы с препаратом замораживали до

температуры материала минус (40 ± 5) °С на полках сублимационной сушильной установки. При этой температуре материал выдерживали в течение следующих промежутков времени: 2-3 ч, 5-6 ч, 10-11 ч, 15-16 ч, 23-24 ч и далее высушивали. Оценку влияния времени замораживания на качество лиофилизатов проводили по следующим показателям: внешний вид препарата, остаточная влажность, растворимость, рН, седиментационная устойчивость, жизнеспособность. Значения всех показателей соответствовали нормируемым требованиям, что позволило сделать вывод об одинаковом влиянии времени замораживания на показатели лиофилизатов. В практическом плане это дает возможность варьировать временем начала сублимационного высушивания.

По предложенным методическим приемам лиофилизации была получена лабораторная серия туляремийной вакцины и исследованы ее нормируемые показатели, которые соответствовали требованиям ФС.3.3.1.0019.15 «Вакцина туляремийная живая».

Таким образом, позволительно утверждать о том, что разработанная биофармацевтическая композиция ЖТВ и экспериментально обоснованные параметры ее сублимационного высушивания дают возможность производить лиофилизат препарата, соответствующий нормируемым характеристикам.

Результаты, полученные при разработке технологии сублимационного высушивания туляремийного микроба *F. tularensis* 15 НИИЭГ, обладают потенциалом применения при получении лиофилизированных форм бактериальных препаратов.

В главе 5 отражены результаты исследований по обоснованию возможности применения альтернативных методов контроля на этапах получения лиофилизата бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Первоначально оценивали возможности использования новых инструментальных методов контроля туляремийного микроба на этапах получения туляремийной вакцины. ЭО мониторинг физиологического состояния бактериальных клеток проводили на полностью автоматизированной аналитической установке EloTracе. Измерения проводили на всех стадиях получения ЭЖТВ. Основным измеряемым параметром являлась АП, измеряемая в условных единицах.

В ходе проведенного нами эксперимента было изучено изменение размера клеток, показатели анизотропии поляризуемости и «жизнеспособность» клеток *F. tularensis* в культуре в зависимости от технологической стадии подготовки клеточной массы и лиофилизации.

ЭО мониторинг показал, что размер клеток составляет в среднем $(1,2\pm 0,1)$ мкм. Отмечена высокая степень корреляции между показателями анизотропии поляризуемости клетки при частотах 900 кГц и 2100 кГц, отражающих состояние цитоплазмы и цитоплазматической мембраны, соответственно. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,98. Использование агаровой или бульонной культуры, замена питательной среды в клеточной суспензии на 0,9 % раствор хлористого натрия, добавление сред высушивания не оказывали значительного влияния на данный показатель.

Были определены критерии применимости ЭО мониторинга для оценки физиологического состояния клеток туляремийного микроба. Рабочий диапазон показателя АП составил от 0 до 200 условных единиц (таблица 7).

Таблица 7 – Корреляция показателей АП клеток и «жизнеспособность» культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ (n=3)

Диапазон АП, усл. ед.		Жизнеспособность, %	Коэффициент корреляции Пирсона
900 кГц	2100 кГц		
0-20	0-20	0-10	0,82
21-80	21-80	25-70	0,94
81-200	81-200	71-100	0,96
>201	>201	0-10	0,8

ЭО мониторинг процесса глубинного культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ на питательных средах на основе ФГФ и ПГРМ показал, что показатель АП в обоих случаях свидетельствовал о высокой жизнеспособности культуры, ее стандартности (таблица 8).

Возможность учета в режиме «реального времени» по показателю «оптическая плотность» динамики накопления биомассы, наряду с данными АП и размера клеток, свидетельствуют о перспективности дан-

ного метода для экспериментальных исследований по оптимизации условий культивирования туляремийного микроба.

Таблица 8 – Электрооптический мониторинг процесса культивирования *F. tularensis* 15НИИЭГ в разных питательных средах в колбах «качалочным методом» (n=3)

Почасовые пробы	OD ₆₅₀₋₇₀₀ nm	АП, усл.ед 2100 кГц	Средний размер клеток, мкм
Среда № 1 18ч	2,147	170,09	1,221
Среда № 1 24ч	1,67	135,57	1,101
Среда № 2 18ч	0,626	176,88	1,101
Среда № 2 24ч	0,724	167,4	1,101

На следующем этапе проводили ЭО мониторинг процесса глубинного культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ на среде на основе ФГФ. Было выявлено, что показатель АП цитоплазмы более лабилен, чем АП цитоплазматической мембраны, хотя динамика изменений обоих показателей соответствует кривой роста культуры. Спустя 6 часов АП достигала своего пика, а спустя 8 часов жизнеспособность культуры снижалась, после чего снова происходил скачок (18 часов), а затем окончательное угнетение жизнеспособности (рисунок 3).

При измерении оптической плотности среды так же были заметны изменения, но с опозданием в 2 часа. Так, плотность среды достигала своего максимума лишь к 8 часу культивирования, после чего происходило уменьшение плотности, а затем снова рост. Через 22 часа снова наступало снижение оптической плотности, достигая своего минимума к 24 часам (рисунок 4). Таким образом, можно говорить о том, что ЭО мониторинг «предсказывает» снижение клеточной массы, связанное, скорее всего, с недостатком питательных веществ.

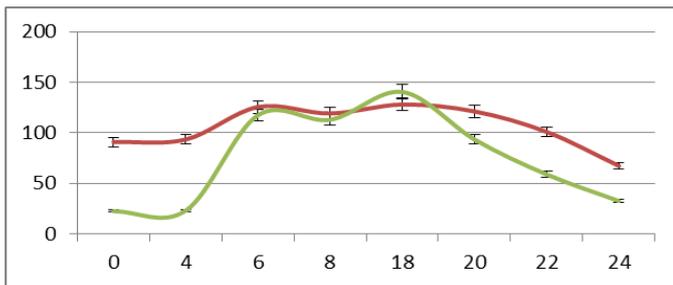


Рисунок 3 – Изменение АП клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ в процессе глубинного культивирования на частоте 2100 кГц (красная линия) и 900 кГц (зеленая линия).
Ось ординат – показатель АП, ось абсцисс – время, ч.

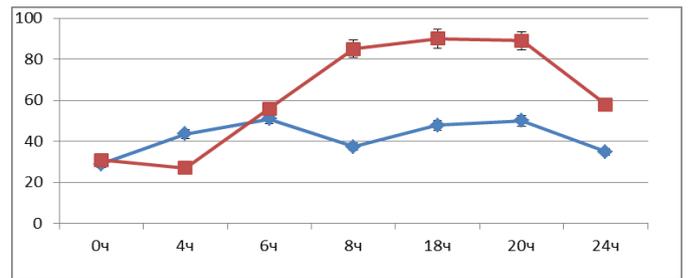


Рисунок 4 – Динамика показателей «концентрация» и «жизнеспособность» клеток вакцинного штамма в процессе глубинного культивирования
Синяя линия – оптическая плотность при 650 нм ($\times 10^{-3}$), красная – жизнеспособность (%)

На следующем этапе исследовали влияние условий концентрирования и лиофилизации на физиологическое состояние клеток туляремийного микроба (таблица 9). Известно, что применение среды высушивания нужно для предотвращения разрушения клеток при замораживании, лиофилизации и длительном хранении за счет стабилизации конформационного состояния белковых молекул. В то же время, показатели АП в концентрированной и сведенной со средой высушивания биомассе уменьшались, несмотря на высокую жизнеспособность клеток. Это может быть связано со снижением поляризуемости бактериальной клетки при увеличении ионной силы раствора (соли в концентратах и в средах высушивания).

Изменение размера клеток *F. tularensis* изучали также методом АСМ (таблица 10, рисунок 5). Размер клеток составлял в среднем $(1,0 \pm 0,1)$ мкм для всех исследованных образцов, что согласуется с данными ЭО мониторинга. Расхождение в линейных размерах (16-20 %) связано с пробоподготовкой при проведении АСМ – измерения проводятся на высушенных препаратах. Кроме того, анализ образца биомассы после добавления среды высушивания провести не удалось в связи с вязкостью образца. После лиофилизации лабораторные серии вакцины также были проанализированы методом АСМ. В последнем случае образцы разводили водой для инъекций до концентрации 5×10^9 м.к./мл.

Таблица 9 – Показатели физиологического состояния клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на этапах культивирования, концентрирования и сведения со средами высушивания (n=3)

Проба	Концентрация, $\times 10^9$ м.к./мл	Жизнеспособность, %	Показатель АП		Средний размер клеток, мкм
			900 кГц	2100 кГц	
Агаровая культура	4,8±0,5	30±1	22,4	90,83	1,1±0,01
Бульонная культура (лаг-фаза)	6,2±0,5	27±1	23,07	93,39	1,3±0,03
Бульонная культура (лог-фаза)	26±1	85±1	112,95	119,17	1,9±0,04
Бульонная культура (стационарная фаза)	30±1	89±1	93,31	121,16	1,2±0,01
Бульонная культура (фаза отмирания)	20±1	58±1	32,41	67,25	1,3±0,03
Концентрат биомассы	100±1	98±1	50,34	32,46	1,2±0,01
Биомасса + среда высушивания*	25±1	89±1	57,57	35,8	1,9±0,07

Примечание: * – в качестве среды высушивания использовали экспериментальную среду высушивания с хитозаном.

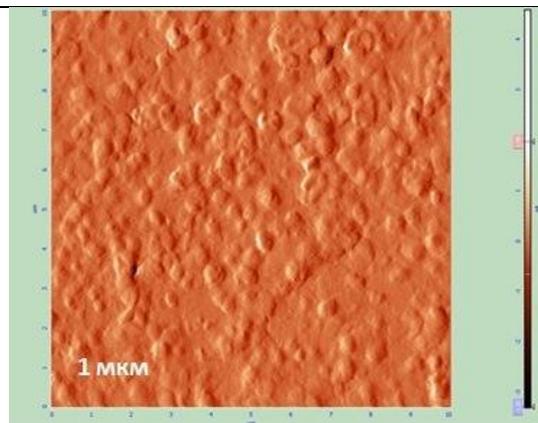


Рисунок 5 – Результаты АСМ образца лабораторной серии 03/Э ЭЖТВ, метод рассогласования

Таблица 10 – Результаты морфометрического анализа клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом АСМ (n=3)

Образец	Характеристика образца	Длина клеток L, мкм	Шероховатость поверхности клеток, нм	Ригидность клеточной стенки W/H	Коэффициент вытянутости L/W
1.	Агаровая культура	0,91±0,07	14±2	5,19±0,8	1,73±0,1
2.	Бульонная культура	0,89±0,08	12±1	8,02±0,6	1,91±0,1
3.	Концентрат биомассы	1,04±0,08	15±2	8,62±1,9	1,49±0,2
4.	Лабораторная серия ЭЖТВ 01/Э	1,07±0,07	15±1	4,74±0,4	1,32±0,1
5.	Лабораторная серия ЭЖТВ 03/Э	0,98±0,1	18±2	4,56±0,5	1,36±0,1

Были изучены показатели ригидности и шероховатости клеточной стенки, по которым образцы вакцины были сопоставимы со значениями, полученными для нелиофилизированных образцов, что свидетельствовало об отсутствии повреждающего действия на бактериальные клетки среды высушивания и предложенных технологических параметров процесса сушки.

Было выявлено, что время, затраченное на проведение стандартного микробиологического анализа, составляет 5-6 сут, АСМ – 2-4 ч, ЭО мониторинга – 30-60 мин. Таким образом, ЭО метод мониторинга физиологического состояния микробной популяции туляремийного микроба дает возможность оперативно анализировать показатели «жизнеспособность» и «концентрация» клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата.

Последним этапом исследований, проведенных в рамках главы 5, было – экспериментальная оценка возможности использования иммунохимических и молекулярно-генетических методов контроля культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, в частности, для определения показателя «подлинность».

Для проведения молекулярно-генетического анализа подлинности туляремийного микроба использовали ПЦР с электрофоретическим учетом результатов с коммерческим набором реагентов для выделения ДНК и для постановки ПЦР. Для исследования были взяты культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ с разных этапов получения ЭЖТВ: агаровая и бульонная культура, концентрат биомассы, образцы лабораторных серий ЭЖТВ. В результате было установлено, что исследуемые образцы имели положительный результат ПЦР, что свидетельствовало о подлинности культуры туляремийного микроба и ее стабильности на всех стадиях получения ЭЖТВ (рисунок 6).

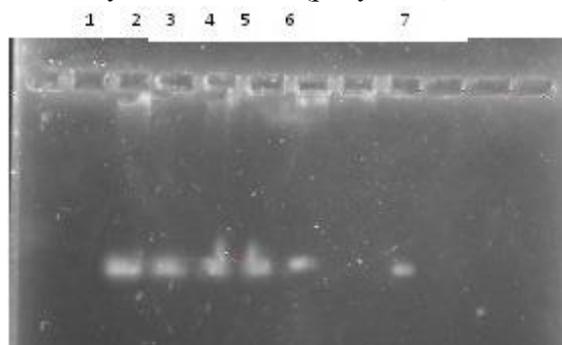


Рисунок 6 – Результаты ПЦР с набором реагентов «Ген Francisella tularensis – РЭФ» образцов клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ на стадиях получения ЭЖТВ

- 1 – отрицательный контроль; 2, 3, 4 – образцы лабораторных серий ЭЖТВ;
5 – бульонная культура *F.tularensis* 15 НИИЭГ; 6 – агаровая культура *F.tularensis* 15 НИИЭГ;
7 – положительный контроль

В качестве иммунохимических методов были апробированы следующие: с использованием диагностических препаратов для детекции туляремийного микроба, которые выпускаются и зарегистрированы на территории Российской Федерации: ИХ-тест и набор для постановки РНГА; с использованием экспериментальных иммуноглобулинов к антигенам туляремийного микроба: твердофазный ИФА и иммуноблоттинг с коммерческими антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена; ДИА-ЗНЧ с белком А, конъюгированным с золотыми наночастицами

С помощью набора «ИХ тест-система *F.tularensis*» были исследованы образцы лабораторных серий вакцины. Все исследованные образцы имели положительную реакцию в ИХ-тесте. Более четкие и быстрые результаты были получены с неинактивированными образцами в концентрации 10^8 м.к./мл (рисунок 7).

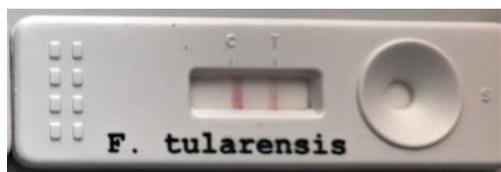


Рисунок 7 – Результаты ИХ-теста лабораторной серии вакцины с.03/Э с набором реагентов иммунохроматографической тест-системы для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии «ИХ тест-система *F.tularensis*»

При постановке РНГА с помощью набора реагентов «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ» макро и микрометодом был отмечен высокий уровень специфической активности в образцах лабораторных серий вакцины. Вариант РНГА микрометодом оказался предпочтительнее макрометода в связи с большей экспрессностью, меньшим расходом материала и наглядностью

При постановке ИФА и ДИА-ЗНЧ в качестве специфических антител использовали экспериментальные кроличьи иммуноглобулины к протективному антигенному комплексу туляремийного микроба. По результатам ИФА образцов ЭЖТВ, бульонной культуры и концентрата биомассы туляремийного микроба

было установлено, что культура *F.tularensis* 15 НИИЭГ выявлялась в концентрации 10^6 - 5×10^5 м.к./мл для лиофилизатов лабораторных серий, до 3×10^4 м.к./мл для концентратов биомассы. По результатам реакции ДИА-ЗНЧ была отмечена положительная реакция у всех образцов в концентрации 10^8 - 10^7 м.к./мл (рисунок 8), что сопоставимо с результатами ИХ-теста.

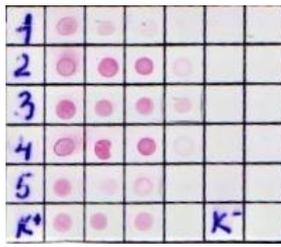


Рисунок 8 – Результаты ДИА-ЗНЧ
 1,2, 3 – образцы лабораторных серий ЭЖТВ;
 4 – концентрат бульонной культуры *F.tularensis* 15 НИИЭГ; 5 – бульонная культура *F.tularensis* 15 НИИЭГ;
 K⁺ – положительный контроль;
 последний столбик – отрицательный контроль

Также апробирован метод иммуноблоттинга образцов ЭЖТВ, в качестве специфических антител использовали экспериментальные кроличьи иммуноглобулины к ПАК. Во всех образцах было отмечено наличие основных иммуногенных белков протективного антигенного комплекса. Профиль образцов лабораторных серий соответствовал иммуноблоттингу клеток вакцинного штамма с иммуноглобулином к ПАК. Полученные результаты свидетельствуют об идентичности использованных образцов, а также об их специфической активности, что делает данный методический подход перспективным для контроля живых вакцин, в т.ч. «классических» аттенуированных.

Результаты исследований, представленных в главе 5, позволяют, с определенной долей уверенности, утверждать, что разработка комплексного подхода к использованию новых методов в сочетании со стандартными микробиологическими методами позволит упростить и ускорить этапы контроля состояния бактериальной культуры при внедрении новых технологических приемов культивирования, концентрирования и лиофилизации клеток вакцинных штаммов

В заключительной главе 6 собственных исследований изучали свойства 3-х серий готовой лекарственной формы ЖТВ, полученных по лабораторной технологии, а также проводили сопоставление технологической эффективности экспериментально обоснованных биотехнологических этапов получения живой туляремийной вакцины в сравнении с действующей технологией.

В результате проведенного анализа физико-химических свойств, специфической активности, количества доз и микробиологической чистоты было установлено, что все серии препарата полностью соответствует предъявляемым требованиям ФС.3.3.1.0019.15 «Вакцина туляремийная живая».

На этапе изучения иммунобиологических свойств лабораторных серий ЖТВ изучались: иммуногенность, реактогенность и остаточная вирулентность с использованием биомоделей, а также специфическая безопасность и прививаемость.

В результате оценки реактогенности лабораторных серий вакцины по показателю «острая» токсичность на модели беспородных белых мышей было установлено, что экспериментальный препарат не вызывает гибели животных. Незначительное снижение массы тела наблюдалось на 5-7 сут с последующей нормализацией к 10 сут. Динамика массы тела биомоделей, вакцинированных лабораторными сериями вакцины была аналогична таковому показателю у контрольной группы животных, вакцинированных коммерческой вакциной.

При изучении показателя «остаточная вирулентность», осуществленного на белых мышях BALB/c обоего пола было установлено, что все культуры вакцинного штамма имели остаточную вирулентность в пределах от $1,7 \times 10^3$ до 10^6 м.к. при норме 1×10^2 - 2×10^6 м.к.

У вакцинированных мышей была определена динамика нарастания концентрации антител к антигенам *F. tularensis*. Было показано, что реципрокные титры антител после иммунизации экспериментальными сериями вакцины достигали наибольших значений на 21-е сут (рисунок 9).

Была изучена персистенция бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ в организме белых мышей, иммунизированных подкожно 2-х суточной культурой лиофилизатов лабораторных серий вакцины в количестве 0,2 мл в дозах 100 м.к. Было выявлено, что максимальная обсемененность селезенки наблюдалась на 7-е сут во всех группах без достоверных отличий. На 14-е сут наблюдалось резкое снижение обсемененности в 2 раза, а на 21-е сут после иммунизации лабораторными сериями вакцины туляремийный микроб уже не обнаруживали, что свидетельствовало о том, что количество бактерий в селезенке меньше 25 КОЕ.

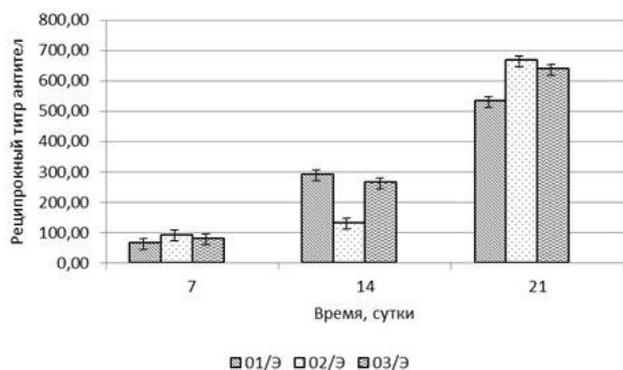


Рисунок 9 – Влияние препарата вакцины на динамику уровня индукции специфических антител у вакцинированных мышей

Результаты изучения протективной активности лабораторных серий вакцины, осуществленной на мышах линии BALB/c на 30-е сут после иммунизации, показали, что вакцина лабораторных серий обладала высокой защитной эффективностью. При этом протективная активность лабораторных серий вакцины была сопоставима в сравнении с зарегистрированной ЖТВ серии 019 (таблица 11).

Таблица 11 – Иммуногенность лабораторных серий живой туляремийной вакцины для мышей линии BALB/c при экспериментальной туляремии (n=10)

Серия препарата	Иммунизирующая доза, м.к.	Заражающая доза, м.к.	% выживших	Средняя продолжительность жизни, сут
01/Э	1×10^2	1×10^3	100	>21,0
02/Э	1×10^2		100	>21,0
03/Э	1×10^2		100	>21,0
Положительный контроль	1×10^2		60	11,9
Отрицательный контроль	0		0	6,4

Также было выявлено, что такие характеристики вакцины, как специфическая безопасность и прививаемость находятся в допустимых пределах.

С учетом проведенных исследований предложена следующая технологическая схема производства ЖТВ (рисунок 10а). Для сравнения технологическая схема действующего производства ЖТВ представлена на рисунке 10б.

В результате сопоставления технологической эффективности экспериментально обоснованных биотехнологических этапов получения ЖТВ в сравнении с действующей технологией выявлены следующие преимущества предложенных нами решений:

время получения бактериальной культуры *F. tularensis* III генерации меньше в 3 раза;

для стадии глубинного аппаратного культивирования *F. tularensis*: повышение эффективности процесса более чем в 5 раз, уменьшение времени выращивания в 2 раза, однородность популяции микроорганизмов и возможность управления процессом, получение за один цикл культивирования 50 л культуры туляремийного микроба с концентрацией $(33 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл против 12,5 л с концентрацией $(13,5 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл. Это позволяет в 10 раз увеличить количество культуры *F. tularensis*, пригодной в дальнейшем для ее лиофилизации. Несомненным достоинством нашей технологии является экспериментальное обоснование внедрения ЭО мониторинга для оперативного контроля такой характеристики, как «жизнеспособность» туляремийного микроба. Это дает возможность технологу получать информацию в режиме реального времени с целью оперативного воздействия на технологический процесс;

внедрение стадии концентрирования культуры *F. tularensis* тангенциальной микрофильтрацией в производственный процесс получения ЖТВ позволяет: использовать биомассу после процесса ее накопления в случае недостаточной для приготовления готовой лекарственной формы концентрации микроорганизма; дает возможность применения данного технологического приема для стандартизации биомассы по показателю «концентрация» микробных клеток независимо от эффективности этапа культивирования;

выявлена перспективность разработанных методических приемов на этапе герметизации полуфабриката ЖТВ для увеличения мощности производства и устранения таких недостатков как: возможность кон-

таминации препарата при выгрузке ампул после лиофилизации и в процессе их запаивания, а также применения горючих газов при герметизации ампул;

показана возможность замены МФА для определения показателя «подлинность» вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на метод ДИА-ЗНЧ для контроля на этапах получения вакцины, а в комплексе с методом ПЦР для определения данной характеристики в готовой лекарственной форме.

В результате проведения исследований в рамках главы 6 был сделан вывод о том, что свойства ЖТВ, полученных по лабораторной технологии, соответствуют требованиям, предъявляемым к данному лекарственному препарату. При сопоставлении технологической эффективности экспериментально обоснованных биотехнологических этапов получения ЖТВ в сравнении с действующей технологией выявлены преимущества по таким процедурам, как: получение бактериальной культуры *F. tularensis* III генерации, глубинное культивирование *F. tularensis*, концентрирование культуры *F. tularensis* тангенциальной микрофильтрацией, контроль туляремийной вакцины.

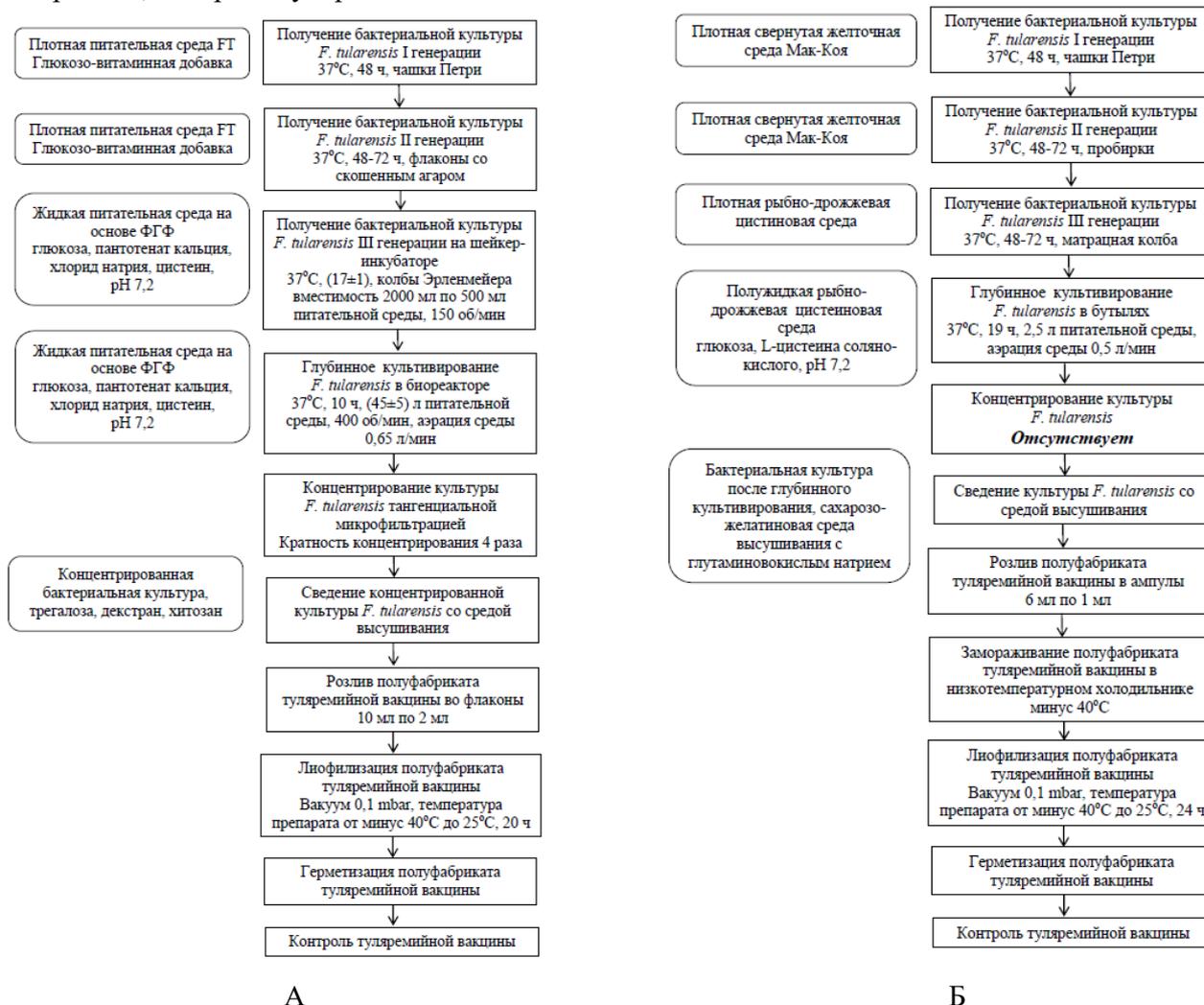


Рисунок 10 – Технологическая схема лабораторного (А) и действующего (Б) производств ЖТВ

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современный уровень биотехнологии обуславливает необходимость комплексного подхода для развития технологии производства профилактических иммунобиологических препаратов, в частности, ЖТВ. Отсутствие данных об особенностях получения жизнеспособной иммуногенной биомассы вакцинного штамма туляремийного микроба, знание и применение которых способствует повышению эффективности производственных процессов, определили направление данного исследования. Выполнение данной задачи вызвало необходимость проведения работ по совершенствованию ряда биотехнологических операций производства ЖТВ, разработке новых методических приемов ее приготовления, а также экспериментальному обоснованию возможности введения современных методов контроля в технологический процесс.

Мы считаем, что в результате проведенных исследований научно обоснованы биотехнологические решения, имеющие существенное значение для современного развития как производства единственного в России препарата для специфической профилактики туляремии, включенного в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям, так и других бактериальных вакцин.

5. ВЫВОДЫ

1. Разработана лабораторная технология производства живой туляремийной вакцины, осуществленная на совокупности инновационных биотехнологических подходах и дающая возможность изготавливать иммунобиологический лекарственный препарат, включенный в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям.

2. Для технологического этапа получения биомассы вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ экспериментально обоснован состав жидкой питательной среды на основе гидролизата фибрина (сухой гидролизат фибрина 5 %, глюкоза 1 %, пантотенат кальция 0,005 %, хлорид натрия 0,5 %, цистеин 0,1 %, рН (7,2±0,1) и определены технологические параметры процедуры глубинного аппаратного культивирования (температура (37±0,5) °С, продолжительность (10±1) ч, степень аэрации (0,65±0,15) л/мин и скорость перемешивания (400±100) об/мин) реализации данного процесса). Предложенные решения способствовали повышению эффективности процесса выращивания туляремийного микроба по увеличению биомассы в 17-24 раза.

3. Разработана и успешно апробирована в лабораторном производстве современная технология концентрирования клеточной массы вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной фильтрации. Выявлено, что применение мембран 0,2 мкм позволяет проводить процесс без потерь целевого продукта. Установлено, что максимальная производительность процесса обеспечивается при давлении в точке подачи продукта равным (2,5±0,1) кгс/см².

4. Разработана технология сублимационного высушивания бактерий вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. При этом экспериментально обоснован новый биофармацевтический состав живой туляремийной вакцины (состав приведен на 1 мл): клетки штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ – (10±5) млрд клеток; и вспомогательные вещества: трегалоза – 0,1 г; декстран – 0,01 г; хитозан – 0,02 г. Установление температуры полного замерзания (минус 40 °С), нижней и верхней эвтектической температуры (минус 35 °С и минус 25 °С соответственно) позволило определить технологические параметры лиофилизации продукта во флаконах. Проведенные исследования способствовали сохранению качества высушенного препарата.

5. Опытным путем установлена возможность применения электрооптического мониторинга для экспрессного анализа показателя «жизнеспособность» клеток вакцинного штамма туляремийного микроба на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата. Выявлена возможность получения результата за 30-60 мин. Экспериментально показана применимость иммунохимических и молекулярно-генетических методов контроля культур для определения показателя «подлинность» клеток вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Показана применимость метода дот-иммуноанализа с белком А, конъюгированным с золотыми наночастицами на этапах получения вакцины, а в комплексе с методом полимеразной цепной реакции для определения данной характеристики в готовой лекарственной форме.

6. Выявлено, что разработанные биотехнологические этапы не оказывают отрицательного влияния на физико-химические, микробиологические и иммунобиологические свойства туляремийного микроба. Для лабораторных серий вакцины доказано соответствие характеристик, определенных нормативной документацией.

6. ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве дальнейших перспектив проведенных исследований можно обозначить следующие: внедрение экспериментально разработанных технологических решений культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ, концентрирования ее биомассы и получения готовой формы вакцины в форме лиофилизата во флаконах в производственную технологию;

дальнейшую отработку методических приемов проведения новых предложенных методов контроля на этапах получения ЖТВ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования:

1. Комиссаров, А.В. Концентрирование микроорганизмов (обзор) / А.В. Комиссаров, **Д.Н. Бибиков**, О.А. Волох, А.К. Никифоров // **Биофармацевтический журнал**. – 2017. – Том 9. – № 4. – С. 3-6.
2. Комиссаров, А.В. Лиофилизация живых вакцин (обзор) / А.В. Комиссаров, **Д.Н. Бибиков**, О.А. Волох, С.А. Бадарин, Н.В. Сеницына, Н.И. Костылева, В.Г. Германчук, А.К. Никифоров // **Биофармацевтический журнал**. – 2020. – Том 12. – № 2. – С. 56-74.
3. Волох, О.А. Электрооптический анализ жизнеспособности клеток вакцинного штамма туляремийного микроба / О.А. Волох, С.В. Борисова, **Д.Н. Бибиков**, Е.М. Кузнецова, Ю.И. Самохвалова, Н.Г. Авдеева, А.В. Комиссаров, А.К. Никифоров // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2020. – Вып 3. – С. 50-55.
4. **Бибиков, Д.Н.** Лиофилизация микробов туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ / **Д.Н. Бибиков**, А.В. Комиссаров, О.А. Волох, Е.М. Кузнецова, С.А. Бадарин, Н.Г. Авдеева, Ю.И. Самохвалова, А.К. Никифоров // **Биофармацевтический журнал**. – 2020. – Том 12. – № 6. – С. 15-23.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Волох, О.А. Совершенствование технологии получения живой туляремийной вакцины / О.А. Волох, А.В. Комиссаров, С.А. Еремин, М.В. Антонычева, О.А. Лобовикова, Н.Г. Авдеева, Н.И. Вахрушина, Н.П. Миронова, **Д.Н. Бибиков**, А.К. Никифоров // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2016. – Вып 3. – С. 81-84.
2. **Бибиков, Д.Н.** Экспериментальная оценка методов концентрирования биомассы *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ с целью использования в производстве живой туляремийной вакцины / **Д.Н. Бибиков**, О.А. Волох, А.В. Комиссаров, Ю.И. Самохвалова, Н.Г. Авдеева, А.К. Никифоров // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2017. – № 2(19). – С. 130-133.
3. Волох, О.А. Методы и технологии культивирования туляремийного микроба / О.А. Волох, А.В. Комиссаров, **Д.Н. Бибиков**, К.И. Холматов, Н.Г. Авдеева, А.К. Никифоров // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова**. – 2017. – Том 13. – № 2(19). – С. 65-70.
4. Волох О.А. Жидкая питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба / О.А. Волох, М.В. Антонычева, Н.Г. Авдеева, Е.М. Кузнецова, К.И. Холматов, **Д.Н. Бибиков**, А.К. Никифоров // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2017. – Вып 2. – С. 81-83.

Патенты:

1. Патент на изобретение № 2716505 Российская Федерация. Способ получения лиофилизата вакцины туляремийной живой / **Д.Н. Бибиков**, А.В. Комиссаров, О.А. Волох, Е.М. Кузнецова, А.К. Никифоров. Заявитель и патентообладатель ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Оpubл. 12.03.2020. Бюл. № 8.

Публикации в сборниках научных и научно-практических конференций:

1. **Бибиков, Д.Н.** Теплофизические показатели живой туляремийной вакцины / **Д.Н. Бибиков**, А.В. Комиссаров, О.А. Волох, Е.А. Глазкова, С.А. Бадарин, Н.В. Сеницына, Н.И. Костылева, А.К. Никифоров // Материалы II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных». – 5-6 апреля 2017, г. Ставрополь, – С. 297-298.
2. **Бибиков, Д.Н.** Экспериментальная оценка методов концентрирования биомассы *Francisella tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ с целью использования в производстве живой туляремийной вакцины / **Д.Н. Бибиков**, О.А. Волох, А.В. Комиссаров, Ю.И. Самохвалова, Н.Г. Авдеева, А.К. Никифоров // Материалы 21 международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – 17-21 апреля 2017. – г. Пущино, – С. 160.
3. **Бибиков, Д.Н.** Определение условий и времени хранения концентратов биомассы *Francisella tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ, полученных методом тангенциальной фильтрации / **Д.Н. Бибиков**, Ю.И. Самохвалова, Н.Г. Авдеева, А.К. Никифоров // Материалы XI Съезда Всероссийского общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения». – 16-17 ноября 2017. – г. Москва, – С. 120-121.
4. Борисова, С.В. Применение новых инструментальных методов контроля на этапах получения лиофилизата вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ / С.В. Борисова, **Д.Н. Бибиков**, О.А. Волох, Д.В. Уткин, Е.М. Кузнецова, А.В. Комиссаров // Материалы IV Всероссийского семинара памяти профес-

сора Ю.П. Волкова «Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения». 24-25 мая 2018. – г. Саратов, – С.18-21.

5. Борисова, С.В. Влияние времени замораживания на качество лиофилизатов живой туляремийной вакцины / С.В. Борисова, **Д.Н. Бибиков**, А.В. Комиссаров, О.А. Волох, С.А. Бадарин, Н.В. Сеницына, Н.И. Костылева, А.К. Никифоров // Сборник тезисов V Международной конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. 2018. – г. Новосибирск, – С. 26-28.

6. **Бибиков, Д.Н.** Исследование «остаточной вирулентности» и реактогенности вакцины туляремийной живой сухой, полученной по усовершенствованной технологии / **Д.Н. Бибиков**, О.А. Волох, Е.М. Кузнецова, А.В. Комиссаров, А.К. Никифоров // Материалы XIV Межгосударственной научно-практической конференции, посвященной 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ». 20-21 ноября 2018. г. Саратов, – С. 55-56.

ОСНОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АП	анизотропия поляризуемости
АСМ	атомно-силовая микроскопия
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДИА-ЗНЧ	дот-иммуноанализ с белком А, конъюгированным с золотыми наночастицами
ЖТВ	живая туляремийная вакцина
ИБФРМ РАН	Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук
ИФА	иммуноферментный анализ
ИХ	иммунохроматографический анализ
КОЕ	колониеобразующие единицы
м.к.	микробные клетки
МФА	метод флуоресцирующих антител
НПО «Микроген»	акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген»
НЦЭСМП	научный центр экспертизы средств медицинского применения
ПАК	протективный антигенный комплекс
ПГРМ	панкреатический гидролизат рыбьего костного мозга
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНГА	реакция непрямой гемагглютинации
РосНИПЧИ	Российский научно-исследовательский противочумный институт
ФГФ	ферментативный гидролизат фибрина
ФКУЗ	федеральное казенное учреждение здравоохранения
ФС	фармакопейная статья
ЭЖТВ	экспериментальная живая туляремийная вакцина
ЭО	электрооптический
ЭПД	экстракт пекарских дрожжей