



Применение ультрафильтрационных мембран для очистки и концентрирования вируса полиомиелита типа 1 штамм Сэбина

Ковпак А.А.^{1✉}, Ивин Ю.Ю.¹, Пиняева А.Н.¹, Хапчаев Ю.Х.¹, Ожерелков С.В.¹,
Белякова А.В.¹, Ишмухаметов А.А.^{1,2}

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация

Введение. Со времени создания инактивированных полиомиелитных вакцин различные стадии производственного процесса изменялись и совершенствовались. Современное производство вакцин на основе как диких, так и аттенуированных штаммов включает несколько технологических стадий, одной из которых является концентрирование вирусосодержащей жидкости, позволяющее сконцентрировать вирус полиомиелита и очистить вирусосодержащую жидкость от значительной части балластных компонентов.

Целью исследования были сравнительная характеристика ультрафильтрационных мембран и подбор мембраны, обеспечивающей оптимальные показатели очистки и концентрирования вируса полиомиелита типа 1 (штамм Сэбина).

Материалы и методы. Для проведения работ по концентрированию использовали лабораторные ультрафильтрационные системы двух производителей с мембранами 50, 100 и 300 кДа. Полученные результаты оценивали по содержанию общего белка, составляющего основную нагрузку на последующие стадии очистки, количеству инфекционного титра вируса в концентрате и содержанию D-антигена как целевого продукта. Оценивали также фактическое отсеечение компонентов вирусосодержащей жидкости различными мембранами для определения состава белковой нагрузки на целевой продукт.

Результаты и обсуждение. Содержание D-антигена и очистка от примесных белков (содержание общего белка в концентрате) были наиболее оптимальными при концентрировании с использованием мембраны с отсечением 300 кДа. Вне зависимости от показателя отсеечения мембраны, подавляющая часть клеточных компонентов вирусосодержащей жидкости не отсекается на стадии осветляющей и стерилизующей фильтрации, а концентрируется и составляет основную белковую нагрузку на целевой продукт.

Заключение. С точки зрения качества получаемого целевого продукта и технологичности производственного процесса использование мембраны 300 кДа является наиболее целесообразным при обработке технологии изготовления инактивированных полиомиелитных вакцин с использованием штаммов Сэбина вируса полиомиелита и культуры клеток линии Vero в качестве культуры-продуцента.

Ключевые слова: ультрафильтрация, концентрирование, полиомиелит, инактивированная полиомиелитная вакцина, пероральная полиомиелитная вакцина

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Ковпак А.А., Ивин Ю.Ю., Пиняева А.Н., Хапчаев Ю.Х., Ожерелков С.В., Белякова А.В., Ишмухаметов А.А. Применение ультрафильтрационных мембран для очистки и концентрирования вируса полиомиелита типа 1 штамм Сэбин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(2): 135–143. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-94>

Application of ultrafiltration membranes for purification and concentration of Sabin poliovirus type 1

Anastasia A. Kovpak^{1✉}, Yury Y. Ivin¹, Anastasia N. Piniyeva¹, Yusuf Kh. Khapchaev¹,
Sergey V. Ozherelkov¹, Alla V. Belyakova¹, Aydar A. Ishmukhametov^{1,2}

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Since the development of inactivated polio vaccines, different stages of the production process have been changed and improved. Current production of inactivated polio vaccines based on both wild and attenuated strains includes several technological stages, one of which is the concentration of the virus-containing liquid, which ensures poliovirus concentration, and purification of the virus-containing liquid from a significant part of the ballast components.

Research objective is to compare the characteristics of ultrafiltration membranes and select the membranes that provide optimal value of purification and concentration of poliovirus type 1 (Sabin strain).

Materials and methods. Laboratory ultrafiltration systems from two manufacturers with 50, 100, and 300 kDa membranes were used for the concentration. Results were evaluated by the content of total protein, which is the main stress for the subsequent purification stages, the value of infectious virus titer in the concentrate, and the content of D-antigen as the target product.

Results and discussion. Obtained results demonstrated that the content of the target product (the highest D-antigen content) and purification from impurity proteins (the total protein content in the concentrate) were most optimal when a membrane with a cut-off of 300 kDa was used for concentration. The study also evaluated the real cut-off components by various membranes to determine the composition of the protein load on the target product.

Conclusion. In terms of quality of the resulting target product and the manufacturability of the production process, the use of a 300 kDa membrane is the most appropriate when working out the technology for manufacturing inactivated polio vaccine based on Sabin strains of poliovirus and the Vero line as a producing culture.

Keywords: *ultrafiltration, concentration, inactivated polio vaccine, oral polio vaccine, poliomyelitis*

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Ковпак А.А., Ивин Ю.Ю., Пиняева А.Н., Хлупчаев Ю.К., Озхерелков С.В., Белякова А.В., Ишмухаметов А.А. Application of ultrafiltration membranes for purification and concentration of Sabin poliovirus type 1. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2021;98(2): 135–143.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-94>

Введение

История результативной борьбы с полиомиелитом насчитывает более 60 лет со времени создания моно-, би- и тривалентных инактивированных и живых вакцин [1].

Использование этих вакцин с середины 1950–1960-х гг. позволило не только снизить заболеваемость полиомиелитом по всему миру, но и начать реализацию программы по искоренению этого заболевания [1]. Наиболее широко оба вида вакцин применялись в форме тривалентных препаратов.

Присутствие в пероральной полиомиелитной вакцине живых аттенуированных штаммов полиовируса в редких случаях приводит к возникновению вакциноассоциированного паралитического полиомиелита или к вспышкам циркулирующего вакцинно-родственного полиовируса [2]. Для исключения подобных рисков большинство экономически развитых стран либо полностью перешли на использование только инактивированной полиомиелитной вакцины (ИПВ), либо применяют её в комбинации с пероральной полиомиелитной вакциной [1].

Для производства ИПВ до сих пор многие производители используют высоковирулентные (дикие) штаммы полиовируса. Всемирная организация здравоохранения в целях повышения биобезопасности

процесса приготовления ИПВ рекомендует использовать в качестве вакцинных штаммов аттенуированные штаммы полиовируса, которые способны индуцировать нейтрализующие антитела как к аттенуированному, так и к диким штаммам вируса [3].

Производство ИПВ включает несколько стадий:

- наработка клеточной и вирусной биомассы из чувствительных к вакцинным штаммам полиовируса культур клеток;
- фильтрация и концентрирование вирусосодержащей жидкости (ВСЖ);
- очистка и инактивация вируса формальдегидом [4].

Традиционно для культивирования клеточных линий используют различные питательные среды с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки в качестве ростового фактора. Это приводит к тому, что в составе ВСЖ находятся различные белки сывороточного происхождения, клеточные компоненты и производные питательной среды, составляющие основную белковую нагрузку на дальнейшую стадию очистки вакцинного полуфабриката.

Для грубой очистки ВСЖ от вышеперечисленного балласта применяют осветляющую и стерилизующую фильтрации [4].

Полученный фильтрат концентрируют. Процесс концентрирования проводят с использованием тангенциальной ультрафильтрации (УФ). Эта стадия получения вакцины является одной из основных стадий производства ИПВ, поскольку позволяет не только сконцентрировать вирус полиомиелита, но и очистить ВСЖ от значительной части балластных компонентов. Принципиальная схема установки для ультрафильтрации и пример потоков жидкости в мембранах кассетного типа представлены на **рис. 1**.

Для УФ различных биопродуктов используют мембраны с широким диапазоном по НОММ (номинальное отсечение по молекулярной массе), которое определяет мельчайший белок, отсекаемый мембраной: от 5 до 300 кДа, однако для концентрирования вируса полиомиелита как в лабораторных, так и в промышленных масштабах применяют УФ-мембраны с отсечением 100 кДа [5–7].

Нами не обнаружены исследования в области подбора современного УФ-оборудования для концентрирования вируса полиомиелита. В зарубежной научной литературе имеются публикации, связанные с концентрированием вируса полиомиелита с помощью центрифугирования [8] или с применением устаревших методов ультрафильтрации, без подробного описания и анализа [9–11]. В отечественной научной литературе встречаются обзоры [12] и публикации о сравнительном анализе УФ-мембран для очистки и концентрирования других вирусов, например вируса гриппа [13].

Цель настоящей работы — подбор УФ-мембраны, обеспечивающей оптимальные показатели очистки и концентрирования вируса полиомиелита типа 1 (штамм Сэбина). Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

- провести сравнительную оценку характеристик УФ-мембран разных производителей;
- оценить влияние на качество целевого продукта мембран с разными показателями по отсечению;
- сравнить фактическое отсечение компонентов ВСЖ различными мембранами для определения состава белковой нагрузки на целевой продукт.

Качество получаемого концентрата оценивали:

- по количеству общего белка, составляющего основную нагрузку на последующие стадии очистки;
- по количеству инфекционного титра вируса в концентрате, позволяющего определить степень концентрирования;
- по содержанию D-антигена (специфические структуры на поверхности вирусной частицы [14], способные вызывать индукцию нейтрализующих антител) как целевого продукта, определяющего потенциал ИПВ.

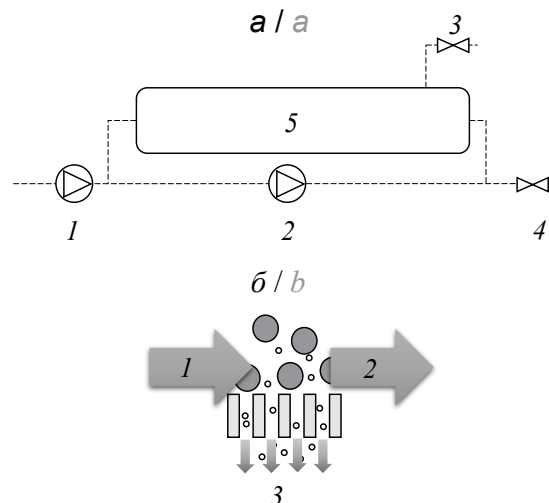


Рис. 1. Схема ультрафильтрации.

- a* — принципиальная схема установки для ультрафильтрации:
1 — питающий насос; 2 — рециркуляционный насос;
3 — линия фильтрата; 4 — линия концентрата.
б — направление потоков жидкости в кассете:
1 — исходная жидкость; 2 — концентрат; 3 — фильтрат.

Fig. 1. Ultrafiltration scheme.

- a* — schematic diagram of the ultrafiltration system: 1 — feed pump; 2 — recirculation pump; 3 — filtrate; 4 — concentrate.
b — example of cassette flow path: 1 — initial liquid; 2 — concentrate; 3 — filtrate.

Материалы и методы

Для проведения работ по концентрированию использовали две лабораторные УФ-системы двух производителей: кассеты немецкой фирмы (I) с мембранами 100 кДа и автоматизированную систему американской фирмы (II) с мембранами 50, 100 и 300 кДа. Сравнительная характеристика УФ-мембран представлена в **табл. 1**. Процессы концентрирования вирусного сбора проводили в соответствии с условиями производителей.

Для репродукции вируса полиомиелита использовали перевиваемую культуру клеток линии Vero (ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН). Нарботку культуры-продуцента проводили в спиннерных колбах («Bellco») рабочим объемом 3 л в условиях псевдосуспензии. В качестве микроносителей использовали «Cytodex 1» («GE Healthcare») в концентрации 3 г/л.

Клетки выращивали в питательной среде Игла МЕМ (ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «Биолот»). Для получения вирусной суспензии использовали аттенуированный штамм Сэбина полиовируса типа 1 — LSc, 2ab (ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН). Множественность заражения клеток составляла 0,02 ТЦД₅₀ (тканевая цитопатогенная доза) на клетку. Получены две серии ВСЖ (титры 5,0 и 7,52 ТЦД₅₀/мл) для достижения целей работ, описанных выше.

Таблица 1. Характеристика УФ-мембран**Table 1.** Characteristics of ultrafiltration membranes

Показатель Parameter	УФ-мембрана I Membrane I	УФ-мембрана II Membrane II
Площадь фильтрующей поверхности, см ² Surface area of the filtration, cm ²	200	50
Минимальный рабочий объем, мл Minimal working volume, ml	20	15
Мёртвый объем мембраны, мл Dead volume of the membrane, ml	5,3	3,2
Материал Material	Полиэфирсульфон Polyethersulfone	Полиэфирсульфон Polyethersulfone
Размер пор мембран, мкм Pore size of the membrane, micron	~0,1	~0,1

Таблица 2. Характеристика первичных и вторичных антител**Table 2.** Characteristics of primary and secondary antibodies

Первичные антитела Primary antibodies	Молекулярная масса, кДа Molecular weight, kD	Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена Secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase
Кроличьи моноклональные антитела к гамма-актину (разведение 1 : 2500) Anti-actin rabbit monoclonal antibodies (dilution 1 : 2,500)	42	Антикролик (разведение 1 : 25 000) Anti-rabbit (dilution 1 : 25,000)
Поликлональные козы антитела к α -Nup 96 (C-20) sc 27400 (разведение 1 : 1000) α -Nup 96 (C-20) sc 27400 goat polyclonal antibodies (dilution 1 : 1,000)	96	Курица-антикоза (разведение 1 : 1000) Chicken anti-goat (dilution 1 : 1,000)
Кроличьи моноклональные антитела к eiF4G (разведение 1 : 1000) eiF4G rabbit monoclonal antibodies (dilution 1 : 1,000)	170	Антикролик (разведение 1 : 25,000) Anti-rabbit (dilution 1 : 25,000)
Мышиные моноклональные антитела к Nup 153 [QE6] (разведение 1 : 2500) Nup 153 [QE6] mouse monoclonal antibodies (dilution 1 : 2,500)	153	Антимышь (разведение 1 : 2500) Anti-mouse (dilution 1 : 2,500)

Осветляющую и стерилизующую фильтрацию вирусного сбора проводили через 50–55 ч после заражения с использованием вакуумных бутылочных фильтров «Steritor» («Merck Millipore») с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм. Перед проведением фильтрации ВСЖ отделяли от осадка частиц микроносителя декантированием.

Специфическую активность вируса определяли по стандартной методике на культуре клеток Нер-2 Цинциннати. Выражали титр в Ig ТЦД₅₀/мл¹.

Концентрацию общего белка определяли по методике Лоури без осаждения².

Присутствие бычьего сывороточного альбумина в образцах определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по общепринятой методике³.

Образцы концентратов и фильтратов с каждого этапа концентрирования (50, 100, 300 кДа) подвергали электрофорезу по методу Лэмли в присутствии

додецилсульфата натрия³. Разделённые в 12% полиакриламидном геле белки переносили на мембрану из поливинилиденфторида («GE Healthcare»). Для предотвращения неспецифического связывания антител мембрану промывали блокирующим раствором (20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 0,05% Твин 20, 5% сухое молоко), затем инкубировали с первичными антителами (табл. 2), которые связываются с исследуемым белком. Мембрану промывали для удаления всех несвязанных первичных антител и инкубировали с конъюгированными вторичными антителами (табл. 2), которые связываются с первичными антителами. Мембрану промывали для удаления всех несвязанных вторичных антител и инкубировали с субстратом ECL-Plus («GE Healthcare»), который реагирует с конъюгированными вторичными антителами для обнаружения расположения белка. Хемилюминесцентное излучение экспонировали на рентгеновскую пленку («Kodak»).

В настоящее время главным способом определения содержания D-антигена в ИПВ является

¹ МУК 4.2.2410-08 Организация и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП).

² ОФС.1.2.3.0012.15. Определение белка. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том I.

³ ОФС.1.2.3.0023.15. Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV, том I.

иммуноферментный анализ [15]. Для количественного определения целевого продукта использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа в «сэндвич»-варианте на основе специфических антител класса Y яичных желтков [16].

Результаты и обсуждение

На первом этапе работ была проведена ультрафильтрация с использованием мембран двух производителей с одинаковыми показателями по отсечению.

Фильтрацию и концентрирование ВСЖ (5,0 ТЦД₅₀/мл) проводили с использованием кассет с отсечением 100 кДа двух производителей: Германии (I) и США (II). В фильтрах, полученных в результате концентрирования, инфекционных вирусных частиц и D-антигена не обнаружено. Результаты анализов полученных концентратов представлены в табл. 3.

Титры вируса и содержание общего белка в концентратах, полученных с использованием обоих мембранных фильтров, статистически достоверно не различались. Разница в содержании D-антигена составляла не более 10%.

Полученные результаты показывают, что оба типа мембранных кассет могут быть использованы для концентрирования ВСЖ вируса полиомиелита типа 1.

На втором этапе исследований была проведена ультрафильтрация ВСЖ (7,52 ТЦД₅₀/мл) вируса полиомиелита типа 1 с использованием мембран с отсечением 50, 100 и 300 кДа (I). Содержание D-антигена в концентрате, полученном с использованием мембраны с отсечением 100 кДа, было статистически достоверно выше показателей, полученных при использовании кассет с отсечением 50 и 300 кДа (табл. 4). Титры вируса в концентратах, полученных с использованием всех трёх типов мембран, достоверно не различались. По содержанию общего белка минимальный показатель был у концентрата,

Таблица 3. Результаты анализов концентратов вируса полиомиелита типа 1, полученных при использовании кассет I и II с отсечением 100 кДа ($M \pm m$)

Table 3. Results of analyses of poliovirus type 1 concentrates obtained using cassettes I and II with 100 kDa cut-off ($M \pm m$)

Показатель Parameter	Кассета I Cassette I	Кассета II Cassette II
Титры вируса, Ig ТЦД ₅₀ /мл Virus titers, Ig TCID ₅₀ /ml	5,85 ± 0,45	5,7 ± 0,07
D-антиген, DU/мл D-antigen, DU/ml	10,5 ± 0,83	11,6 ± 0,51*
Содержание общего белка, мг/мл Total protein, mg/ml	5,3 ± 0,5	5,3 ± 1,1

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с кассетой I (непарный, двуххвостовой t-критерий Стьюдента).
Note. * $p < 0,05$ compared to cassette I (unpaired, two-tailed Student's t-test).

та, приготовленного при использовании мембраны с отсечением 300 кДа. Аналогичные показатели в двух других концентратах не различались и были статистически достоверно выше.

Для оценки потерь целевого продукта фильтраты, полученные во время процессов концентрирования, также были проанализированы по показателям: специфическая активность вируса, содержание D-антигена и общего белка. Содержание общего белка в фильтрах также согласовалось с данными, полученными в концентратах: 0,18 ± 0,02, 0,19 ± 0,02 и 1,38 ± 0,1 мг/мл для кассет с отсечением 50, 100 и 300 кДа соответственно. Инфекционные вирусные частицы и D-антиген в фильтрах не обнаружены.

Получаемый полупродукт с использованием мембран с отсечением 300 кДа является наиболее оптимальным с точки зрения очистки концентрата от примесных белков и оценки его чистоты. По содержанию целевого продукта полученные концентраты отличаются не более чем на 15% от концентратов, полученных при использовании мембран с

Таблица 4. Результаты анализов концентратов вируса полиомиелита типа 1, полученных при использовании кассет с отсечением 50, 100 и 300 кДа в сравнении с исходной ВСЖ ($M \pm m$)

Table 4. Results of analyses of poliovirus type 1 concentrates obtained using 50, 100 and 300 kD cut-off cassettes in comparison with the original viral suspension ($M \pm m$)

Показатель Parameter	Исходная ВСЖ Original viral suspension	50 кДа/kD	100 кДа/kD	300 кДа/kD
Титры вируса, Ig ТЦД ₅₀ /мл Virus titers, Ig TCID ₅₀ /ml	7,52 ± 0,31	8,73 ± 0,25*	8,52 ± 0,07*	8,43 ± 0,19*
D-антиген, DU/мл D-antigen, DU/ml	11,00 ± 0,58	496,00 ± 3,05**	594,00 ± 9,07*	509,00 ± 35,3**
Содержание общего белка, мг/мл Total protein, mg/ml	0,81 ± 0,03	44,66 ± 4,37***	44,49 ± 1,44***	29,52 ± 0,54*

Примечание. $p < 0,05$ по сравнению с: *исходной ВСЖ, **отсечением 100 кДа, ***отсечением 300 кДа (непарный, двуххвостовой t-критерий Стьюдента).

Note. $p < 0,05$ compared to: *original viral suspension; *100 kD and **300 kD cut-off cassettes (unpaired, two-tailed Student's t-test).

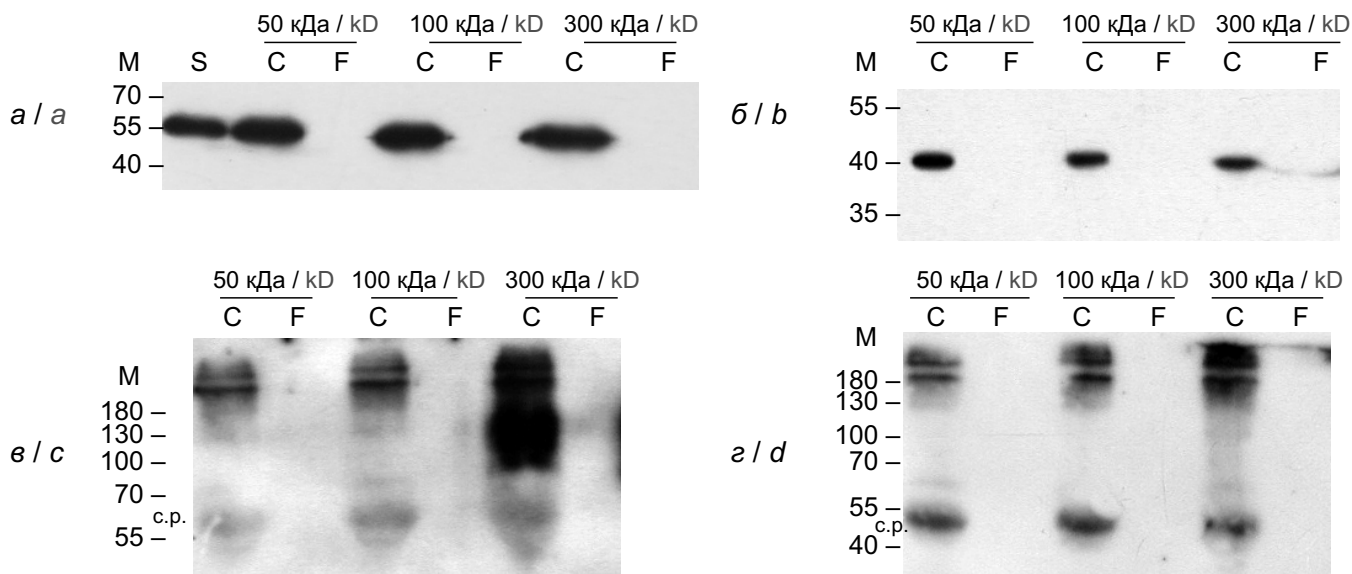


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ концентратов (С), фильтратов (F) и вирусосодержащей жидкости (S) с использованием антител к α -актину (а), фактору инициации трансляции (eIF4GI) (б), нуклеопоринам Nup 96 (в) и Nup 153 (д). На рисунке указаны продукты расщепления нуклеопоринов (с.р.).

Fig. 2. Western blot analysis of concentrates (C), filtrates (F), and viral suspension (S) using antibodies to α -actin (a), eIF4GI factor (b), nucleoporins Nup 96 (c) and Nup 153 (d). The figure shows the cleavage products of nucleoporins (c.p.).

отсечением 100 кДа, что позволяет использовать мембраны с отсечением 300 кДа.

Для оценки фактического отсечения клеточных и вирусных компонентов мембранами 50, 100 и 300 кДа в соответствующих фильтратах и концентратах, а также определения компонентов, составляющих основную белковую нагрузку концентратов, использовали электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг. Клеточные компоненты были выбраны на основании их масс в диапазоне 40–170 кДа. На **рис. 2** представлены результаты вестерн-блоттинга выбранных компонентов.

Несмотря на то что актин (рис. 2, а), имеющий молекулярную массу 42 кДа и размер 4–9 нм, является глобулярным, он полностью концентрируется мембранами на 100 и 300 кДа. Вероятно, это обусловлено связыванием актина с другими компонентами ВСЖ с образованием соединений с массой, превышающей отсечения пор.

На рис. 2, в, г представлены продукты расщепления нуклеопоринов Nup 96 и Nup 153 [17] в конце полиовирусной инфекции, которые одинаково удерживаются рассматриваемыми мембранами.

Фактор инициации трансляции eIF4GI является белком, который участвует в инициации трансляции эукариот и является компонентом кэп-связывающего комплекса eIF4F. На рис. 2, б представлены продукты расщепления этого белка [18]. Только при концентрировании ВСЖ кассетой с отсечением 300 кДа небольшая часть продуктов расщепления попадает в фильтрат, а основная масса, как и в случае использования мембран с отсечением 50 и 100 кДа, собирается в концентрате.

Исходя из полученных результатов вестерн-блоттинга, можно сделать вывод о том, что, вне зависимости от показателя отсечения мембраны, подавляющая часть клеточных компонентов ВСЖ не отсекается на стадии осветляющей и стерилизующей фильтрации, а концентрируется и составляет основную белковую нагрузку на целевой продукт.

На следующем этапе исследования для детекции вирусных белков использовали поликлональные кроличьи антитела (ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН). На **рис. 3** представлен результат вестерн-блот-анализа исследуемых концентратов и фильтратов на капсидный белок полиовируса (VP1), имеющий молекулярную массу 32 кДа [19].

На представленном вестерн-блоте отчетливо видны несколько полос: молекулярной массой 32 кДа — капсидный белок полиовируса (VP1) и полосы, характерные для неспецифического связывания вторичных антител с мембраной. Присутствие в фильтратах различных белковых продуктов вирусной природы может свидетельствовать о том, что в течение полиовирусной инфекции часть вирусных единиц могла не собраться в полный вирион и находится в ВСЖ в виде различных компонентов вируса, включая инфекционную РНК.

Производители УФ-мембран предлагают пользователю очень ограниченную информацию о свойствах УФ-мембран. В **табл. 5** представлена характеристика рассматриваемых мембран одного из производителей УФ-оборудования. Производитель заявляет, что мембраны с отсечением 100 кДа задерживают менее 80% альбумина, 300 кДа не задерживают и пропускают его в фильтрат, а мембраны

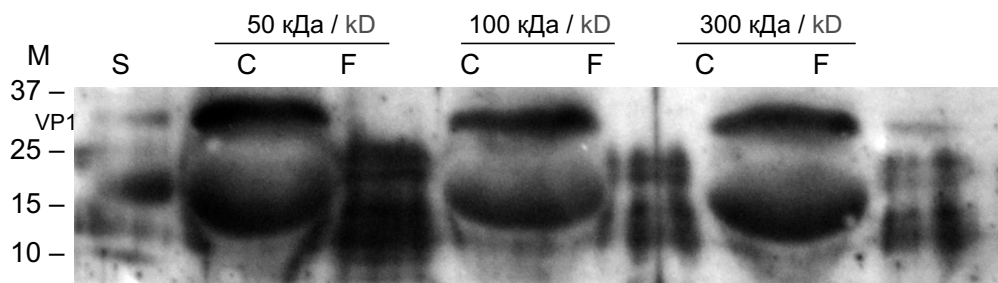


Рис. 3. Капсидный белок вируса полиомиелита VP1 в концентратах (C), фильтратах (F) и ВСЖ (S).
Fig. 3. Capsid protein of the poliomyelitis virus VP1 in concentrates (C), filtrates (F) and viral suspension (S).

Таблица 5. Характеристика мембран по отсекаемым компонентам (%)

Table 5. Characteristics of membranes by cut-off components (%)

Вещество Substance	Приблизительная молекулярная масса, кДа Approximate molecular weight, kDa	Мембрана, кДа Membrane, kD			
		30	50	100	300
Витамин В ₁₂ Vitamin B ₁₂	1,2	–	–	–	–
Бычий сывороточный альбумин Bovine serum albumin	67	–	> 95	< 80	–
γ-Глобулин γ-Globulin	169	–	> 99	≥ 98	< 70
Декстран Dextran	2000	–	–	–	> 95

50 кДа способны задерживать более 95% альбумина в растворе.

Исходя из полученных нами данных, можно сделать предположение, что все мембраны имеют минимальные различия по индикаторному белку — альбумину (**рис. 4**). Все рассматриваемые мембраны задерживают сывороточный альбумин в равной степени, незначительное отличие имеется только при использовании мембраны 300 кДа.

Заключение

Показано, что применение мембран с тем или иным отсечением не оказывает существенного влияния на основные характеристики целевого продукта. Все использованные в работе мембраны удерживали тестируемые клеточные компоненты и компоненты сыворотки вне зависимости от размера отсечения. Это может быть связано как с конформацией компонентов, что приводит к их удерживанию мембраной, так и с налипанием их на другие компоненты ВСЖ (вирусные частицы). Разница не видна и в отношении вирусных белков, проскок которых в фильтрат практически одинаков для каждого типа мембран.

Применение мембран с отсечением 300 кДа с точки зрения качества получаемого целевого продукта и технологичности производственного процесса является наиболее целесообразным для отработки технологии изготовления ИПВ с исполь-

зованием вируса полиомиелита штаммов Сэбина и клеток линии Vero в качестве культуры-продукта.

При проведении процесса ультрафильтрации с мембранами с отсечением 300 кДа процесс концентрирования занимает меньше времени, чем при тех же условиях, но с применением других мембран.

Поскольку получаемый концентрат не является конечным продуктом, а только первой стадией получения ИПВ, основные требования, предъявляемые к качеству концентрата, включают в себя показатели содержания D-антигена и титр вируса, которые сильно зависят от степени концентрирования.

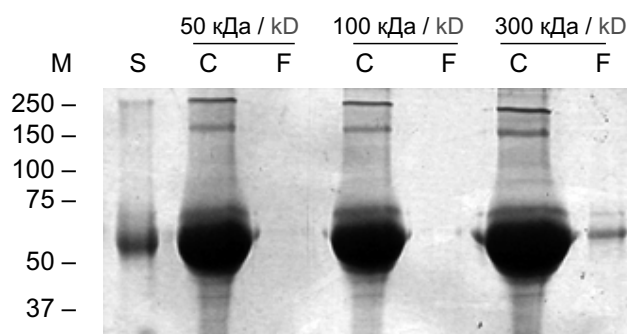


Рис. 4. Присутствие бычьего сывороточного альбумина в концентратах (C), фильтратах (F) и вирусосодержащей жидкости (S).

Fig. 4. Presence of bovine serum albumin in concentrates (C), filtrates (F), and virus-containing liquid (S).

Концентраты также характеризуются содержанием целевого продукта, бычьего сывороточного альбумина и общего белка. Эти компоненты составляют основную нагрузку на стадии очисток полуфабриката (гель-фильтрацию и ионообменную хроматографию) и, соответственно, напрямую влияют на качество очистки получаемого полупродукта на последующих стадиях. Концентраты, полученные с использованием мембран с отсечением 300 кДа, характеризуются наименьшим содержанием бычьего сывороточного альбумина и общего белка (табл. 4). Это позволяет очистить полупродукт (после хроматографических очисток) за меньшее количество циклов и избежать потерь целевого продукта, что является важным для производственного процесса.

Благодарности

Авторы выражают благодарность м.н.с. Л.П. Антоновой и И.О. Целых, а также н.с. А.А. Шишовой за помощь в выполнении исследования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Бичурина М., Романенкова Н., Розаева Н., Воронникова В. Глобальная ситуация по полиомиелиту. Стратегия и тактика ВОЗ по ликвидации полиомиелита. *Журнал инфектологии*. 2011; 3(2): 5–14. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2011-3-2-5-14>
2. Харит С., Покровский В., Рулёва А., Фридман И. Программа эрадикации полиомиелита ВОЗ: проблемы и решения. *Педиатрическая фармакология*. 2016; 13(3): 289–98. <https://doi.org/10.15690/pf.v13i3.1580>
3. Simizu B., Abe S., Yamamoto H., Tano Y., Ota Y., Miyazawa M., et al. Development of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains. *Biologicals*. 2006; 34(2): 151–4. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2006.02.010>
4. Thomassen Y.E., van't Oever A.G., Vinke M., Spiekstra A., Wijffels R.H., van der Pol L.A., et al. Scale-down of the inactivated polio vaccine production process. *Biotechnol. Bioeng.* 2013; 10(5): 1354–65. <https://doi.org/10.1002/bit.24798>
5. Thomassen Y.E., van't Oever A.G., van Oijen M.G.C.T., Wijffels R.H., van der Pol L.A., Bakker W.A.M., et al. Next generation inactivated polio vaccine manufacturing to support post-polio-eradication biosafety goals. *PLoS One*. 2013; 8(12): e83374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083374>
6. Bakker W.A.M., Thomassen Y.E., van't Oever A.G., Westdijk J., van Oijen M.G.C.T., Sundermann L.C., et al. Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. *Vaccine*. 2011; 29(41): 7188–96. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.079>
7. Furtak V., Roivainen M., Mirochnichenko O., Zagorodnyaya T., Laassri M., Zaidi S.Z., et al. Environmental surveillance of viruses by tangential flow filtration and metagenomic reconstruction. *Euro Surveill*. 2016; 21(15): pii30193. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.15.30193>
8. Guskey L.E., Wolff D.A. Concentration and purification of poliovirus by ultrafiltration and isopycnic centrifugation. *Appl. Microbiol.* 1972; 24(1): 13–7.
9. Van Ramshorst J.D. The concentration of poliovirus antigens for D-antigen determination. *Bull. World Health Organ*. 1967; 36(2): 209–18.
10. Theiler M., Bauer J.H. Ultrafiltration of the virus of poliomyelitis. *J. Exp. Med.* 1934; 60(6): 767–72. <http://doi.org/10.1084/jem.60.6.767>


11. Sabin A.B., Hennesen W.A., Warren J. Ultrafiltration and electron microscopy of three types of poliomyelitis virus propagated in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1954; 85(2): 359–63. <https://doi.org/10.3181/00379727-85-20881>
12. Комиссаров А.В., Алешина Ю.А., Громова О.В., Никифоров А.К., Еремин С.А., Волох О.А. и др. Применение ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; (1): 79–84.
13. Кызин А.А., Загидуллин Н.В., Гелич Л.В., Тиммербаева Р.Х., Исрафилов А.Г. Очистка и концентрирование вируса гриппа методом микро и ультрафильтрации. *Вестник Башкирского университета*. 2014; 19(4): 1223–7.
14. Ferguson M., Wood D.J., Minor P.D. Antigenic structure of poliovirus in inactivated vaccines. *J. Gen. Virol.* 1993; 74 (Pt. 4): 685–90. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-4-685>
15. Rezapkin G., Martin J., Chumakov K. Analysis of antigenic profiles of inactivated poliovirus vaccine and vaccine-derived polioviruses by block-ELISA method. *Biologicals*. 2005; 33(1): 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2004.11.001>
16. Иванов А.П., Козлов В.Г., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е., Киктенко А.В. Система иммуоферментного анализа на основе специфических антител класса (IgY) из яичных желтков для количественного определения D-антигена в инaktivированных полиовирусных вакцинах. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(6): 39–42.
17. Park N., Katikaneni P., Skern T., Gustin K.E. Differential targeting of nuclear pore complex proteins in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* 2008; 82(4): 1647–55. <https://doi.org/10.1128/jvi.01670-07>
18. Cardinali B., Fiore L., Campioni N., De Dominicis A., Pierandrei-Amaldi P. Resistance of ribosomal protein mRNA translation to protein synthesis shutoff induced by poliovirus. *J. Virol.* 1999; 73(8): 7070–6. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.8.7070-7076.1999>
19. Hogle J.M., Chow M., Filman D.J. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*. 1985; 229(4720): 1358–65. <https://doi.org/10.1126/science.2994218>

REFERENCES

1. Bichurina M., Romanenkova N., Rozaeva N., Voronnikova V. Global situation for poliomyelitis. Who strategy and tactics of global polio eradication. *Zhurnal infektologii*. 2011; 3(2): 5–14. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2011-3-2-5-14> (in Russian)
2. Kharit S., Pokrovskiy V., Ruleva A., Fridman I. WHO polio eradication program: problems and solutions. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2016; 13(3): 289–98. <https://doi.org/10.15690/pf.v13i3.1580> (in Russian)
3. Simizu B., Abe S., Yamamoto H., Tano Y., Ota Y., Miyazawa M., et al. Development of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains. *Biologicals*. 2006; 34(2): 151–4. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2006.02.010>
4. Thomassen Y.E., van't Oever A.G., Vinke M., Spiekstra A., Wijffels R.H., van der Pol L.A., et al. Scale-down of the inactivated polio vaccine production process. *Biotechnol. Bioeng.* 2013; 10(5): 1354–65. <https://doi.org/10.1002/bit.24798>
5. Thomassen Y.E., van't Oever A.G., van Oijen M.G.C.T., Wijffels R.H., van der Pol L.A., Bakker W.A.M., et al. Next generation inactivated polio vaccine manufacturing to support post-polio-eradication biosafety goals. *PLoS One*. 2013; 8(12): e83374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083374>
6. Bakker W.A.M., Thomassen Y.E., van't Oever A.G., Westdijk J., van Oijen M.G.C.T., Sundermann L.C., et al. Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. *Vaccine*. 2011; 29(41): 7188–96. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.079>
7. Furtak V., Roivainen M., Mirochnichenko O., Zagorodnyaya T., Laassri M., Zaidi S.Z., et al. Environmental surveillance of viruses by tangential flow filtration and metagenomic reconstruction.

- tion. *Euro Surveill.* 2016; 21(15): pii30193. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.15.30193>
8. Guskey L.E., Wolff D.A. Concentration and purification of poliovirus by ultrafiltration and isopycnic centrifugation. *Appl. Microbiol.* 1972; 24(1): 13–7.
 9. Van Ramshorst J.D. The concentration of poliovirus antigens for D-antigen determination. *Bull. World Health Organ.* 1967; 36(2): 209–18.
 10. Theiler M., Bauer J.H. Ultrafiltration of the virus of poliomyelitis. *J. Exp. Med.* 1934; 60(6): 767–72. <http://doi.org/10.1084/jem.60.6.767>
 11. Sabin A.B., Hennessen W.A., Warren J. Ultrafiltration and electron microscopy of three types of poliomyelitis virus propagated in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1954; 85(2): 359–63. <https://doi.org/10.3181/00379727-85-20881>
 12. Komissarov A.V., Aleshina Yu.A., Gromova O.V., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Volokh O.A., et al. Deployment of ultrafiltration for concentrating and purification of antigens. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2015; (1): 79–84. (in Russian)
 13. Kyzin A.A., Zagidullin N.V., Gelich L.V., Timerbaeva R.Kh., Israfilov A.G. Purification and concentration of influenza virus by micro and ultrafiltration. *Vestnik Bashkirskogo universiteta.* 2014; 19(4): 1223–7. (in Russian)
 14. Ferguson M., Wood D.J., Minor P.D. Antigenic structure of poliovirus in inactivated vaccines. *J. Gen. Virol.* 1993; 74(Pt. 4): 685–90. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-4-685>
 15. Rezapkin G., Martin J., Chumakov K. Analysis of antigenic profiles of inactivated poliovirus vaccine and vaccine-derived polioviruses by block-ELISA method. *Biologicals.* 2005; 33(1): 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2004.11.001>
 16. Ivanov A.P., Kozlov V.G., Klebleeva T.D., Ivanova O.E., Kiktenko A.V. An ELISA system based on the specific class Y (IgY) antibodies from egg yolks for the quantitative determination of D-antigen in inactivated poliovirus vaccines. *Voprosy virusologii.* 2014; 59(6): 39–42. (in Russian)
 17. Park N., Katikaneni P., Skern T., Gustin K.E. Differential targeting of nuclear pore complex proteins in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* 2008; 82(4): 1647–55. <https://doi.org/10.1128/jvi.01670-07>
 18. Cardinali B., Fiore L., Campioni N., De Dominicis A., Pierandrei-Amaldi P. Resistance of ribosomal protein mRNA translation to protein synthesis shutoff induced by poliovirus. *J. Virol.* 1999; 73(8): 7070–6. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.8.7070-7076.1999>
 19. Hogle J.M., Chow M., Filman D.J. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science.* 1985; 229(4720): 1358–65. <https://doi.org/10.1126/science.2994218>

Информация об авторах

Ковпак Анастасия Александровна  — м.н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов, ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3200-763X>

Ивин Юрий Юрьевич — н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов, ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0995-7944>

Пиняева Анастасия Николаевна — м.н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов, ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5381-2393>

Халчаев Юсуф Хаджи-бекович — д.б.н., начальник отделения полиомиелитной вакцины ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1613-5228>

Ожерелков Сергей Викторович — д.б.н., в.н.с. лаб. клещевого энцефалита и других вирусных энцефалитов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9778-0485>


Алла Владимировна Белякова — к.б.н., учёный секретарь, ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4363-6394>

Ишмухаметов Айдар Айратович — д.м.н., проф., член-корр. РАН, генеральный директор ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия; зав. кафедрой организации и технологии иммунобиологических препаратов ПМГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 29.10.2020;
принята к публикации 10.02.2021;
опубликована 20.04.2021.

Information about the authors

Anastasia A. Kovpak  — junior researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3200-763X>

Yury Y. Ivin — senior researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0995-7944>

Anastasia N. Piniaeva — junior researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5381-2393>

Yusuf Kh. Kharbaev — D. Sci. (Biol.), Head, Polio vaccine department, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1613-5228>

Sergey Viktorovich Ozherelkov — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of tick-borne encephalitis and other viral encephalitis, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9778-0485>

Alla Vladimirovna Belyakova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of biotechnology, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4363-6394>

Aydar A. Ishmukhametov — D. Sci. (Med.), Prof., corresponding member of the Russian Academy of Sciences, General Director, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Head, Department of organization and technology of immunobiological preparations, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.