

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043649**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.08**

(21) Номер заявки  
**202190638**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.04.20**

(51) Int. Cl. **A61K 39/102** (2006.01)  
**C12P 19/04** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12R 1/21** (2006.01)

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ ГЕМОФИЛЬНОЙ ТИП В КОНЬЮГИРОВАННОЙ**(31) **2019112197**(32) **2019.04.22**(33) **RU**(43) **2022.01.28**(86) **PCT/RU2020/050077**(87) **WO 2020/218949 2020.10.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ  
ПРЕДПРИЯТИЕ "САНКТ-  
ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ ВАКЦИН И  
СЫВОРОТОК И ПРЕДПРИЯТИЕ ПО  
ПРОИЗВОДСТВУ БАКТЕРИЙНЫХ  
ПРЕПАРАТОВ" ФЕДЕРАЛЬНОГО  
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО  
АГЕНТСТВА (RU)**

(72) Изобретатель:

**Трухин Виктор Павлович, Евтушенко  
Анатолий Эдуардович, Красильников**

**Игорь Викторович, Салимова  
Елена Леонидовна, Уйба Станислав  
Валентинович, Васильев Юрий  
Михайлович, Конон Анастасия  
Дмитриевна (RU)**

(74) Представитель:  
**Насонова К.В. (RU)**

(56) WO-A1-2014006318  
SALIMOVA E.L. et al. "Tehnologia  
poluchenia poliribozilribitolfosfata v kachestve  
aktivnoi farmatsevticheskoi substansii dlia  
proizvodstva polisakharidnykh vaktsin". Farmatsiia i  
farmakologiya, 2018, Tom 6, No. 1, p. 47-62, DOI:  
10.19163/2307-9266-2018-6-1-47-62, p. 48, column  
2, lines 12-14, p. 49, column. 1, lines 1-4, 14-20, 31-33  
RU-C2-2542393

SALIMOVA E.L. et al. "Osobnosti  
kultivirovaniya shtammov Haemophilus influenza tip  
b - produtsentov poliribozilribitolfosfat; - osnovnogo  
komponenta polisakharidnykh vaktsin". Farmatsia i  
farmakologia, 2017, Tom 5, No. 5, p. 422-441,  
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-5-422-441, p. 423,  
column 1, lines 12-15, p. 427, column 2, lines 15-22

(57) Изобретение относится к медицинской микробиологии и может быть использовано для изготовления вакцинных препаратов. Предложен способ получения вакцины гемофильной тип b конъюгированной. Способ включает культивирование штамма Haemophilus influenzae тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884 на жидкой питательной среде с добавлением рибозы, инактивацию культуры нагреванием до (55±5)°С и выдерживанием (15±3) мин, отделение биомассы центрифугированием и выделение полирибозилрибитолфосфата (ПРФ) путем осаждения 10%-ным раствором цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ). Затем выполняют концентрирование, очистку, осветление, активацию ПРФ и смешивание его со столбнячным анатоксином. Затем полученную субстанцию очищают, стерилизуют, добавляют фармацевтически приемлемые носители, разливают и лиофильно высушивают. Способ обеспечивает повышение выхода целевого продукта.

**B1****043649****043649 B1**

### Область техники

Изобретение относится к области биотехнологии и касается способа получения конъюгированной вакцины для профилактики гемофильной инфекции из штамма *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884.

### Уровень техники

Описан способ получения капсулярного полисахарида *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), заключающийся в культивировании штамма в культуральной среде, сборе и обработке супернатанта культуры для экстрагирования капсулярного полисахарида с последующим его конъюгированием с белком-носителем (патент RU 2644246). Недостатком данного способа является использование для культивирования продуцента питательной среды сложного состава, состоящей из 33 компонентов, многие из которых требуют отдельной предварительной подготовки. Кроме того, инактивацию биомассы проводят раствором формалина в конечной концентрации 0,35-0,37% (об./об.), отсутствие остатков которого необходимо подтвердить в готовой вакцине.

В патенте (RU 2542393) раскрывается способ получения конъюгата капсульного полисахарида *Haemophilus influenzae* тип b с антигенами, который включает получение смеси столбнячного и дифтерийного анатоксинов, адсорбированных на геле гидроокиси или фосфата алюминия, ее очистку, связывание карбодимидным способом через дигидразид адипиновой кислоты с капсульным полисахаридом Hib и отмывку центрифугированием. Недостатком данного способа является использование анатоксинов адсорбированных на геле гидроокиси или фосфата алюминия. Присутствие гидроокиси или фосфата алюминия в составе вакцины потенциально увеличивает ее реактогенность и поствакцинальные осложнения, а также может приводить к формированию иммунного ответа в том числе и на анатоксины.

Наиболее близким аналогом заявляемого изобретения является способ получения антигенного вакцинного препарата *Haemophilus influenzae* типа В путем выращивания бактерий на жидких питательных средах с последующим отделением биомассы методом ультрафильтрации на молекулярных волоконных фильтрах для извлечения экзогенного полисахарида. Далее концентрат клеток обрабатывают 2,5%-ным раствором натрия хлорида с натриевой солью ЭДТА и из полученного экстракта ультрафильтрацией на молекулярных волоконных фильтрах выделяют капсульный полисахарид Hib в комплексе с белком, который соединяют с экзогенным полисахаридом Hib в соотношении 1:1 (патент RU 2185191).

Недостатком данного способа является долгая подготовка посевного материала (10 ч) с использованием твердой питательной среды, что приводит к необходимости смыва клеток с поверхности физиологическим раствором, сопровождающегося высоким риском контаминации и дополнительными трудозатратами по подготовке матрасов со стерильной средой. Инактивацию биомассы проводят раствором формалина, что приводит к необходимости последующего подтверждения его отсутствия в готовой вакцине и, следовательно, проведения дополнительного контроля. Использование ультрафильтрации для отделения биомассы из культуральной жидкости приводит к потерям по капсульному полисахариду ввиду использования молекулярных волокон с малым размером пор (20 кДа), на которых в процессе фильтрации скапливается слой бактериальных клеток, задерживающих целевой продукт полисахарид ПРФ. Экзогенный полисахарид Hib после отделения биомассы концентрируется только на молекулярных волокнах без дальнейшей очистки, а капсульный полисахарид в комплексе с белком Hib также подвергается дополнительно только диализу, что может усиливать реактогенность готовой вакцины. Раскрытие сущности изобретения.

Нами разработан способ получения вакцины гемофильной тип b конъюгированной, получаемой путем культивирования оригинального штамма *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884 (штамм защищен патентом RU 2624014) в жидкой питательной среде простого состава с последующим выделением, концентрированием и очисткой субстанции полирибозилрибитолфосфата (ПРФ), которую активируют, конъюгируют с модифицированным белком-носителем и подвергают дополнительной поэтапной очистке. Полученный конъюгат стерилизуют фильтрацией, добавляют необходимые растворители в рассчитанном количестве, разливают по флаконам и лиофильно высушивают.

Техническими результатами, достигаемыми при осуществлении изобретения, являются следующие.

По сравнению с используемыми способами получения конъюгированных вакцин для профилактики гемофильной инфекции субстанцию ПРФ получают из высокопродуктивного штамма *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884, культивируемого в жидкой питательной среде простого состава, в которую в одном из вариантов дополнительно внесен раствор рибозы. При этом концентрация полисахарида в культуральной жидкости выше, описанной в патенте RU 2644246 (до 300 мкг/мл), и составляет 528-594 мкг/мл в случае с добавлением рибозы и 400-450 мкг/мл без добавления рибозы.

В предлагаемой технологии исключена стадия подготовки посевного материала путем культивирования продуцента на твердой питательной среде, что сокращает время и затраты на получение вакцины. Инактивация культуральной жидкости проводится путем нагревания, а не добавлением формалина, что исключает необходимость контроля его содержания в готовой вакцине. Инактивированная культуральная жидкость подвергается очистке через каскад глубинных фильтров с диаметром пор от 3,0-0,8 до 0,3-0,1 мкм, что позволяет отделить бактериальную массу и при этом минимизировать потери по полисахариду. При очистке и выделении субстанции нативный раствор ПРФ предварительно подвергается кон-

центрированию (в одном из вариантов), что значительно снижает объемы продукта, а значит позволяет уменьшить затраты на реагенты и упрощает процесс. В качестве белка-носителя используется столбнячный анатоксин не сорбированный на геле гидроокиси или фосфата алюминия, что делает полученную вакцину не реактогенной и при этом высоко иммуногенной. Очистка полисахарида ПРФ и конъюгата с белком-носителем проводится с использованием ультрафильтрационных кассет из современных материалов - полиэфирсульфон, гель-хроматографии, в одном из вариантов осветлением путем фильтрации через угольные картонные фильтры с диаметром пор 0,5-1,0 мкм, что позволяет снизить содержание эндотоксинов, нуклеиновых кислот, белка, удалить остаточные реагенты, используемые для конъюгации.

Таким образом, изобретение представляет собой способ получения вакцины гемофильной тип b конъюгированной, включающий следующие этапы: культивирование штамма *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884 на жидкой питательной среде следующего состава, г/л: глюкоза - 5,0; дрожжевой экстракт - 2,0; пептон - 15,0;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 0,7;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 2,5;  $\text{KCl}$  - 0,5;  $\text{NaCl}$  - 3,3; L-глутаминовая кислота - 1,2; L-цистеин - 0,015; НАД - 0,02; гемин - 0,04, инактивацию культуры при помощи нагревания до  $(55\pm 5)^\circ\text{C}$  и выдерживания  $(15\pm 3)$  мин, центрифугирование для отделения биомассы с последующей фильтрацией через каскад глубинных фильтров с диаметром пор от 3,0-0,8 до 0,3-0,1 мкм, выделение полирибозилрибитолфосфата (ПРФ) путем осаждения 10%-ным раствором цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ), концентрирование и очистку, активацию полученной субстанции растворами 1-циано-4-диметил-аминопиридиния тетрафторобората (ЦДАФ) и триэтиламина и смешивание со столбнячным анатоксином, модифицированным раствором этилдиметиламинопролинкарбодиимида (ЭДАК), не сорбированным на геле гидроокиси или фосфата алюминия, очистку, стерилизацию, добавление фармацевтически приемлемых носителей, розлив и лиофильную сушку.

#### **Осуществление изобретения**

Пример получения вакцины гемофильной тип b конъюгированной из оригинального штамма *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884.

Пример 1. Первый технологический этап получения субстанции ПРФ заключается в создании Главного банка культуры (ГБК) и Рабочего банка культуры (РБК). Для этого оригинальный штамм *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884 культивируют в жидкой питательной среде в колбах на протяжении 4-6 часов, при температуре  $(35\pm 2)^\circ\text{C}$  и  $(150\pm 10)$  об/мин до достижения середины экспоненциальной фазы роста. К культуральной жидкости *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884 добавляют стерильный 80%-ный раствор глицерина в объеме, соответствующем 25% объема культуральной жидкости (или соотношение 1:4). Розлив культуральной жидкости с криопротектором осуществляют в криопробирки вместимостью 5,0 мл по 1,0 мл. Каждую криопробирку маркируют. Полученные пробирки ГБК хранят в низкотемпературном холодильнике при температуре минус  $(80\pm 3)^\circ\text{C}$  на протяжении не более 10 лет. Пробирки ГБК используют для получения РБК по описанной выше схеме.

В табл. 1 представлены результаты контроля Рабочего банка культуры *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884 о соответствии по всем показателям нормативным значениям.

Таблица 1

Результаты контроля Рабочего банка культуры *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884

Наименование показателя	Нормативные значения	Результат контроля
Окраска по Граму	Культура <i>Haemophilus influenzae</i> тип b по Граму должна окрашиваться отрицательно, при микроскопии должны наблюдаться мелкие неподвижные неспорообразующие палочки овоидной формы.	Грамотрицательные мелкие неподвижные неспорообразующие палочки овоидной формы.
Каталазная активность	Положительная	Положительная
Оксидазная активность	Положительная	Положительная
Агглютинация со специфической к HiV сывороткой	Положительная	Положительная
Чистота культуры	Отсутствие контаминации	Контаминация отсутствует
Рост в присутствии X и V фактора	Положительный	Положительный
Жизнеспособность	$\geq 1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл	$1,9 \cdot 10^7$ КОЕ/мл

РБК используют для получения рабочего посевного материала (РПМ). Для этого в асептических условиях восстановленную культуру из РБК переносят в жидкую питательную среду, разлитую в конические колбы. Культуру выращивают на протяжении 4-6 часов, при температуре  $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$  и  $(150 \pm 10)$  об/мин до достижения середины экспоненциальной фазы роста.

Полученную культуральную жидкость объединяют в колбе и контролируют по показателям "Чистота культуры", "Окраска по Граму". Рабочий посевной материал получают в количестве 10% от количества питательной среды, используемой в ферментере.

Далее проводят культивирование в ферментере Biostat® A MO UniVessel® Glass 2L 230V (Sartorius). Состав питательной среды для получения максимального количества ПРФ *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884, г/л: глюкоза - 5,0; дрожжевой экстракт - 2,0; пептон - 15,0;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 0,7;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 2,5;  $\text{KCl}$  - 0,5;  $\text{NaCl}$  - 3,3; L-глутаминовая кислота - 1,2; L-цистеин - 0,015; НАД - 0,02; гемин - 0,04. Дополнительно добавляют питательные вещества к культуре, после достижения ею оптической плотности 1,0, в виде 20%-ного раствора глюкозы и 10% дрожжевого экстракта (соотношение 1:1).

Рабочий посевной материал при помощи перистальтического насоса (через сифон) перекачивают в ферментер. Проводят культивирование при следующих условиях:

Количество оборотов мешалки: 100-300 об/мин; температура:  $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$ ;

количество растворенного кислорода: 30% (регулируется карскадом); pH:  $(7,2 \pm 0,2)$ ;

Полученную производственную культуру контролируют по показателям "Окраска по Граму", "Чистота культуры". Количество синтезированного полисахарида ПРФ составляет 400-450 мкг/мл.

По завершении процесса культивирования проводят инактивацию культуры при помощи нагревания до  $(55 \pm 5)^\circ\text{C}$  и выдерживания  $(15 \pm 3)$  мин без перемешивания. Инактивацию культуры подтверждают путем высева культуральной жидкости на шоколадный агар (отсутствие роста культуры).

Полученную инактивированную культуру центрифугируют (центрифуга Beckman coulter AvantiJ-E) для отделения биомассы с последующей фильтрацией через каскад глубинных фильтров с диаметром пор 0,3-0,6 мкм и 0,1-0,3 мкм.

Полисахарид из фильтрата выделяют путем осаждения 10%-ным раствором цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ). Смесь оставляют при температуре  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  до выпадения осадка. Полученный осадок ПРФ центрифугируют и гомогенизируют при помощи гомогенизатора RW 16 basic (производитель

"1КА") при скорости вращения (6000±500) об/мин до полного его растворения. Экстракцию ПРФ проводят спиртом этиловым в количестве 40% по объему. После окончания экстракции приступают к отделению осадка центрифугированием. К полученному супернатанту добавляют 1,0% (по объему) 4,0 М раствора натрия хлорида, содержимое бутыли встряхивают вручную и оставляют при температуре (5±3)°С на (13±1) ч в холодной комнате. Осадок отделяют центрифугированием, собирают и высушивают при уровне вакуума от 0,04 мбар в течение (24±4) ч. Полученную субстанцию ПРФ контролируют по показателям "Описание", "Вода", "Подлинность", "Распределение молекул ПРФ по размеру", "Рибоза", "ПРФ", "Фосфор", "Белок", "Нуклеиновые кислоты", "Бактериальные эндотоксины".

При помощи реакции латекс-агглютинации подтверждают подлинность полученного продукта (фигура). Образование хлопьевидного осадка свидетельствует о наличии ПРФ в субстанции.

В табл. 2 представлены результаты контроля полученной субстанции ПРФ о соответствии по всем показателям нормативным значениям.

Таблица 2  
Результаты контроля субстанции ПРФ, полученной из  
оригинального штамма *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884

Наименование показателя	Нормативные значения	Результат
Описание	Лиофильная масса белого цвета	Лиофильная масса белого цвета
Подлинность	Образование хлопьевидного осадка в реакции латекс-агглютинации	Положительная
Распределение молекул ПРФ по размеру	ПРФ ≥ 40%; Kd ≤ 0,3	ПРФ = 41,4%; Kd = 0,14
Рибоза	Не менее 32%	32 %
Концентрация ПРФ	Не менее 0,73 мг/мг субстанции	0,74 мг/мг субстанции
Белок	Не более 1 %	0,8 %
Нуклеиновые кислоты	Не более 1 %	0,4 %
Бактериальные эндотоксины	Менее 25 ЕЭ в 1 мкг ПРФ	Менее 25 ЕЭ в 1 мкг ПРФ

Полученную субстанцию ПРФ используют для получения вакцины гемофильной тип b конъюгированной. Для этого готовят раствор субстанции, ПРФ активируют растворами 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторбората (ЦДАФ) и триэтиламина и смешивают со столбнячным анатоксином, модифицированным раствором этилдиметиламинопролинкарбодиимида (ЭДАК). Полученный конъюгат концентрируют и проводят его диафильтрацию на ультрафильтрационной установке с кассетой 100 кДа. Далее предварительно фильтруют через мембрану 0,45 мкм и очищают на хроматографической колонке с сорбентом "Сефадекс G-25". Собранный элюат подвергают стерилизующей фильтрации через мембрану 0,22 мкм и контролируют.

Полученный конъюгат ПРФ со столбнячным анатоксином контролируют по показателям "Описание", "Подлинность", "рН", "Белок", "Соотношение ПРФ к белку", "Концентрация ПРФ", "Свободный ПРФ", "Свободный белок", "Распределение молекул ПРФ по размеру", "Стерильность", "ЭДАК", "ЦДАФ", "Бактериальные эндотоксины".

Результаты контроля полученного конъюгата ПРФ со столбнячным анатоксином соответствует по всем показателям нормативным значениям.

Полученный промежуточный продукт используют на стадии сведения вакцины: используют рассчитанное количество промежуточного продукта (конъюгата), стерильного 0,5 М раствора сахарозы, стерильного 0,1 М раствора трис-НСI и стерильной воды для инъекций. Розлив сведенной вакцины (доза розлива - 0,6 мл) осуществляют в предварительно подготовленные флаконы 2R. Вакцину лиофильно высушивают при заданных параметрах и передают на стадию упаковки и маркировки. Контроль готовой продукции проводят согласно НД по следующим показателям: "Описание", "Подлинность", "Растворимость", "Механические включения", "рН", "Вода", "Точность розлива", "Фосфор", "Капсульный полиса-

харид", "Стерильность", "Аномальная токсичность", "Пирогенность", "Сахароза". По всем показателям полученная вакцина гемофильная тип b конъюгированная соответствует требованиям нормативной документации.

Пример 2. Получение вакцины гемофильной тип b конъюгированной из штамма *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884 осуществляют как описано в примере 1.

Интенсифицируют образование полисахарида ПРФ добавлением в питательную среду 0,5%-ного раствора рибозы, что приводит к увеличению еще на 32% концентрации образуемого ПРФ (до 528-594 мкг/мл).

Фильтрат после отделения биомассы концентрируют (в 10 раз) и подвергают диафильтрации на ультрафильтрационной установке с номинальным отсечением по молекулярной массе 30 кДа.

Супернатант после экстракции этиловым спиртом и отделения осадка фильтруют через угольные глубинные фильтры с диаметром пор 0,5-1,0 мкм, после чего определяют оптическую плотность полученного фильтрата (при длине волны 275 нм).

Приведенные дополнительные технологические этапы позволяют увеличить содержание ПРФ в субстанции с 0,74 до 0,95 мг/мг субстанции, а также снизить количество нуклеиновых кислот и белка с 0,8 до 0,1%, количество эндотоксинов - со значения менее 25 ЕЭ в 1 мкг ПРФ до менее 5 ЕЭ в 1 мкг ПРФ.

Вакцина гемофильная тип b конъюгированная из штамма *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884 успешно прошла доклинические исследования на половозрелых и неполовозрелых животных, в ходе которых была доказана ее безопасность и иммуногенность в сравнении с препаратом сравнения "Акт-ХИБ®" (производства Sanofi Pasteur, Франция) и "Вакцина гемофильная тип b конъюгированная, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения 0,5 мл/доза" (производства ФБУН Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии).

Способ позволяет получить вакцину гемофильную тип b конъюгированную из оригинального штамма *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884, обладающую протективной активностью, не уступающую существующим конъюгированным вакцинам и сохраняющую стабильность всех показателей качества в течение установленного срока годности (1,5 года).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения вакцины гемофильной тип b конъюгированной, включающий следующие этапы: культивирование штамма *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884 на жидкой питательной среде следующего состава, г/л: глюкоза - 5,0; дрожжевой экстракт - 2,0; пептон - 15,0;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 0,7;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 2,5;  $\text{KCl}$  - 0,5;  $\text{NaCl}$  - 3,3; L-глутаминовая кислота - 1,2; L-цистеин - 0,015; НАД - 0,02; гемин - 0,04, при этом питательная среда для культивирования *Haemophilus influenzae* тип b "ГКПМ-Оболенск" В-7884 содержит рибозу, инактивацию культуры при помощи нагревания до  $(55 \pm 5)^\circ\text{C}$  и выдерживания  $(15 \pm 3)$  мин, центрифугирование для отделения биомассы с последующей фильтрацией через каскад глубинных фильтров с диаметром пор от 0,3-0,6 до 0,3-0,1 мкм, выделение из супернатанта полирибозилрибитолфосфата (ПРФ) путем осаждения 10%-ным раствором цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ), его концентрирование и очистку, при этом очистку проводят путем экстракции этиловым спиртом в количестве 40% по объему и отделения осадка, осветление супернатанта путем фильтрации через угольные глубинные фильтры с диаметром пор 0,5-1,0 мкм, активацию полученной субстанции растворами 1-циано-4-диметил-аминопиридиния тетрафторобората (ЦДАФ) и триэтиламина и смешивание со столбнячным анатоксином, модифицированным раствором этилдиметиламинопролинкарбодиимида (ЭДАК), очистку, стерилизацию полученного конъюгата ПРФ со столбнячным анатоксином, добавление фармацевтически приемлемых носителей, розлив и лиофильную сушку вакцины.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что после отделения биомассы осуществляют стадию концентрирования нативного раствора ПРФ 10%-ным раствором цетилтриметиламмония бромида.

