

УДК 616.98:579.852.11

## Стабилизация путем лиофилизации иммуногенных антигенов *Bacillus anthracis* в составе прототипа рекомбинантной вакцины против сибирской язвы

© 2017 г. А.П. СЕМАКОВА\*, О.М. КУДРЯВЦЕВА, П.Ю. ПОПОВА, А.В. КОМИССАРОВ, Н.И. МИКШИС

ФКВЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора, Саратов, 410005

e-mail: rusrap@microbe.ru\*

Поступила 06.07.16

Принята в печать 17.10.16

Изучали влияние лиофилизации на иммунологическую эффективность препаратов, содержащих рекомбинантный протективный антиген (рПА) и адьювант – альгидрогель и/или CpG-ОДН. Лабораторных животных (мыши *BALB/c* и морские свинки) иммунизировали лиофилизированными или нелиофилизированными препаратами однократно/двукратно подкожно и судили об иммунологической эффективности этих препаратов, определяя титр антител в сыворотке животных методом ИФА. Снижение протективной способности отмечали для рПА, сорбированного на альгидрогеле. Леофильное высушивание рПА с CpG не приводило к уменьшению иммунологической эффективности. В сравнительном эксперименте при подборе криопротекторов установлено преимущество сочетания 1%-ного раствора сахарозы и 3%-ного раствора глицина. В этом случае лиофилизированный препарат представлял собой пористую массу в виде таблетки молочно-белого цвета, которая растворялась в 0,9%-ном растворе хлорида натрия менее, чем за 1 мин. Установлено, что лиофилизация прототипа вакцины несколько снижает иммуногенные свойства препарата, но это снижение не критично. При изучении стабильности иммуногенных характеристик лиофилизованной формы установлено, что значения титра анти-ПА-антител в сыворотках животных, иммунизированных однократно сразу после лиофилизации препарата и после 12-месячного его хранения при температуре 4°C, существенно не различались.

**Ключевые слова:** адьюванты, лиофилизация, рекомбинантный протективный антиген, сибирезызенная вакцина, сибирская язва, *Bacillus anthracis*.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-57-65

Сибирская язва – особо опасная зооантропонозная инфекционная болезнь, вызываемая грамположительным спорообразующим микроорганизмом – *Bacillus anthracis*. Современный ареал сибирской язвы сельскохозяйственных и диких животных охватывает все континенты. Особенностью сибирезызенного микроба является способность образовывать споры и сохранять жизнеспособность в почве многие десятилетия. Риск заражения человека поддерживается наличием стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов и возможностью реализации и употребления продуктов или сырья, инфицированных спорами *B. anthracis*. В 2014 г. в России отмечено семь случаев кожной формы болезни в пяти субъектах Южного, Приволжского и Центрального федеральных округов [1]. Не исключена угроза использо-

вания возбудителя сибирской язвы в качестве агента биотерроризма [2–3].

Профилактика сибирской язвы на территории Российской Федерации проводится с использованием живой вакцины на основе аттенуированного штамма *B. anthracis* СТИ-1 [4]. За рубежом лицензированы и применяются химические вакцины – AVA (anthrax vaccine adsorbed, синоним BioThrax, США) и AVP (anthrax vaccine precipitated, Великобритания) [5]. В России разработана вакцина сибирезызенная комбинированная сухая для подкожного применения [6, 7]. Перечисленные препараты относятся к первому и второму поколению сибирезызенных вакцин. Технологии их производства основаны на использовании аттенуированных спорообразующих штаммов *B. anthracis*, продуцирующих экзотоксин. Помимо иммуно-

Список сокращений: ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ИФА – иммуноферментный анализ; ЛД<sub>50</sub> – доза, летальная для 50% тест-животных; ПА – протективный антиген сибирезызенного микроба; рПА – рекомбинантный ПА; CpG-ОДН – цитозин-гуанинолигодезоксинуклеотиды.

генной субъединицы – протективного антигена (ПА) – экзотоксин также содержит детерминанты патогенности возбудителя сибирской язвы – отечный и летальный факторы [5, 8]. Кроме того, при производстве подобных вакцин существует риск контаминации помещений и оборудования бактериальными спорами, устойчивыми к действию внешней среды и большинства дезинфектантов.

В соответствии с современными требованиями ВОЗ вакцины должны: 1) содержать только полностью охарактеризованные вещества, для которых установлен механизм действия; 2) эффективно защищать от заражения любым вирулентным штаммом соответствующего микроорганизма; 3) не вызывать токсического воздействия или различных степеней тяжести побочных действий на макроорганизм. Одним из путей создания вакцин, удовлетворяющих этим требованиям, является использование продуктов геномных технологий – рекомбинантных антигенов. В основу сибиреязвенных вакцин нового поколения положен протективный антиген, полученный из генно-инженерных штаммов. Созданные за рубежом отдельные прототипы сибиреязвенных вакцин успешно прошли все фазы доклинических исследований; некоторые находятся на начальных этапах клинических испытаний [9–12].

Предыдущими исследованиями, проводимыми в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», был разработан прототип сибиреязвенной химической вакцины на основе очищенных антигенов – рекомбинантного протективного антигена (рПА) и белка S-слоя EA1. Разработана единая технологическая схема выделения рПА и EA1 из безопасного и не образующего споры штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp<sup>o</sup> [13]. Проведено комплексное сравнение иммунологической эффективности препаратов на основе рПА и EA1 с использованием различных адъювантов (гидроокись алюминия, монофосфорилированный липид А и цитозин-гуанинолигодезоксинуклеотиды (СрG-ОДН)) [14].

При разработке и производстве средств иммунопрофилактики важной задачей является обеспечение стабильности медико-биологических свойств препаратов в процессе изготовления, транспортировки и хранения. На протяжении всего технологического процесса должна сохраняться первоначальная структура антигенов. Известно, что иммуногенные белки, входящие в состав вакцинных препаратов против сибирской язвы, такие как протективный антиген, термолабильны. Выделение и очистка сибиреязвенных антигенов сопряжены с физическими или химическими ме-

тодами воздействия. Стабильность препарата во многом зависит от таких факторов, как наличие вспомогательных веществ, способ приготовления, агрегатное состояние препарата, температура хранения и т.д.

Одним из путей решения проблемы стабилизации белковых молекул является лиофилизация препаратов. Правильный выбор среды высушивания и методики лиофилизации позволяет увеличить срок годности препарата и свести к минимуму изменение его основных характеристик [15–17].

Немаловажной задачей при лиофилизации препаратов является подбор вспомогательных компонентов, таких как формообразующие наполнители (лактоза, сахароза, мальтоза, человеческий альбумин, глицин и др.), консерванты (мертиолят (тимеросал), формальдегид, феноксиэтанол и др.), растворители и прочие вещества, сохраняющие физико-химические свойства антигенов и обеспечивающие защиту вакцины от микробной контаминации. Требования, предъявляемые к этим веществам, достаточно высоки: безопасность как в чистом виде, так и в сочетании с активными компонентами препарата (фармакологическая индифферентность), разрешенность к применению в медицинской практике, эффективность в применяемых концентрациях, химическая чистота и доступность.

Исходя из вышеизложенного, целью нашей работы была разработка оптимальных подходов, обеспечивающих стабильность иммуногенных свойств прототипа вакцины сибиреязвенной химической в процессе хранения.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Штаммы

В работе использовали рекомбинантный аспорогенный штамм-продуцент рПА *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp<sup>o</sup> (КМ97, патент РФ №2321629) и *B. anthracis* 71/12 (2-я вакцина Ценковского) из Государственной коллекции патогенных бактерий Саратова.

### Лабораторные животные

Эксперименты проводили на мышках линии *BALB/c* (20 ± 2 г) и морских свинок (300 ± 20 г) (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов). Биоматериал содержался на стандартном рационе с достаточным количеством воды в соответствии с

требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях.

### Питательные среды

В работе использовали агар и бульон Хоттингера (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»).

### Выделение и очистка белков рПА и ЕА1

Белки изолировали из аспорогенного генно-инженерного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>) согласно разработанному ранее способу [13].

### Синтез CpG 2006

Адьювант CpG 2006 (CpG), который является представителем семейства CpG-ОДН, получали во ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» по протоколу, имеющемуся в блоке управления автоматическим синтезатором ASM-800 ("Биоссет", Россия) и в соответствии с инструкцией производителя. В качестве окислителя использовали раствор сульфонирующего реактива 3Н-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида (Sigma-Aldrich, США).

### Лиофилизация препарата

Очищенные антигены, адьювант и консервант смешивали со стерильными растворами стабилизаторов в необходимом соотношении. Фасовку препарата в объеме от 100 мл проводили с использованием автоматического дозатора Flexicon PF-6 (Дания) во флаконы объемом 2,5 см<sup>3</sup>. В начале, середине и конце процесса отбирали по три флакона для контроля стерильности и точности розлива. По окончании фасовки флаконы с препаратом устанавливали на полки сублимационной сушильной установки Epsilon-2-6 (Martin Christ, Германия), замораживали материал до температуры -40°C и выдерживали в течение 2 ч. Затем создавали остаточное давление в сушильной установке не более 30 Па, и процесс сублимации проводили при повышении температуры в материале до 5°C со скоростью не более 3°C/ч. При достижении указанного значения скорость повышения температуры увеличивали до 10°C/ч. После установления в материале температуры 28°C проводили досушивание в течение 7 ч. Затем

флаконы с препаратом в стерильном боксе закрывали резиновыми пробками и закатывали алюминиевыми колпачками на полуавтомате ЗПР (Россия) вручную. Препараты хранили при 4°C.

### Определение физико-химических свойств прототипа вакцины

Дисперсность, герметичность, стерильность и потерю массы препарата при высушивании определяли по ОФС 42-0060-07<sup>1</sup>.

### Иммунизация

Иммунизацию лабораторных животных осуществляли подкожно в область внутренней поверхности бедра, однократно или двукратно с интервалом в 2 нед. Разовую дозу вводили морским свинкам в объеме 0,5 мл, линейным мышам – 0,2 мл. Для определения протективной активности прототипа сибиреязвенной химической вакцины содержимое флакона разводили в 5 мл стерильного 0,9%-ного раствора хлорида натрия. Животным контрольной группы вводили стерильный 0,9%-ный раствор NaCl в объеме 0,2 мл (мыши) или 0,5 мл (морские свинки).

### Определение титра антител в сыворотке иммунизированных животных с использованием ИФА

Кровь забирала из краевой ушной вены у морских свинок в установленные сроки. Пробы от четырех особей каждой группы объединяли в один пул. Титр анти-ПА-антител в сыворотках иммунизированных животных определяли с помощью стандартной методики ИФА. В качестве антигена применяли очищенный ПА (выделен во ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» из рекомбинантного штамма-продуцента *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>) в концентрации 30 мкг/мл. Видоспецифический иммуноглобулин, меченный пероксидазой (Sigma, США), использовали в разведении 1:10000 по рекомендации фирмы-изготовителя. Результаты реакции регистрировали в присутствии АВТС (2,2-азинобис(3-этилбензтиазолин)-6-сульфоновой кислоты) (Sigma, США) с помощью прибора StatFax 2100 (Awareness Technology, США) при длине волны 405 нм. Каждый эксперимент по определению титра антител повторяли не менее 3 раз. Статисти-

<sup>1</sup> Государственная фармакопея Российской Федерации, 12 изд. Ч.1. Аномальная токсичность.

ческую обработку экспериментальных данных осуществляли с применением стандартных методов, вычисляя среднюю арифметическую ошибку и среднюю ошибку средней арифметической.

### Определение ЛД<sub>50</sub> тест-заражающего штамма<sup>2</sup> для иммунизированных линейных мышей и определение индекса иммунитета антигенных препаратов

Через 21 день после последней иммунизации всех иммунизированных и контрольных биомоделей заражали тест-штаммом *B. anthracis* 71/12 (2-я вакцина Ценковского), используя 4 последовательные дозы с кратностью  $\times 10$ . Линейным мышам вводили спорую взвесь тест-штамма (0,2 мл) в дозе от  $1 \cdot 10^2$  до  $1 \cdot 10^5$  спор (одинаковая доза для интактных и иммунизированных животных); морским свинкам – 0,5 мл споровой взвеси тест-штамма в дозе  $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^7$  спор – иммунизированным и от  $1 \cdot 10^1$  до  $1 \cdot 10^4$  спор – интактным животным. За зараженными животными наблюдали в течение 10 сут. Павших животных вскрывали; специфичность гибели подтверждали посевом материала из органов трупа на агар Хоттингера. Учитывали животных, павших от специфического процесса. Через 10 сут определяли величину ЛД<sub>50</sub> тест-заражающего штамма для иммунизированных и контрольных животных.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Важной характеристикой вакцинного препарата является стабильность при хранении и транспортировке. Протективный антиген и белки S-слоя сибиреязвенного микроба подвержены температурному воздействию. Одним из путей решения проблемы стабилизации данных белковых молекул является лиофилизация препарата.

Исходя из перспективы создания прототипа химической сибиреязвенной вакцины, изучали влияние лиофилизации на активность препаратов, содержащих различные адъюванты. Необходимо отметить, что лицензированная зарубежная сибиреязвенная вакцина AVA представляет собой суспензию ПА, адсорбированного на геле гидроксида алюминия (альгидрогель) и выделенного из аттенуированного штамма *B. anthracis*. Отечественная комбинированная сибиреязвенная

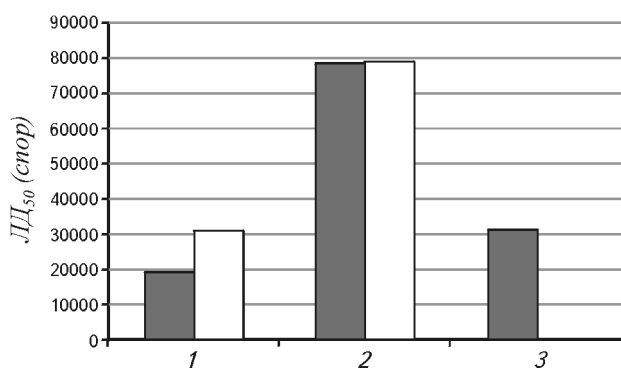
вакцина содержит аналогичный ПА, но препарат лиофильно высушен с добавлением сахарозы в качестве стабилизатора. Альгидрогель весьма чувствителен к действию отрицательных температур, поэтому не исключена вероятность снижения протективной активности иммуногенного антигена в лиофилизированных препаратах с его включением [18]. В этой связи сравнивали протективную активность рПА, лиофилизованного с добавлением в качестве адъюванта альгидрогеля или СрG-ОДН. Лиофилизацию в данном случае осуществляли в присутствии 10%-ной сахарозы при температуре  $-70^\circ\text{C}$ .

Подвергнутые сублимационному высушиванию препараты разводили стерильным физиологическим раствором в асептических условиях так, чтобы в 0,2 мл содержалась иммунизирующая доза для линейных мышей, мкг: рПА – 10, EA1 – 5, гидроксида алюминия – 240 или СрG 2006 – 10. Лабораторных животных иммунизировали однократно подкожно. Через 21 день после иммунизации биомоделей заражали тест-штаммом *B. anthracis* 2-я вакцина Ценковского. Изменение протективной способности отмечали только для препарата рПА, сорбированного на альгидрогеле (рис. 1, 1): ЛД<sub>50</sub> тест-штамма снизилась в 1,6 раза – с  $3,1 \cdot 10^4$  (7943–501187) спор до  $1,9 \cdot 10^4$  (5012–199526) спор. Лиофильное высушивание прототипа вакцины с СрG не приводило к уменьшению протективности: ЛД<sub>50</sub> до и после сублимационной сушки были одинаковыми –  $7,9 \cdot 10^4$  (15849–501187) спор (см. рис.1, 2).

Дополнительно тестировали лиофилизированный препарат, сорбированный на альгидрогеле рПА с добавлением СрG 2006. Такой состав адъювантов использован в экспериментальной сибиреязвенной вакцине AV-7909, представляющей собой вакцину AVA (содержащую альгидрогель) с добавлением СрG 7909 (другое название СрG 2006), которая успешно прошла различные стадии доклинических и клинических испытаний [12].

Показатель ЛД<sub>50</sub> тест-штамма с использованием препарата с указанными адъювантами для линейных мышей составил  $3,1 \cdot 10^4$  (7943–501187) спор, что в 2,5 раза меньше по сравнению с препаратом, содержащим только СрG 2006 (см. рис. 1, сравни 3 и 2). Как видим, СрG 2006 повышает эффективность сорбированного на альгидрогеле рПА, но преимущество остается все же за композицией без гидроксида алюминия (см. рис. 1, 2).

<sup>2</sup> Тест-заражающий штамм – штамм, регламентированный действующими нормативными документами для заражения определенных видов лабораторных животных с целью определения иммуногенности испытываемых препаратов.



**Рис. 1.** LD<sub>50</sub> тест-штамма для мышей линии BALB/c, иммунизированных лиофилизованной (серые столбики) и нелиофилизованной (белые столбики) формой препарата, содержащего рПА в сочетании с различными адъювантами: 1 – рПА + альгидрогель; 2 – рПА + CpG; 3 – рПА + альгидрогель + CpG

**Fig. 1.** LD<sub>50</sub> of a test strain for BALB/c line mice immunized by freeze-dried (black columns) or unlyophilized (white columns) forms of rPA preparation combined with various adjuvants: (1), rPA + alhydrogel; (2), rPA + CpG; and (3), rPA + alhydrogel + CpG

В дальнейших экспериментах в качестве адъюванта использовали CpG 2006.

Оптимальный щадящий режим лиофилизации позволяет максимально сохранить свойства антигенов после высушивания. С этой целью осуществляли подбор среды и параметров лиофильного высушивания прототипа сибиреязвенной химической вакцины.

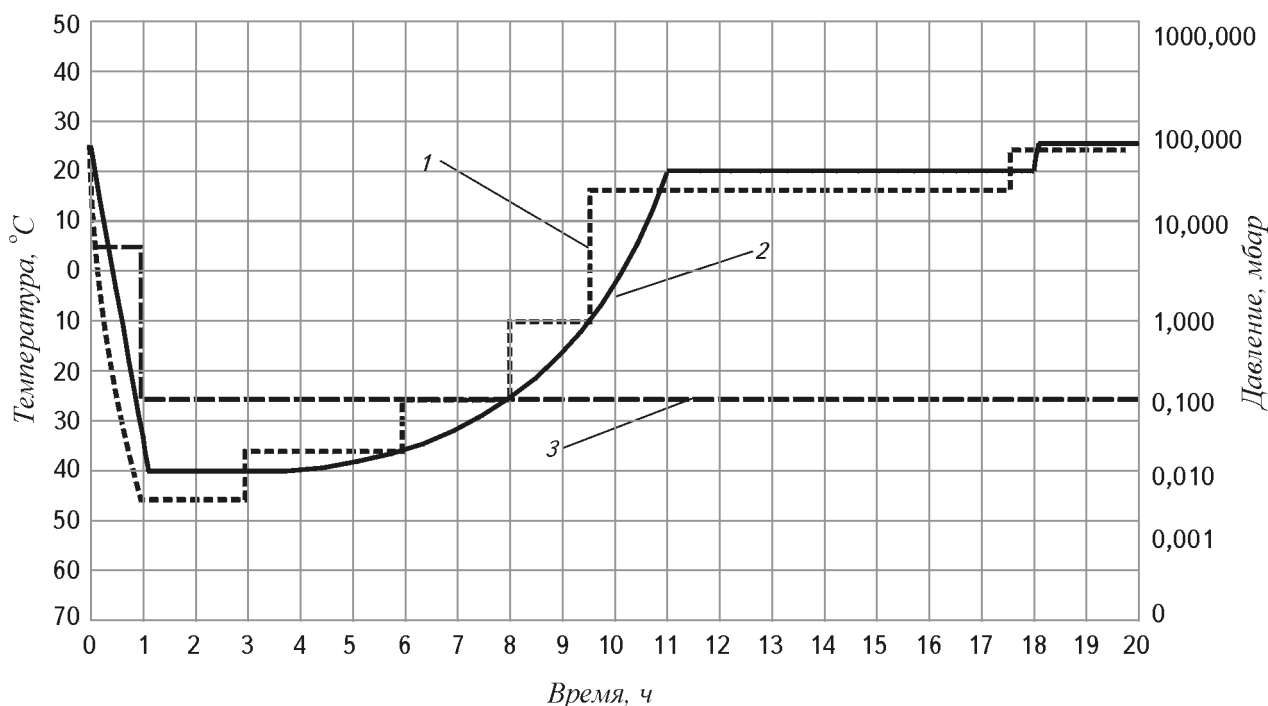
В качестве единого источника иммуногенных сибиреязвенных антигенов – рПА и ЕА1 – использовали безопасный и высокоэффективный штамм-продуцент *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp<sup>o</sup>. Выделение рПА осуществляли из стерильного культурального фильтрата, а белок ЕА1 экстрагировали из концентрированной биомассы. Очищенные антигены хранили при температуре –70°C.

На следующем этапе смешивали компоненты препарата прототипа вакцины таким образом, чтобы в 1 см<sup>3</sup> содержалось, мкг: рПА – 100, белка ЕА1 – 50, CpG 2006 – 0,5; и 0,002 % формальдегида («Метафракс», Россия), после чего пропускали через стерилизующие фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Введение в качестве консерванта формальдегида в состав прототипа сибиреязвенной вакцины обусловлено его широким применением как в отечественных, так и в зарубежных средствах специфической профилактики. В частности, сибиреязвенная комбинированная вакцина для подкожного применения (Россия) и химическая вакцина AVA (США), содержат данный консервант. Графически процесс лиофильного высушивания прототипа сибиреязвенной химической вакцины в присутствии различных криопротекторов показан на рис. 2.

В эксперименте использовали различные варианты криопротекторов: 10%-ная сахароза («ДИА-М», Россия), 1%-ная сахароза + 3%-ный глицин («ДИА-М»), 1%-ная мальтоза («ДИА-М») + 3%-ный глицин. При использовании 10%-ной сахарозы наблюдалась образование стекловидной

массы, что может быть объяснено отсутствием в составе компонентов, формирующих кристаллическую структуру замороженного продукта. В результате двух других вариантов стабилизации лиофилованный препарат представлял собой пористую массу в виде таблетки молочно-белого цвета (рис. 3). Таблетка полностью растворялась в 0,9%-ном растворе хлорида натрия в течение менее 1 мин с образованием прозрачной бесцветной жидкости без посторонних примесей и хлопьев.

Влияние сублимационного высушивания на иммунологическую эффективность препаратов изучали в эксперименте по определению динамики титра антител к ПА в сыворотках иммунизированных животных. Для этого лиофилованные препараты с добавлением 10%-ной сахарозы или 1%-ной сахарозы и 3%-ного глицина, или 1%-ной мальтозы и 3%-ного глицина разводили стерильным физиологическим раствором в асептических условиях так, чтобы 0,5 мл препарата для морских свинок содержали иммунизирующую дозу, мкг: рПА – 25, ЕА1 – 12,5 и CpG 2006 – 120. Лабораторных животных разных групп (по 4 особи в каждой) иммунизировали полученными препаратами однократно подкожно. Морским свинкам группы сравнения вводили нелиофилованный препарат, содержащий рПА, ЕА1, CpG 2006 и консервант, а также мальтозу и глицин в приведенных выше концентрациях. Забор крови проводили на 14-е и 21-е сутки после иммунизации. Кровь от животных одной группы объединяли в один пул. По результатам ИФА на 14-е сутки средние значения титра антител к ПА у животных, однократно иммунизированных различными вариантами лиофилованных препаратов, находились в пределах от 1:512 до 1:1000 (рис. 4). Для морских свинок, иммунизированных нелиофилованным препаратом, тот же показатель был равен 1:1000. Однако на 21-е сутки титр антител у морских свинок этой группы снижался до средне-



**Рис. 2.** Технологические параметры процесса лиофилизации прототипа сибиреязвенной химической вакцины, содержащего иммуногенные сибиреязвенные антигены, адъювант, консервант и криопротекторы (1%-ная сахароза + 3%-ный глицин): 1 – температура полки, 2 – температура препарата, 3 – остаточное давление в сушильной установке

**Fig. 2.** Technological parameters of freeze-drying of anthrax chemical vaccine prototype containing immunogenic anthrax antigens, adjuvant, preservative and cryoprotectors (1% sucrose + 3% glycine): (1), temperature of shelf; (2), temperature of preparation; and (3), residual pressure in dryer

го значения 1:512, в то время как у опытных животных он достигал уровня от 1:2000 до 1:4000.

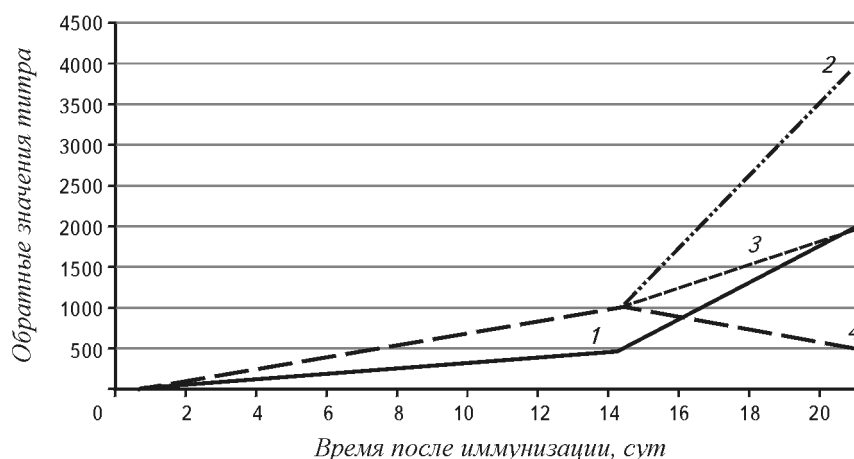
На основании результатов экспериментов, представленных на рис. 3 и 4, был сделан выбор в пользу лиофилизации сибиреязвенных антигенов в присутствии смеси 1%-ной сахарозы и 3%-ного глицина.

На следующем этапе проводили сравнение иммуногенных свойств лиофилизованного и нелиофилизованного препаратов, но при условии двукратной иммунизации биомоделей. Морских свинок иммунизировали подкожно двукратно с интервалом в 2 нед; забор крови осуществляли после второй иммунизации на 48-е сутки, 64-е



**Рис. 3.** Внешний вид препаратов рПА + EA1 после лиофильного высушивания в присутствии различных стабилизаторов: слева – адъювант + 10%-ная сахароза; справа – адъювант + 1%-ная сахароза + 3%-ный глицин

**Fig. 3.** Appearance of rPA + EA1 preparations after freeze-drying with various stabilizers: on the left, adjuvant + 10% sucrose; on the right, adjuvant + 1% sucrose + 3% glycine



**Рис. 4.** Динамика титра антител в сыворотках морских свинок, иммунизированных однократно лиофилизованными с различными криопротекторами или нелиофилизованным препаратами сибирезвездных антигенов: 1 – препарат лиофилизован в присутствии 10%-ной сахарозы; 2 – препарат лиофилизован в присутствии 1%-ной сахарозы и 3%-ного глицина; 3 – препарат лиофилизован в присутствии 1%-ной мальтозы и 3%-ного глицина; 4 – нелиофилизованная форма препарата

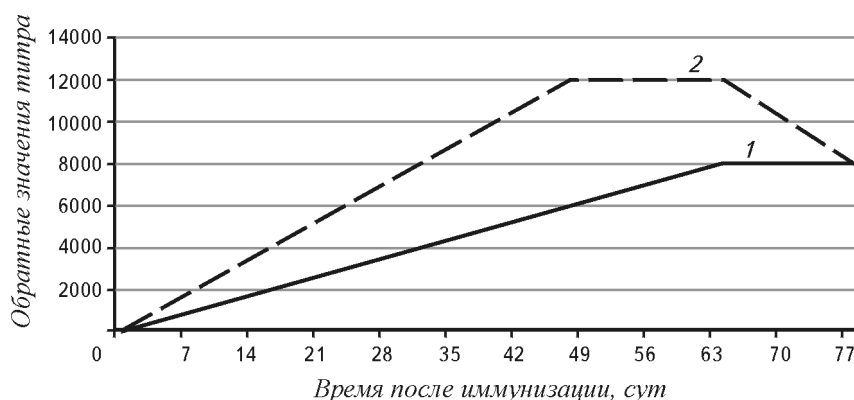
**Fig. 4.** Dynamics of antibody titer in sera of guinea pigs after a single immunization by freeze-dried (with a few cryoprotectors) or unlyophilized preparation of anthrax antigens: (1), freeze-dried with 10% sucrose; (2), freeze-dried with 1% sucrose and 3% glycine; (3), freeze-dried with 1% maltose and 3% glycine; and (4), unlyophilized preparation

(из ушной вены) и 78-е сутки (из сердца). По результатам ИФА на 48-е и 64-е сутки средние значения титра антител к ПА у животных, иммунизированных лиофилизованным препаратом в присутствии 1 %-ной сахарозы и 3%-ного глицина, составили соответственно 1:6000 и 1:8000 (рис. 5). Для морских свинок, иммунизированных нелиофилизованным препаратом, тот же показатель в оба срока был несколько выше – 1:12000. Однако спустя почти 2,5 мес (78-е сутки) среднее значение титра антител в обеих группах было равно 1:8000.

Следовательно, лиофилизация прототипа вакцины несколько снижает иммуногенные свойства, но это снижение не критично.

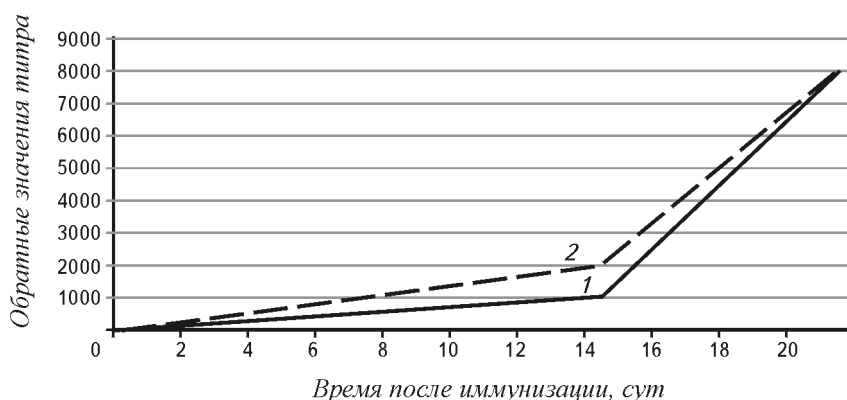
Ввиду того, что при апробации выбранной схемы лиофилизации был достигнут положительный результат (сохранение иммуногенной активности, высокая растворимость и приемлемый внешний вид препарата), в дальнейшем подборе параметров не было необходимости.

Для подтверждения стабильности иммуногенных характеристик лиофилизованной формы



**Рис. 5.** Динамика титра антител в сыворотках морских свинок, иммунизированных двукратно препаратом, содержащим рПА, EA1, адъювант CpG 2006 и консервант: 1 – препарат лиофилизован в присутствии 1%-ной сахарозы и 3%-ного глицина; 2 – нелиофилизованная форма препарата

**Fig. 5.** Dynamics of antibody titers in sera of guinea pigs after double immunization with a preparation containing rPA, EA1, adjuvant CpG 2006 and preservative: (1), preparation was freeze-dried with 1% sucrose and 3% glycine; and (2), unlyophilized preparation



**Рис. 6.** Титр антител в сыворотках морских свинок, иммунизированных лиофилизованными препаратами сибиреязвенных антигенов с различным сроком хранения: 1 – препарат непосредственно после лиофилизации; 2 – лиофилизованный препарат после 12-месячного хранения

**Fig. 6.** Antibody titers in sera of guinea pigs immunized by freeze-dried preparations of anthrax antigens with various shelf lives: (1), immediately after freeze-drying; (2) after 12 month-storage

препарата определяли титр анти-ПА-антител у животных, иммунизированных препаратами с различным сроком хранения. Морских свинок иммунизировали однократно сразу после лиофилизации и спустя 12 мес хранения при температуре 4°C. Данные, представленные на рис. 6, свидетельствуют об отсутствии существенных различий в титре антител на 14-е сутки после иммунизации обоими препаратами сибиреязвенных антигенов: 1:2000 для препарата сразу после лиофилизации и 1:1000 для препарата, хранившегося в течение 12 мес. На 21-е сутки для обоих препаратов были получены одинаковые значения титра антител – 1:8000.

Таким образом, разработан подход, обеспечивающий стабильность иммуногенных свойств прототипа вакцины сибиреязвенной химической в процессе хранения. Установлено, что при лиофилизации в присутствии 1%-ной сахарозы и 3%-ного глицина выделенные из штамма-продуцента *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp<sup>o</sup> антигены сохраняют свои иммуногенные свойства в течение года в условиях хранения при температуре 4°C; внешний вид и растворимость удовлетворяют требованиям, предъявляемым к иммунобиологическим лекарственным препаратам.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Рязанова А.Г., Цыганкова О.И., Аксенова Л.Ю. и др. Эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация по сибирской язве в 2014 г., прогноз на 2015 г. Проблемы особо опасных инфекций, 2015, (1), 26–29. doi:10.21055/0370-1069-2015-1-26-29
2. Brachman P. Bioterrorism: an update with a focus on anthrax. *Am. J. Epidemiol.*, 2002, 155, 981–987.
3. Grundmann O. The current state of bioterrorist attack surveillance and preparedness in the US. *Risk Management and Healthcare Policy*, 2014, 7, 177–187. doi: 10.2147/RMHP.S56047
4. Онищенко Г.Г., Кожухов В.В., Васильев Н.Т. и др. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты [Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кожухова]. М.: ОАО «Изд-во «Медицина», 2010, 5–424
5. Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S. et al. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunol. Rev.*, 2011, 239, 221–236. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00969.x
6. Кожухов В.В., Пименов Е.В., Сероглазов В.В. и др. Способ получения сухой комбинированной сибиреязвенной вакцины. Патент РФ, 2181294, А 61 К 39/07, С 12 N 1/04. 2002.
7. Садовой Н.В., Кравец И.Д., Селиваненко Г.М. и др. Вакцина сибиреязвенная комбинированная. Патент РФ, 2115433, А 61 К 39/07, А 61 К 39/40. 1998.
8. Williamson E., Dyson E. Anthrax prophylaxis recent advances and future directions *Front. Microbiol.*, 2015, 6, 1009. doi: 10.3389/fmicb.2015.01009
9. Bellanti J., Lin F., Chu C. et al. Phase 1 study of a recombinant mutant protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012, 19, 140–145. doi: 10.1128/CFI.05556-11
10. Brown B., Cox J., Gillis A. et al. Phase I study of safety and immunogenicity of an *Escherichia coli*-derived recombinant protective antigen (rPA) vaccine to prevent anthrax in adults. *PLoS One*, 2010, 5(11), e13849.
11. Campbell J., Clement K., Wasserman S. et al. Safety, reactogenicity and immunogenicity of a recombinant protective antigen anthrax vaccine given to healthy adults. *Hum. Vaccine*, 2007, 3, 205–211.



12. Minang J., Inglefield J., Harris A. et al. Enhanced early innate and T cell-mediated responses in subjects immunized with Anthrax vaccine adsorbed plus CpG 7909 (AV7909). *Vaccine*, 2014, 32(50), 6847–6854. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.01.096
13. Микшис Н.И., Гончарова А.Ю., Попова П.Ю. и др. Способ получения протективного антигена и белка S-слоя EA1 из аспорогенного рекомбинантного штамма *B. anthracis* 55?ТПА-1Spо. Патент РФ, 2492241, С 12 Р 21/00, А 61 К 39/02, С 12 N 1/21, С 12 R 1/07. 2013.
14. Микшис Н.И., Семакова А.П., Попова П.Ю. и др. Перспективность использования различных адъювантов в сочетании с рекомбинантным протективным антигеном сибиреязвенного микроба. *Биотехнология*, 2014, 6, 36–43. doi: 10.21519/0234-2758-2014-6-36-42
15. Chi E., Krishnan S., Randolph T. et al. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm. Res.*, 2003, 20(9), 1325–1336. doi:10.1023/A:1025771421906
16. Kristensen D., Chen D. Stabilization of vaccines: Lessons learned. *Hum. Vaccines*, 2003, 6, 229–231.
17. Несчислаев В.А., Семченко А.В., Арчакова Е.Г. и др. Повышение эффективности процесса лиофилизации в технологии пробиотиков. *Фундаментальные исследования*, 2007, 12, 369–370.
18. Watkinson A., Soliakov A., Ganesan A. et al. Increasing the potency of an alhydrogel-formulated anthrax vaccine by minimizing antigen-adjuvant interactions. *J. Clin. Vaccine Immunol.*, 2013, 20(11), 1659–1668. doi: 10.1128/0142-1128.00320-1

## Stabilization by Freeze-Drying of *Bacillus anthracis* Immunogenic Antigens as a Component of Anthrax Recombinant Vaccine Prototype

A.P. SEMAKOVA\*, O.M. KUDRIAVTSEVA, P.Yu. POPOVA, A.V. KOMISSAROV and N.I. MIKSHIS

*The Russian Research Antiplague Institute, Rospotrebnadzor, Saratov 410005, Russia*

*e-mail: rusrapi@microbe.ru\**

Received July 06, 2016

Accepted October 17, 2016

**Abstract**—Immunological characteristics of preparations that contained rPA and aluminum hydrogel or CpG-ODN as an adjuvant have been studied. Test animals (mice of BALB/c line or guinea pigs) were immunized one or two times subcutaneously by freeze-dried or unlyophilized vaccine prototype preparation, and the titers of the anti-anthrax antibodies in sera that reflect the preparation effectiveness were measured by ELISA. The rPA adsorbed on alhydrogel demonstrated the decrease in the protective activity. Freeze-drying of rPA with CpG did not affect the immunological characteristics of the preparation. The comparative experiment with the use of different cryoprotectors showed the advantage of the mixture containing sucrose (1%) and glycine (3%). The product in this case looked like a porous milky-white tablet that could be dissolved in 0.9% NaCl for less than a minute. It was shown that the freeze-drying somewhat reduces the immunogenic properties of the vaccine prototype; however, this reducing is not dramatic. As for the stability of the freeze-dried preparations, it was shown that the titers of the anti-PA antibodies in guinea pigs after immunization with a freshly freeze-dried prototype or preparation that was stored for 12 month at 4°C after freeze-drying were on the approximately similar level.

*Key words:* adjuvants, anthrax, anthrax vaccine, *Bacillus anthracis*, freeze-drying, recombinant protective antigen.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-57-65