

На правах рукописи



**АБРАМОВА ЕЛЕНА ГЕННАДЬЕВНА**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА  
ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Оболенск – 2018

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

#### **Научный консультант**

Никифоров Алексей Константинович, доктор биологических наук, доцент, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместитель директора

#### **Официальные оппоненты:**

Клюкина Валентина Ивановна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Федерального агентства научных организаций, Московская область, Щелковский район, поселок Биокомбината, отдел иммунологии, заведующая отделом

Жарникова Ирина Викторовна, доктор биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь, научно-производственная лаборатория препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций, ведущий научный сотрудник

Степанов Александр Валентинович, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, г. Санкт-Петербург, Научно-исследовательский испытательный центр медико-биологической защиты, главный научный сотрудник

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Московская область, г. Сергиев Посад

Защита состоится «23» марта 2018 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 в **Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора)** по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки РФ.  
Диссертация и автореферат размещены на сайте [www.obolensk.org/center/diss/competitor.htm](http://www.obolensk.org/center/diss/competitor.htm).  
С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 350.002.01  
кандидат биологических наук



Фурсова Надежда Константиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследований.** Важным вектором развития отечественной медицинской биотехнологии является совершенствование производства иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), в том числе противовирусных, за счет внедрения современных достижений науки и техники. К числу ИЛП относится антирабический иммуноглобулин (АИГ) из сыворотки крови лошади, применяемый для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей. Гетерологичный АИГ производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», входящий в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения, является самым востребованным ИЛП в Российской Федерации из всех зарегистрированных отечественных гетерологичных иммуноглобулинов и сывороток против различных бактериальных и вирусных инфекций (Гаврилова Н.А. и др., 2016; Мовсесянц А.А. и др., 2015). Столь высокая востребованность препарата объясняется широким распространением бешенства – одного из самых опасных заболеваний в мире (Львов Д.К., 2013; Селимов М.А., 1978). Несмотря на предпринимаемые меры по ограничению распространения бешенства и усиление мер профилактики среди диких и домашних животных, повсеместно ликвидировать данное заболевание до сих пор не удается (Макаров В.В. и др., 2015; Consales С.А. et al., 2007; Lvov D.K. et al., 2015). По данным ВОЗ, ежегодно в мире от бешенства умирают до 70 тыс. человек, половина из них – дети до 15 лет (WHO Expert Consultation on Rabies, 2013). В России также отмечается напряженная эпизоотическая ситуация по бешенству, тенденций к улучшению нет (Симонова Е.Г. и др., 2014). Бешенство среди животных регистрируется практически во всех федеральных округах России, наиболее неблагоприятными являются регионы Центрального, Приволжского и Южного федеральных округов (Чернышова Е.В. и др., 2013). Ежегодно на территории нашей страны регистрируется от 839 до 7633 случаев бешенства животных, а за период с 1975 по 2014 гг. в России зафиксировано 489 случаев смертей людей от бешенства, что составляет в среднем 12,5 случаев в год (Мовсесянц А.А. и др., 2012; Полещук Е.М. и др., 2016; Lvov D.K. et al., 2015).

Из-за абсолютной летальности бешенства вопросы постэкспозиционной профилактики заболевания имеют исключительно важное значение, а практическую значимость антирабических препаратов невозможно переоценить. По данным ВОЗ, более 15 млн человек в мире ежегодно получают антирабическое лечение, что позволяет предотвращать сотни тысяч случаев смерти от бешенства (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/ru/>). В медицинские учреждения Российской Федерации ежегодно в связи с контактами с больными или подозрительными на бешенство животными обращаются свыше 400000 человек, половине из которых назначают курс специфического антирабического лечения (Мовсесянц А.А. и др., 2015; Полещук Е.М. и др., 2016). На сегодняшний день гетерологичный АИГ производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» является единственным отечественным зарегистрированным лекарственным средством пассивной иммунизации, минимизирующим риск заболевания людей бешенством при укусах опасной локализации. Гетерологичный АИГ, по мнению экспертов ВОЗ, является безопасной и вполне приемлемой альтернативой гомологичному АИГ из иммунной сыворотки крови человека, что обусловлено качественной очисткой иммуноглобулиновой фракции в результате применения современных технологий (WHO Expert Consultation on Rabies, 2005, 2013). До 1999 г. Российская Федерация не располагала собственным производством АИГ, выпуск препарата был локализован на территории Украины (Харьков, «Биолек»). Резкий подъем уровня заболеваемости

бешенством среди диких и домашних животных в 90-е гг. и, как следствие, возросшее количество обращающихся за антирабической помощью людей выявили необходимость организации производства отечественного АИГ. В 1999 г. по поручению Главного государственного санитарного врача Российской Федерации (№ 2510/12020-99-26 от 09.11.99 г.) и решению Межведомственной комиссии Совета Безопасности Российской Федерации по охране здоровья населения (№ 1 от 24.10.2000 г.) в РосНИПЧИ «Микроб» были начаты экспериментальные разработки по получению гетерологичного АИГ, а в 2004 г. институт приступил к серийному выпуску препарата. В Российской Федерации, по сведениям Российской базы данных АИС-Росздравнадзор-Фармаконадзор, за последние 7 лет ежегодно регистрируется от 6 до 58 случаев нежелательных реакций на введение гетерологичного АИГ, что составляет от 0,015 до 0,145 % от общего количества пациентов, получивших антирабическую помощь в виде комбинации вакцины и иммуноглобулина (Меркулов В.А. и др., 2014; Снегирева И.И. и др., 2015). Учитывая, что производство иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб» развернуто по восстановленной технологии, разработанной в 70-е годы прошлого века, биотехнологическая схема выпуска препарата в настоящее время требует внедрения современных решений, способствующих повышению безопасности данного лекарственного средства.

**Степень разработанности проблемы.** Важнейшей научно-практической задачей, способствующей повышению качества гетерологичного АИГ, является внедрение в производство препарата культуральных технологий. В настоящее время для получения специфической сыворотки от продуцентов используют органо-тканевый рабический антиген на основе фиксированного вируса бешенства из ткани мозга зараженного кролика. Из-за возможного риска развития побочных реакций у пациентов после инъекции антирабического иммуноглобулина, полученного по данной технологии, ВОЗ рекомендует при производстве антирабических препаратов использовать взамен органо-тканевого антигена культуральный антиген на основе *virus fixe*, репродуцированного на клеточном субстрате (WHO Expert Consultation on Rabies, 2005, 2013). Культуральный рабический антиген применяется в производстве гетерологичного АИГ для иммунизации продуцентов в таких странах, как Турция (Ozkan O. et al., 2004), Индия (Goel S.K. et al., 2003), Таиланд (Luekrajan T. et al., 1996). В Российской Федерации более 30 лет назад создана база промышленного производства культуральных антирабических вакцин, для приготовления которых используются различные штаммы фиксированного вируса бешенства, полученные путем адаптации вакцинных штаммов к различным клеточным системам. Вакцинный штамм фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» является уникальным и используется в Российской Федерации только для производства антирабического иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб», что говорит об отсутствии сведений об особенностях его адаптации к культуре клеток и репродукции *in vitro*. При культивировании *virus fixe in vitro* необходимо оценивать не только динамику накопления фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на стадиях культивирования, но и содержание вируса в антигенсодержащем материале в сравнении с органо-тканевым антигеном. Традиционно применяемый метод титрования вируса на белых мышах с определением инфекционной дозы ЛД<sub>50</sub> является трудоемким, длительным (не менее 14 сут) и предполагает использование большого количества лабораторных животных и патогенного биологического агента. В связи с этим актуальны исследования по разработке альтернативных подходов *in vitro*, позволяющих количественно оценить содержание вируса в антигенном материале без использования животных. Одним из таких подходов к количественной оценке вирусов является использование ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-

флуоресцентным учетом результатов (ПЦР-РВ). В биотехнологии производства профилактических иммунобиологических препаратов данный подход успешно используется для количественной оценки протективного антигена у вакцинных штаммов вирусов краснухи, кори, эпидемического паротита (Аммур Ю.И., 2012; Забияка Ю.И., 2010), для оценки содержания антигена Е вируса клещевого энцефалита при культивировании на культуре клеток (Морозова О.В. и др., 2012). В направлении внедрения альтернативных технологий *in vitro* на этапах производства и контроля антирабического иммуноглобулина актуальны исследования, направленные на оптимизацию разработанной ранее в РосНИПЧИ «Микроб» тест-системы с использованием наночастиц коллоидного золота, позволяющей определять в дот-иммуноанализе специфическую активность антирабических препаратов (Шарапова Н.А., 2013). Выделение из вируса бешенства культурального происхождения основного иммуногена – гликопротеида и его использование при конструировании диагностикума и постановке дот-иммуноанализа направлено на выявление в исследуемых образцах антител вируснейтрализующей направленности, что позволит оценить *in vitro* специфическую активность иммунных сывороток и иммуноглобулина.

Одним из актуальных современных направлений совершенствования технологии производства гетерологичного АИГ является переход к использованию на этапах очистки и стерилизации полуфабриката отечественных фильтрационных материалов с сохранением показателей качества целевого продукта, что позволит минимизировать зависимость от импортных фильтрационных материалов и снизить себестоимость препарата. В РосНИПЧИ «Микроб», в том числе с участием автора, ранее разработана уникальная каскадная система очистки и стерилизации раствора иммуноглобулина, уязвимым местом которой является использование импортных фильтров (Никифоров А.К., 2014). Учитывая то, что отечественные производители материалов для микрофильтрации, проводя политику импортозамещения, в последнее время значительно расширили линейку выпускаемых изделий, одновременно ужесточив требования к их качеству на уровне мировых стандартов, актуальна разработка альтернативной схемы фильтрации полуфабриката АИГ с использованием отечественных мембранных и глубинных фильтров.

В настоящее время гетерологичный АИГ выпускается в форме раствора для инъекций, недостатками которой является сравнительно небольшой срок годности (1,5 года), низкая термостабильность и необратимость процессов биodeградации при несоблюдении температурного режима хранения или транспортирования. Разработка стабильной лекарственной формы, обеспечивающей сохранность спецификационных свойств АИГ при транспортировании и хранении является задачей, решение которой способствует улучшению качества комбинированного антирабического лечения. Получение лиофилизированного АИГ позволит полностью удовлетворить потребность организаций Минздрава Российской Федерации в столь востребованном препарате за счет увеличения срока годности.

В совершенствовании комбинированной профилактики бешенства в Российской Федерации за счет улучшения качества гетерологичного АИГ важную роль играет оптимизация методов контроля коммерческих серий препарата, в частности, расширение перечня спецификационных показателей (Мовсесянц А.А. и др., 2015). Кроме того, в настоящее время отсутствует отраслевой стандартный образец (ОСО) специфической активности АИГ. Для контроля специфической активности препарата на предприятии-изготовителе обязательным является наличие Международного стандартного образца иммуноглобулина человеческого против бешенства либо стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности АИГ, аттестованного про-

тив указанного Международного стандарта ВОЗ. В связи с этим актуальными являются исследования по разработке и аттестации СОП специфической активности АИГ.

Таким образом, разработка комплекса научно обоснованных современных биотехнологических решений по оптимизации производства и совершенствованию качества антирабического иммуноглобулина чрезвычайно важна как с научной точки зрения, так и с позиций практического здравоохранения. Решение этой проблемы имеет важное народно-хозяйственное значение и будет способствовать обеспечению населения уникальным отечественным иммунобиологическим лекарственным средством для постэкспозиционной профилактики бешенства и лекарственной независимости Российской Федерации. Проведенные исследования согласуются с целями и задачами Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года, утвержденной Правительством РФ от 24 апреля 2012 г. N 1853п-П8.

В связи с вышеизложенным сформулированы следующие цель и задачи настоящего исследования.

#### **Цель и задачи исследования.**

Цель исследования – разработка комплекса научно обоснованных современных биотехнологических решений для оптимизации технологии промышленного производства и совершенствования качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

Задачи исследования:

1. Разработка технологии масштабного культивирования вакцинных штаммов опасных вирусных инфекций на модели *virus fixe* «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero.
2. Получение экспериментально-производственных серий гетерологичного антирабического иммуноглобулина с использованием культуральных технологий с последующим анализом спецификационных показателей усовершенствованного препарата на соответствие требованиям нормативной документации.
3. Разработка способа количественной оценки содержания вакцинных штаммов опасных вирусов в культуральном материале на модели *virus fixe* «Москва 3253».
4. Выделение и очистка гликопротеида вируса бешенства «Москва 3253» и оптимизация способа определения *in vitro* специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в дот-иммуноанализе с наночастицами коллоидного золота.
5. Разработка модульной системы очистки и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина на основе материалов отечественного производства.
6. Разработка экспериментально-производственной технологии новой формы выпуска противовирусных иммуноглобулиновых лекарственных препаратов – лиофилизата для приготовления раствора для внутримышечного введения на модели коммерческого антирабического иммуноглобулина и его F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов.
7. Совершенствование методов контроля качества противовирусных иммуноглобулиновых лекарственных средств на примере антирабического иммуноглобулина с целью дополнительной стандартизации коммерческих серий препарата.

**Научная новизна.** Научно обоснован комплекс биотехнологических решений для оптимизации производства и улучшения качества отечественного гетерологичного антирабического иммуноглобулина, применяемого для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей.

Разработаны технологические параметры масштабного культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero с использованием суспензионного, псевдосуспензионного и роллерного методов. Разработана оригинальная мето-

дика очистки и концентрирования культурального *virus fixe* тангенциальной ультрафильтрацией.

Экспериментально обосновано применение в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина культурального рабического антигена на основе *virus fixe* «Москва 3253» на этапе иммунизации продуцентов взамен органо-тканевого антигена.

Разработаны оригинальные методические подходы для количественной оценки содержания *virus fixe* «Москва 3253» в вирусном материале с применением полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. Научная новизна подтверждена патентами на изобретения № 2511029 РФ «Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* TG1(pRV<sub>Moscow3253</sub>G-L) для получения набора ПЦР-стандартов и набор ПЦР-стандартов для определения концентрации штамма вируса бешенства «Москва 3253» в рабическом антигене», опубл.10.04.2014, бюл. № 10 и № 2511440 РФ «Способ количественного определения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», опубл. 10.04.2014, бюл. № 10.

Экспериментально обоснованы условия получения очищенного гликопротеида из концентрированного культурального вируса бешенства «Москва 3253» для конструирования высокоспецифичной иммунохимической тест-системы с использованием наночастиц коллоидного золота для оценки активности антирабических сывороток и иммуноглобулина. Приоритетность исследований подтверждена получением патента на изобретение № 2360252 РФ «Диагностикум и тест-система для определения активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* методом дот-иммуноанализа», опубл. 27.06.2009, бюл. № 18.

Разработана оригинальная модульная система очистки и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина баромембранными методами с использованием фильтрационных материалов отечественного производства, внедренная в промышленный выпуск препарата (промышленный регламент ПР № 01898109-47-15).

Научно обоснованы технологические параметры сублимационного высушивания в промышленных условиях антирабического иммуноглобулина и его F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов и получена новая форма выпуска гетерологичного антирабического иммуноглобулина – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения.

Получены сведения о тепловых свойствах раствора антирабического иммуноглобулина и обоснована конечная температура замораживания препарата. Научно обоснован выбор оптимального лиопротектора и доказана стабильность свойств лиофилизированного антирабического иммуноглобулина при длительном хранении.

Получены данные о молекулярных параметрах антирабического иммуноглобулина, что позволит расширить перечень показателей качества препарата, включенных в спецификацию фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на антирабический иммуноглобулин.

**Теоретическая значимость** исследования заключается в научном обосновании целесообразности внедрения в производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина новых культуральных, фильтрационных, сублимационных технологий, направленных на повышение качества и стабильности указанного лекарственного средства. Представленный в работе экспериментально-практический материал является теоретической основой для исследований в направлении совершенствования биотехнологий производства противовирусных иммуноглобулиновых препаратов. Материалы диссертации используются при чтении лекций на курсах профессиональной переподготовки и усовершенствования врачей и биологов по особо опасным инфекциям при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный

аграрный университет им. Н.И. Вавилова».

**Практическая значимость.** Настоящее исследование имеет выраженное прикладное значение и направлено на разработку современных биотехнологических решений по совершенствованию качества и оптимизации существующей технологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина – лекарственного средства, включенного в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения. Внедрение в производство иммунобиологических лекарственных препаратов предложенных решений вносит весомый вклад в развитие здравоохранения и укрепление санитарно-эпидемиологического благополучия Российской Федерации. Решена важная народно-хозяйственная проблема по обеспечению населения отечественным высококачественным иммунобиологическим лекарственным препаратом для пассивной профилактики бешенства, что способствует лекарственной независимости государства.

Разработана оригинальная технология масштабного культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero и обоснованы предложения по ее внедрению в производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина. В производственных условиях по усовершенствованной технологии получены 3 экспериментально-производственные серии антирабического иммуноглобулина, показатели качества которых соответствуют требованиям фармакопейной статьи предприятия Р N002639/01-250210 (акты межлабораторных испытаний образцов антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади, иммунизированной культуральным рабическим антигеном, экспериментально-производственных серий № 01, 02, 03, утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 28.08.2014 г.).

Предложенные инновационные альтернативные технологии *in vitro* для количественного определения вируса бешенства и антител к нему позволяют сократить количество животных для проведения контрольных тестов, что способствует снижению себестоимости препарата. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* TG1(pRV<sub>Moscow3253</sub>G-L), содержащий фрагмент G-L-области генома *virus fixe* «Москва 3253», депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Разработана технология получения лиофилизата антирабического иммуноглобулина, апробированная в экспериментально-производственных условиях, что позволяет рекомендовать ее для промышленного выпуска препарата. Выпуск лиофилизированного иммуноглобулина позволит в два раза увеличить срок годности и повысить стабильность свойств препарата при хранении и транспортировании. По разработанной технологии получены 3 экспериментально-производственные серии лиофилизированного антирабического иммуноглобулина и 3 экспериментальные серии лиофилизированных F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов антирабического иммуноглобулина, показатели качества которых соответствуют требованиям фармакопейной статьи предприятия Р N002639/01-250210 (акты межлабораторных испытаний образцов лиофилизированного иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади экспериментально-производственных серий № 0101, 0102, 0103; акты межлабораторных испытаний образцов лиофилизированных F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади экспериментальных серий № 01, 02, 03, утвержденные директором института 10.06.2014 г.). Разработанные технологические решения с использованием нового современного лиофильного оборудования позволят сократить энергопотребление производства на 55730,4 кВт в год при выпуске препарата объемом 400 л. Экономический эффект от внедрения новой



технологии с использованием современного сублимационного оборудования составит 362247,6 руб. в год за счет снижения энергозатрат.

Исследование молекулярных параметров антирабического иммуноглобулина позволит расширить перечень показателей качества препарата и включить в спецификацию фармакопейной статьи предприятия новый раздел «молекулярные параметры» с целью совершенствования контроля производственных серий иммуноглобулина.

На модели антирабического иммуноглобулина разработана оригинальная модульная система очистки и стерилизации его полуфабриката с использованием фильтров отечественного производства, что позволило свести к минимуму зависимость от импортных фильтрационных материалов и снизить объемы финансовых затрат на приобретение расходных материалов на 216508,25 руб. в год при серийном выпуске препарата объемом 400 л. С применением усовершенствованной технологии выпущены 6 коммерческих серий антирабического иммуноглобулина общим объемом 400 л на сумму более 39 млн руб. На все серии получены сертификаты соответствия, разрешающие выпуск препарата в гражданский оборот (орган по сертификации лекарственных средств ООО «Центр ЭКСПЕРТФАРМ», г. Москва). Препарат реализован в лечебно-профилактические учреждения 68 субъектов Российской Федерации и применяется в настоящее время для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей.

По результатам диссертационного исследования внесены изменения в фармакопейную статью предприятия на антирабический иммуноглобулин Р N002639/01-250210 (ведомость изменений № 4 Р N002639/01-090216 от 09.02.2016 г., утвержденная Министерством здравоохранения Российской Федерации). Проект изменений № 5 в ФСР Р N002639/01-090216 представлен для согласования и утверждения в Департамент государственного регулирования обращения лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации (заявление № 83494 о внесении изменений в документы, содержащиеся в регистрационном досье, от 27.04.2017 г.).

Проведенные научные исследования явились основанием для переработки соответствующих разделов при пересмотре промышленного регламента ПР № 01898109-47-15 на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций (утвержден директором РосНИПЧИ «Микроб» 28.12.2015 г.) и изменений к ПР № 01898109-47-15 (ведомость изменений № 1 к ПР № 01898109-47-15, утверждена директором РосНИПЧИ «Микроб» 12.12.2016 г.).

По материалам проведенных исследований разработаны следующие методические рекомендации:

«Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 1 от 09.04.2009 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 10.04.2009 г.;

«Культивирование фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на перевиваемой клеточной линии Vero», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 5 от 23.09.2010 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 24.09.2010 г.;

«Определение уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках лошадей-продуцентов и человека в непрямом варианте дот-иммуноанализа с применением неферментного диагностикума», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 3 от 05.05.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 06.05.2011 г.;

«Количественное определение фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в вирусодержащем материале методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 10.11.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 10.11.2011 г.;

«Концентрирование инактивированной суспензии культурального фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» методом тангенциальной ультрафильтрации», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 10.11.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 10.11.2011 г.;

«Разработка лиофилизированной формы гетерологичного антирабического иммуноглобулина», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 7 от 22.12.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 23.12.2011 г.;

«Культивирование фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» суспензионным методом на перевиваемой клеточной линии Vero», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 23.12.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 24.12.2011 г.;

«Культивирование фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» псевдосуспензионным методом на перевиваемой клеточной линии Vero», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 23.12.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 24.12.2011 г.;

«Выделение гликопротеида из фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 3 от 31.05.2012 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 01.06.2012 г.;

«Культивирование фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на перевиваемой клеточной линии Vero роллерным способом», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 7 от 27.11.2013 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 27.11.2013 г.;

«Проведение баромембранного процесса депирогенизации раствора антирабического иммуноглобулина», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 30.12.2014 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 30.12.2014 г.;

«Стерилизующая фильтрация раствора антирабического иммуноглобулина», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 08.12.2015 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 09.12.2015 г.;

«Предварительная фильтрация и диализ раствора антирабического иммуноглобулина», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 22.12.2016 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 23.12.2016 г.

**Методология и методы исследования.** Предметом исследования явилась технология производства антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Объектом исследования служили биотехнологические процессы производства антирабического иммуноглобулина: изготовление рабического антигена для иммунизации животных, иммунизация производителей и получение специфической сыворотки; осаждение гамма-глобулина; очистка и стерилизация раствора антирабического иммуноглобулина; получение лекарственного препарата в новой форме выпуска; контроль физико-химических и биологических свойств иммунных сывороток и специфического иммуноглобулина.

Теоретической базой диссертационного исследования явились труды отечественных и зарубежных ученых по вопросам постэкспозиционной профилактики бешенства у людей, современной методологии производства антирабических профилактических препаратов в соответствии с рекомендациями ВОЗ, оценки активности вируса бешенства и антител к нему альтернативными методами *in vitro*, технологии лиофильного высушивания лекарственных средств иммуноглобулиновой природы, оценки качества иммунобиологических лекарственных средств, а также материалы нормативной документации по теме, раскрываемой в данной работе.

При выполнении работы применяли биотехнологические, вирусологические, микробиологические, биологические, иммунохимические, молекулярно-генетические, биохимические, физико-химические, биофизические и статистические методы исследования.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Экспериментально обоснованная технология культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero суспензионным, псевдосуспензионным и роллерным методами позволяет получать культуральный рабический антиген для иммунизации животных-продуцентов, не уступающий по антигенным свойствам вирусному материалу органо-тканевого происхождения.

2. Разработанные методические подходы с использованием полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов позволяют количественно оценивать содержание *virus fixe* «Москва 3253» в вируссодержащем материале.

3. Антирабический иммуноглобулин, полученный с использованием культуральных технологий, по спецификационным показателям соответствует требованиям нормативной документации на иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций.

4. Использование гликопротеида, выделенного из очищенного и концентрированного культурального вируса бешенства, в качестве реагента при конструировании диагностикума с наночастицами коллоидного золота позволяет выявлять титр специфических антител в антирабических препаратах *in vitro* в дот-иммуноанализе.

5. Применение в производстве модульной системы очистки и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина на основе отечественных фильтрационных материалов обеспечивает выпуск стандартных и качественных серий антирабического иммуноглобулина в соответствии с требованиями нормативной документации при снижении себестоимости.

6. Экспериментально обоснованная технология позволяет получать в производственных условиях гетерологичный антирабический иммуноглобулин и его F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты в новой форме – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения, сохраняющей спецификационные свойства в течение 3 лет и имеющей преимущество по показателю «молекулярные параметры» при длительном хранении.

**Степень достоверности** работы основана на значительном объеме экспериментальных исследований и полученных результатов, их статистической обработке и соответствии теоретическим данным. Исследования проведены на аттестованном оборудовании, все используемые контрольно-измерительные приборы прошли метрологическую поверку. Выводы диссертации теоретически и экспериментально обоснованы и соответствуют цели и задачам исследования.

**Апробация результатов.** Материалы диссертации представлены на: VIII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болез-

ниями в государствах-участниках Содружества Независимых Государств» (Саратов, 2007); II Всероссийской научно-практической конференции «Окружающая среда и здоровье человека» (Рязань, 2007); IX Межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в реализации глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями на территории государств-участников содружества независимых государств» (Волгоград, 2008); Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» (Москва, 2008); юбилейной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Ростовского научно-исследовательского института микробиологии и паразитологии «Актуальные вопросы инфекционной патологии» (Ростов-на-Дону, 2009); V Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009); Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» (Москва, 2010); III Международном форуме по нанотехнологиям (Москва, 2010); научно-практических конференциях молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболенск, 2010; 2011); X съезде Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации» (Москва, 2012); Всероссийской научно-практической конференции Роспотребнадзора «Научное обеспечение противозидемической защиты населения» (Нижний Новгород, 2012); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения» (Пермь, 2012); VI Региональной научно-практической конференции «Перспективы использования в медицинской практике новых иммунобиологических препаратов, полученных на основе клеточных культур» (Екатеринбург, 2012); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2012); научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты инфекционной патологии» (Иркутск, 2012); международных интернет-конференциях «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, 2012, 2014); международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы» (Саратов, 2013, 2014); 19-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2015); Всероссийской научно-практической конференции «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями» (Нижний Новгород, 2016); ежегодных итоговых научно-практических конференциях РосНИПЧИ «Микроб» (2006, 2007, 2009–2016). Разработка «Набор для определения активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в до-иммуноанализе» награждена дипломом и серебряной медалью решением международного жюри конкурса XII Международного салона промышленной собственности «Архимед-2009».

**Личный вклад автора** заключается в персональном участии при определении направлений, планировании и выполнении исследований по освоению технологии масштабного культивирования вируса бешенства на перевиваемой линии клеток Vero и разработке соответствующей производственно-технологической документации; по конструированию и совершенствованию тест-системы для определения антирабических антител *in vitro* с использованием наночастиц коллоидного золота; по освоению технологии выпуска антирабического иммуноглобулина в но-

вой форме – лиофилизата для приготовления раствора для внутримышечного введения и исследованию его свойств; по изучению эффективности и внедрению в производство антирабического иммуноглобулина фильтрационных материалов отечественного производства. Часть исследований выполнена в соавторстве с сотрудниками ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» к.б.н. С.В. Генераловым, к.б.н. Ж.В. Матвеевой, к.б.н. Н.А. Осинной, к.м.н. И.В. Тучковым, к.б.н. Н.А. Шарাপовой, к.м.н. М.Н. Киреевым, д.б.н. А.В. Комиссаровым, к.б.н. О.А. Лобовиковой, к.м.н. И.В. Шульгиной, к.б.н. О.А. Волох, а также сотрудниками Института химии растворов Российской академии наук (г. Иваново).

**Связь работы с научными программами.** Исследования выполнены в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» в период с 2006 по 2016 гг. в рамках отраслевых НИР: 26-2-05 «Разработка и внедрение в производство новых медицинских иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики возбудителей опасных инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы» (номер госрегистрации 0120.0504663); 40-2-09 «Оптимизация технологических этапов производства МИБП и разработка новых препаратов для диагностики ООИ» (номер госрегистрации 0120.0853923); 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов» (номер госрегистрации 01201457722) и Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

**Публикации научных трудов.** По теме диссертационной работы опубликовано 46 работ, в том числе 18 статей в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук». Получены 3 патента на изобретения.

**Структура и объем диссертации.** Текст диссертации включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, 7 глав собственных исследований, заключение, выводы и список литературы, состоящий из 565 источников, 297 из которых зарубежные. Диссертация изложена на 289 страницах машинописного текста и иллюстрирована 39 таблицами, 57 рисунками.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Обзор литературы (глава 1, 2)**

В обзоре литературы представлен анализ публикаций отечественных и зарубежных исследователей по вопросам получения и повышения качества антирабических профилактических препаратов. Рассмотрены актуальные тенденции развития биотехнологий производства противовирусных иммунобиологических лекарственных средств, среди которых – внедрение культуральных технологий, применение современных методов очистки, концентрирования и фильтрации полуфабрикатов; разработка методических подходов *in vitro* к количественному определению вирусов и антител к ним; разработка технологий получения лиофилизированных лекарственных форм препаратов иммуноглобулиновой природы.

### **Материалы и методы исследования (глава 3)**

Для получения рабического антигена использовали *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253». Для определения специфической активности антирабических сывороток, иммуноглобулина и F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов использовали контрольный штамм фиксированного вируса бешенства CVS. Штаммы *virus fixe* получены из коллекции ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздрава

России, г. Москва. Для получения культурального рабического антигена репродукцию *virus fixe* «Москва 3253» осуществляли на клетках перевиваемой линии Vero (B) (ООО «Биолот», г. Санкт-Петербург). Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* KM 229 получали методом кальциевой трансформации из штамма *E. coli* TG1 и использовали для разработки количественных ПЦР-стандартов.

Для разработки технологии лиофильного высушивания использовали антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций и F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты антирабического иммуноглобулина (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»).

Лошади рысистой породы (*Equus ferus caballus*) массой не менее 400 кг и кролики (*Oryctolagus cuniculus*) породы «Шиншилла» массой 2,5–3,0 кг были использованы для получения иммунных сывороток; белые мыши (*Mus musculus*) линии BALB/c массой 10–12 г, прошедшие контроль генетической стандартности лабораторных животных инбредных линий – для постановки биологической реакции нейтрализации (РН) вируса бешенства при определении активности антирабических препаратов; белые мыши (*Mus musculus*) линии BALB/c массой 18–20 г – для характеристики антигенной активности гликопротеида вируса бешенства; кролики (*Oryctolagus cuniculus*) породы «Шиншилла» массой 1,5–2,5 кг – для постановки теста на пирогенность АИГ; морские свинки (*Cavia porcellus*) беспородные массой 250–350 г и белые мыши (*Mus musculus*) беспородные массой 18–20 г – для проведения испытаний на токсичность АИГ.

При выполнении работы были использованы следующие основные методы: биотехнологические – масштабное культивирование *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на перевиваемых клетках Vero суспензионным, псевдосуспензионным и роллерным способами; выделение антирабического гамма-глобулина из иммунной сыворотки продуцентов риванол-спиртовым методом; вирусологические – определение титра вируса бешенства с вычислением ЛД<sub>50</sub>/мл на белых мышках; определение специфической активности АИГ и его F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов в РН вируса бешенства; микробиологические – определение стерильности АИГ методом прямого посева на тиогликолевую среду; культивирование рекомбинантного штамма *E. coli* TG1 на агаре LB с добавлением ампициллина; биологические – испытания АИГ на токсичность и пирогенность на животных; иммунохимические – определение активности антирабических препаратов в дот-иммуноанализе с неферментным диагностикумом с наночастицами коллоидного золота; оценка свойств культурального вируса бешенства и выделенного гликопротеида в иммуноферментном анализе; определение видоспецифичности иммуноглобулина в реакции диффузной преципитации; молекулярно-генетические – оценка содержания *virus fixe* в вирусном материале органо-тканевого и культурального происхождения в ПЦР-РВ; получение рекомбинантного штамма *E. coli* TG1 при разработке ПЦР-стандартов; биохимические, физико-химические и биофизические – выделение гликопротеида вируса бешенства с последующей хроматографической очисткой; метод электрофореза в 12 % полиамакридном геле для определения молекулярной массы гликопротеида вируса бешенства; метод нековалентной (адсорбционной) конъюгации при конструировании неферментного диагностикума с наночастицами коллоидного золота и G-белком вируса бешенства; метод лиофильного высушивания антирабического иммуноглобулина и его F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов; метод электропроводности для определения эвтектической температуры раствора антирабического иммуноглобулина; метод дифференциально-сканирующей калориметрии для определения тепловых параметров иммуноглобулина; метод колоночной гель-фильтрации для определения содержания фрагментов и агрегатов в антирабическом иммуноглобулине; спектрофотометрический метод для определения прозрачно-

сти и цветности антирабического иммуноглобулина; метод электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы для определения однородности иммуноглобулина; метод газовой хроматографии для определения остаточного этилового спирта; метод с биуретовым реактивом для определения содержания белка; определение остаточного риванола, потери в массе при высушивании, времени растворения лиофилизатов иммуноглобулина, концентрации водородных ионов (рН); статистические – обработка результатов исследований с применением стандартных методик (Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962) с вычислением средней арифметической ( $M$ ), средней ошибки средней арифметической ( $m$ ) при использовании программ Statistica 6 (Statsoft Inc.), Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В главе 4 представлено экспериментальное обоснование оптимальных технологических параметров масштабного культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на перевиваемых клетках линии Vero суспензионным, псевдосуспензионным и роллерным методами. Поскольку возбудитель бешенства, являясь облигатным нейротропным вирусом, практически не накапливается при его первичном внесении в культуру клеток внутренних органов, для размножения в клетках экстраневрального происхождения была необходима его предварительная адаптация к данной клеточной линии. При адаптации органо-тканевого вируса была исследована эффективность способов заражения клеток путем инокуляции вируса в монослой и в суспензию. В ходе опыта выявлено, что при первых 20 пассажах вирус практически не накапливался, до 30 пассажа титр инфекционности вируса составлял менее  $2 \lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$  и только к 37 пассажу повысился до уровня  $(3,57 \pm 0,21) \lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$ , что позволило говорить об активации процесса адаптации вируса к клеткам Vero. С целью повышения инфекционной активности *virus fixe* после 37-го пассажа *virus fixe* пассировали на различных субстратах, чередуя мозг кролика и клетки Vero. После 10 перемежающихся пассажей титр вируса увеличился до значения  $(4,34 \pm 0,32) \lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$ . После шести дополнительных пассажей вируса *in vivo* и *in vitro* и дальнейших прямых пассажей на клетках к 62-му пассажу *virus fixe* «Москва 3253» стабильно накапливался в монослое и вызывал его деструкцию на 80 %, при этом уровень активности составлял более  $4 \lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$ . Инфекционную активность *virus fixe* «Москва 3253» подтверждали выявлением цитопатического действия вируса на клеточный монослой, оцениваемого визуально при фазово-контрастной микроскопии. (Рисунок 1).

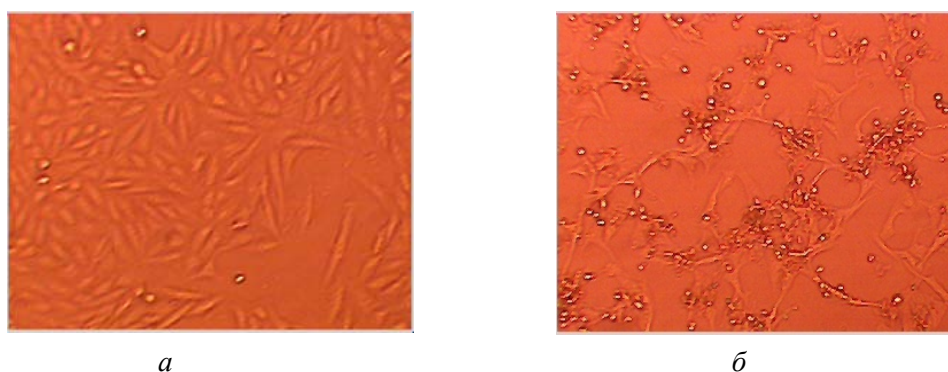


Рисунок 1 – Фазово-контрастная микроскопия интактного (а) и инфицированного вирусом бешенства «Москва 3253» (б) монослоя клеточной культуры Vero (увеличение  $1 \times 200$ ), 96 ч культивирования

О наличии инфицированных вирусом клеток Vero свидетельствовали результаты люминесцентной микроскопии. При окрашивании монослоя специфической люминесцирующей сывороткой наблюдали фокусы флуоресценции – группы клеток, в которых имела место репродукция вируса бешенства (Рисунок 2).

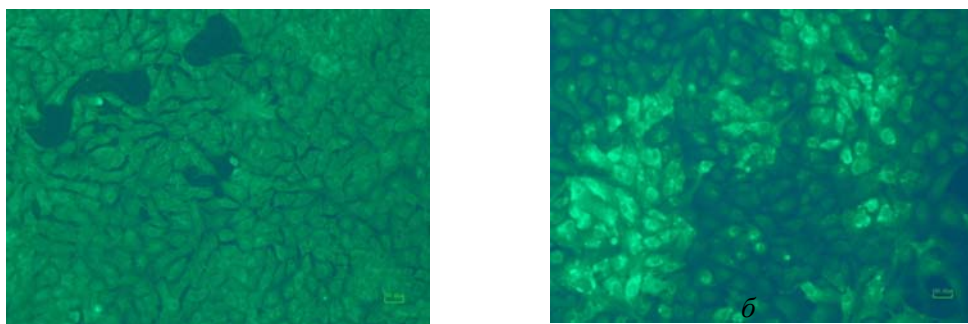


Рисунок 2 – Люминесцентная микроскопия интактного (а) и инфицированного вирусом бешенства «Москва 3253» (б) монослоя клеточной культуры Vero после 48 ч культивирования (увеличение  $1\times 200$ ; окрашивание специфической сывороткой, меченой ФИТЦ)

В результате эксперимента была выявлена оптимальная заражающая доза вируса, которая составила  $0,1$  ЛД<sub>50</sub>/кл, титр инфекционности вируса имел значения  $(4,34\pm 0,32)$  lg ЛД<sub>50</sub>/мл при инокуляции вируса в клеточную суспензию и  $(4,14\pm 0,09)$  lg ЛД<sub>50</sub>/мл при инокуляции вируса в клеточный монослой. С целью усовершенствования процесса культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на перевиваемых клетках Vero, подразумевающего получение больших объемов культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов, дальнейшие наши исследования были направлены на отработку оптимальных параметров масштабного выращивания клеток и вируса суспензионным и псевдосуспензионным методами с применением биореактора BioG-M Plus. Исследования показали, что при использовании в качестве ростовой добавки 10 % фетальной сыворотки КРС выход клеток при посевной концентрации  $0,5\times 10^5$  кл/мл после 60 ч культивирования суспензионным методом составил  $2,0\times 10^5$  кл/мл (Рисунок 3). Добавление в ростовую среду 10 % нормальной сыворотки КРС при тех же параметрах выращивания позволило получить урожай клеток  $1,7\times 10^5$  кл/мл, что вполне приемлемо для дальнейшего накопления вируса в суспензии.

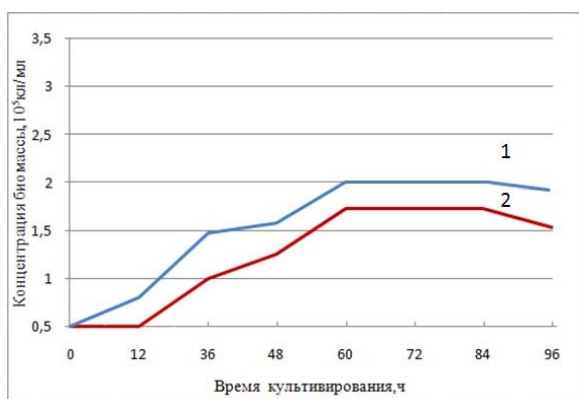


Рисунок 3 – Динамика накопления клеток Vero в суспензии при использовании различных ростовых добавок

1 – культивирование на среде Игла MEM с добавлением фетальной сыворотки КРС (10 %);  
2 – культивирование на среде Игла MEM с добавлением нормальной сыворотки КРС (10 %).

В ходе экспериментов выявили оптимальную скорость вращения мешалки биореактора, которая составила 80–100 об/мин. После накопления клеток производили заражение клеток вирусом в заражающей дозе от 0,05 до 0,2 ЛД<sub>50</sub>/кл. Культивирование вируса осуществляли в тече-



ние 96 ч при температуре  $(33\pm 1)^\circ\text{C}$ , скорости перемешивания 100 об/мин, pH  $(7,2\pm 0,2)$ . Как свидетельствовали результаты эксперимента, заражающая доза 0,1 ЛД<sub>50</sub>/кл явилась оптимальной (Таблица 1).

Таблица 1 – Титр инфекционности *virus fixe* в зависимости от множественности заражения и стимулирующих добавок к поддерживающей среде при культивировании зараженных клеток суспензионным способом (n=3)

Множественность заражения, ЛД <sub>50</sub> /кл	Инфекционный титр <i>virus fixe</i> , lg ЛД <sub>50</sub> /мл			
	ЧСА, 0,1 %	сыворотка КРС, 5 %	сыворотка КРС, 2 %	сыворотка КРС, 1 %
0,05	4,12±0,37	4,34±0,09	4,23±0,34	3,65±0,13
0,1	4,41±0,28	4,38±0,33	4,27±0,26	3,83±0,32
0,2	4,25±0,23	4,22±0,25	4,21±0,31	3,82±0,27

Параметры культивирования клеток Vero в биореакторе на микроносителях Cytodex-3 псевдосуспензионным способом были аналогичны таковым при суспензионном культивировании: температура –  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ ; pH –  $(7,2\pm 0,2)$ ; подача CO<sub>2</sub> – периодическая. Концентрация микроносителей составляла  $(2,5\pm 0,5)$  г/л. Как и при суспензионном способе культивирования, оптимальное время культивирования клеток на микроносителях составило 60 ч. При культивировании клеток Vero в среде Игла MEM с 10 % содержанием фетальной сыворотки КРС зарегистрирован уровень накопления клеток, соответствующий  $2,8\times 10^5$  кл/мл; в среде с 10 % содержанием нормальной сыворотки КРС аналогичный показатель составил  $2,5\times 10^5$  кл/мл (Рисунок 4).

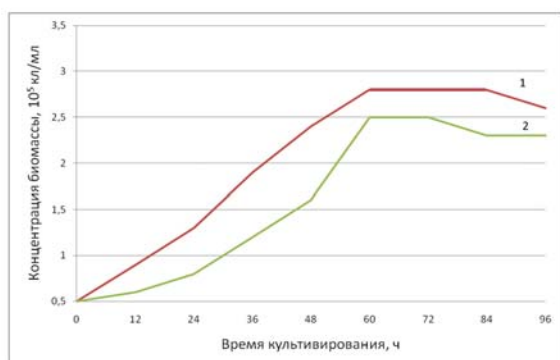


Рисунок 4 – Динамика накопления клеток Vero при выращивании в биореакторе псевдосуспензионным способом на микроносителях

1 – использование ростовой среды с фетальной сывороткой КРС (10 %);  
2 – использование ростовой среды с нормальной сывороткой КРС (10 %).

В Таблице 2 приведены результаты эксперимента по определению титра вируса, культивированного псевдосуспензионным способом при различных дозах заражения клеток и составе поддерживающей среды. Выявлено, что при псевдосуспензионном культивировании вируса оптимальная доза заражения клеток составила 0,1 ЛД<sub>50</sub>/кл (Таблица 2).

Результаты опыта позволили говорить о возможности замены дорогостоящего человеческого сывороточного альбумина на стимулирующую добавку с меньшей стоимостью – нормальную сыворотку КРС, что экономически оправдано при масштабном получении культурального *virus fixe* для приготовления рабического антигена.

Таблица 2 – Титр инфекционности *virus fixe* «Москва 3253» в зависимости от множественности заражения и стимулирующих добавок к поддерживающей среде при культивировании зараженных клеток псевдосуспензионным способом (n=3)

Множественность заражения, ЛД <sub>50</sub> /кл	Инфекционный титр <i>virus fixe</i> , lg ЛД <sub>50</sub> /мл			
	ЧСА, 0,1 %	сыворотка КРС, 5 %	сыворотка КРС, 2 %	сыворотка КРС, 1 %
0,05	4,32±0,36	3,82±0,32	4,42±0,08	4,45±0,35
0,1	4,62±0,28	4,19±0,27	4,68±0,13	4,51±0,17
0,2	4,54±0,31	4,17±0,34	4,51±0,33	4,40±0,34

На дальнейшем этапе исследований отработывали условия роллерного культивирования *virus fixe* на клетках Vero, широко применяемого в промышленной биотехнологии для масштабного выращивания вирусов *in vitro*. В эксперименте осуществляли подбор оптимальной частоты вращения роллерных сосудов, а также величины соотношения поверхности монослоя к объему питательной среды. Показано, что наименее эффективной являлась высокая скорость вращения бутылей, оказавшая негативное влияние на рост популяции клеток (Рисунок 5).

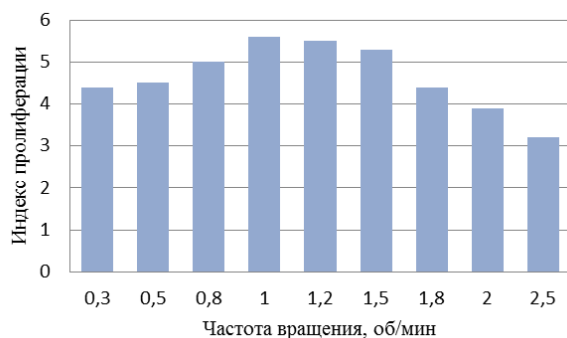


Рисунок 5 – Зависимость пролиферативной активности клеток линии Vero от скорости вращения роллерных бутылей

При культивировании клеток с частотой вращения роллерных сосудов свыше 2,0 об/мин зарегистрирован самый низкий индекс пролиферации – 3,2, что можно объяснить замедленным прикреплением клеток к стенкам бутыли. При частоте вращения 0,3 и 0,5 об/мин на вторые либо третьи сутки культивирования наблюдали гибель клеток. Установлено, что частота вращения бутылей 0,3–0,5 об/мин целесообразна в первые сутки культивирования для лучшего прикрепления клеток к внутренней поверхности сосуда, далее для создания клеткам оптимальных условий газообмена и питания частоту вращения необходимо установить на уровне 1,0–1,2 об/мин.

При определении оптимального соотношения поверхности монослоя к объему питательной среды выявлено, что для культивирования клеток Vero в роллерных сосудах с площадью ростовой поверхности 850 см<sup>2</sup> достаточно от 150 до 200 мл питательной среды; с площадью 1700 см<sup>2</sup> – 400 мл ростовой среды. Для выявления оптимального периода культивирования клеток роллерным способом была проведена серия экспериментов с продолжительностью выращивания до 7 сут, отличающихся начальной посевной концентрацией клеток – от 0,2×10<sup>5</sup> до 1,0×10<sup>5</sup> кл/мл. Результаты свидетельствуют, что культивирование клеток на роллерных бутылях с площадью поверхности 850 см<sup>2</sup> целесообразно проводить в течение 72 ч при начальной по-

севной концентрации  $0,5 \times 10^5$  кл/мл. В случае использования роллерных сосудов с площадью ростовой поверхности  $1700 \text{ см}^2$  наибольший прирост клеток наблюдался после 96 ч культивирования при начальной посевной концентрации  $0,5 \times 10^5$  и  $1,0 \times 10^5$  кл/мл (Рисунок 6).

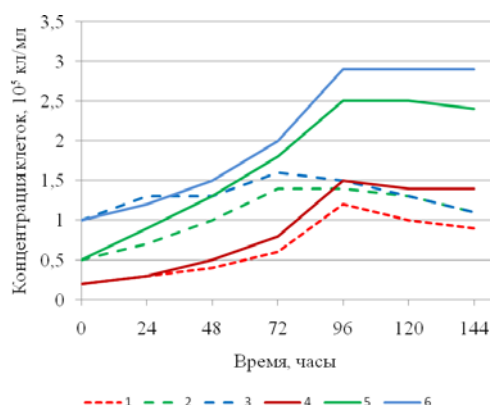


Рисунок 6 – Динамика роста клеток Vero при культивировании роллерным способом в зависимости от начальной концентрации клеток и площади ростовой поверхности роллерных бутылей

- 1 –  $0,2 \times 10^5$  кл/мл,  $850 \text{ см}^2$ ;
- 2 –  $0,5 \times 10^5$  кл/мл,  $850 \text{ см}^2$ ;
- 3 –  $1,0 \times 10^5$  кл/мл,  $850 \text{ см}^2$ ;
- 4 –  $0,2 \times 10^5$  кл/мл,  $1700 \text{ см}^2$ ;
- 5 –  $0,5 \times 10^5$  кл/мл,  $1700 \text{ см}^2$ ;
- 6 –  $1,0 \times 10^5$  кл/мл,  $1700 \text{ см}^2$ .

Далее при отработке условий накопления вируса изучали влияние способа заражения клеток *virus fixe* «Москва 3253» и значения температуры культивирования на инфекционную активность вируса. Применяли два способа заражения – в суспензию клеток и непосредственно в монослой на внутренней поверхности роллерной бутылки. Множественность заражения соответствовала  $0,1 \text{ ЛД}_{50}/\text{кл}$ . При заражении клеток в суспензию и значении температуры культивирования, равной  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ , зарегистрирован наибольший уровень накопления *virus fixe* – титр в ИФА составил  $1:256$ – $1:512$ , инфекционная активность вируса, выявленная *in vivo*, соответствовала  $(4,6 \pm 0,3) \text{ lg ЛД}_{50}/\text{мл}$  (Таблица 3).

Таблица 3 – Уровень накопления *virus fixe* «Москва 3253» при культивировании роллерным способом в зависимости от способа заражения и температуры ( $n=3$ )

Способ заражения клеток	Значение температуры культивирования, $^\circ\text{C}$	Титр инфекционной активности <i>in vivo</i> , $\text{lg ЛД}_{50}/\text{мл}$	Титр вируса в ИФА
В монослой	32	$3,1 \pm 0,5$	$1:64$ – $1:128$
	37	$2,9 \pm 0,3$	$1:64$
В суспензию	32	$4,6 \pm 0,3$	$1:256$ – $1:512$
	37	$4,1 \pm 0,3$	$1:256$

Далее изучали накопление инфекционной активности вируса в зависимости от множественности заражения и времени культивирования. Эксперимент показал, что заражение клеток в дозе  $0,01 \text{ ЛД}_{50}/\text{кл}$  приводило к увеличению времени накопления вируса бешенства на 1–2 сут по сравнению с культивированием при заражающих дозах от  $0,1$  до  $1,0 \text{ ЛД}_{50}/\text{кл}$ . Заражающая доза  $0,01 \text{ ЛД}_{50}/\text{кл}$  обусловила увеличение времени накопления вируса бешенства на 1–2 сут по сравнению с культивированием при множественности заражения  $0,1$  и  $1,0 \text{ ЛД}_{50}/\text{кл}$ , при которых оптимальный период культивирования *virus fixe* «Москва 3253» составил 5 сут. Дальнейшее культивирование не способствовало повышению выхода вируса (Таблица 4).

Таблица 4 – Уровень накопления *virus fixe* «Москва 3253» при роллерном выращивании в зависимости от множественности заражения и времени культивирования (n=3)

Множественность заражения, ЛД <sub>50</sub> /кл	Титр <i>virus fixe</i> в ИФА в зависимости от периода культивирования, сут.				
	3	4	5	6	7
0,01	1:32	1:32–1:64	1:64	1:128	1:256
0,1	1:64	1:128	1:256	1:128–1:256	1:128–1:256
1,0	1:64	1:128	1:256–1:512	1:256	1:256

Таким образом, культивирование *virus fixe* «Москва 3253» на клетках Vero роллерным способом целесообразно проводить на поддерживающей среде с 0,1 % содержанием ЧСА или 5 % содержанием нормальной сыворотки КРС в течение 5 сут при температуре 32 °С. Вирусный урожай, полученный при культивировании, являлся основой для изготовления культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов в производстве гетерологичного АИГ.

Далее для повышения иммуногенности вируса бешенства, репродуцированного *in vitro*, отработывали условия концентрирования вирусного урожая тангенциальной (кросс-флоу) ультрафильтрацией с использованием установки Vivaflow 200, снаряженной полипропиленовыми мембранами с различным значением номинальной отсечки по молекулярной массе (НОММ). Указанный прием находит все большее применение в биофармацевтической промышленности в технологиях концентрирования антигенов за счет своей производительности и экономичности. В ходе проведения опытов по концентрированию и очистке инактивированного вирусного материала перед нами стояла задача отработки гидродинамического режима фильтрации и выбора оптимального значения НОММ для используемых мембран. Для подбора оптимальной мембраны ультрафильтрацию в режиме кросс-флоу проводили с использованием мембран с НОММ 10, 30, 100, 300 и 1000 кДа при значении давления 0,21 МПа. По окончании процесса исследовали удельную скорость фильтрации и свойства концентрируемого продукта: концентрацию вируса бешенства в фильтрате и концентрате, содержание белка, прозрачность. Как показали результаты опыта, использование мембран с НОММ 10, 30, 100, 300 кДа позволяет концентрировать исходный продукт, о чем свидетельствуют значения вышеназванных показателей, однако оптимальным является применение мембраны с НОММ 300 кДа. В этом случае в ПЦР-РВ регистрировали концентрацию вируса  $7,14 \times 10^7$  ГЭ/мл (до концентрирования –  $9,69 \times 10^6$  ГЭ/мл) в сочетании с наибольшей средней удельной скоростью фильтрации –  $72,4 \text{ дм}^3/\text{м}^2/\text{ч}$ . Применение мембраны с НОММ 1000 кДа неэффективно, концентрирование в этом случае не происходит и, как свидетельствовали результаты ПЦР-РВ, вирус бешенства в целевом продукте отсутствовал. Далее с использованием мембраны с НОММ 300 кДа было установлено оптимальное давление при концентрировании культуральной жидкости «кросс-флоу». Показано, что данный баромембранный процесс целесообразно проводить при величине давления, равной  $(0,25 \pm 0,01)$  МПа, при этом условии процесс протекал достаточно эффективно – средняя удельная скорость фильтрации составила  $(78,2 \pm 0,2) \text{ дм}^3/\text{м}^2/\text{ч}$ . Помимо ПЦР-РВ, для оценки содержания вируса бешенства в инактивированной суспензии применяли ИФА, по результатам которого содержание антигена вируса бешенства в концентрированной суспензии и органотканевом антигене соответствовало титрам 1:512–1:1000, что позволяет говорить об эффектив-

ности способа тангенциальной фильтрации для концентрирования культуральной вирусной суспензии.

В связи с тем, что при работе с культурой клеток всегда присутствует риск спонтанного заражения клеток микоплазмами, при производстве АИГ с применением клеточных технологий необходимым и регулярным разделом работ должен быть мониторинг клеточной линии, питательных сред и ростовых добавок и индикация в них микоплазм, а также соблюдение комплекса правил по предупреждению контаминации микоплазмами указанных объектов. В главе представлены результаты ПЦР-контроля культуры клеток линии Vero, ростовых сред и добавок, а также вирусосодержащей культуральной жидкости на наличие микоплазменной контаминации. Выявлено, что используемые в работе питательные среды и стимулирующие добавки свободны от микоплазм. В ходе исследований были обнаружены несколько образцов зараженных микоплазмами клеток Vero, которые были немедленно уничтожены. В образцах вирусного урожая микоплазмы не выявлены. На основании полученных результатов и практического опыта разработана система мероприятий по предупреждению микоплазменной контаминации используемой в работе клеточной линии, эффективность которой подтверждена при дальнейшей практической деятельности.

Таким образом, результатом исследований на данном этапе явилась разработка технологии масштабного культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero суспензионным, псевдосуспензионным и роллерным методами с последующим концентрированием фильтрацией кросс-флоу, позволяющая получать культуральный рабический антиген для иммунизации продуцентов с уровнем содержания вируса, сопоставимым с таковым в органо-тканевом вирусном материале.

**Глава 5** посвящена разработке количественного молекулярно-генетического способа определения *in vitro* фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» с использованием ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. Исследования проводили в несколько этапов, а именно: подбор ДНК-мишени, праймеров и зонда; получение рекомбинантного штамма *E. coli* TG1; разработку ПЦР-стандартов; проведение исследований по определению содержания *virus fixe* в инактивированном органо-тканевом и культуральном антигенном материале в ПЦР-РВ с использованием разработанных ПЦР-стандартов. Данные биоинформационного анализа и результаты изучения нуклеотидной последовательности генома *virus fixe* «Москва 3253» позволили сделать вывод о перспективности использования фрагмента G-L области вирусного генома в качестве ДНК-мишени при подборе олигонуклеотидных праймеров и зондов для специфической детекции *virus fixe* «Москва 3253» с помощью ПЦР-РВ. Используя программу Primer Premier-V5 (Premier Bio Soft International), интернет-сайт [www.genscript.com](http://www.genscript.com) и алгоритм BLAST, были подобраны олигонуклеотидные праймеры RV5 – 5'-GTTGGGCACTGAACTGCTA-3' и RV6 – 5'-GAATCTCCGGGTCAAGAGT-3' для амплификации фрагмента G-L локуса генома *virus fixe* «Москва 3253» (с 436 по 585 нуклеотид последовательности G-L локуса) и зонд формата TaqMan RV7 – 5'-ROX-AATCCTCCTTGAACCTCCATGCGACAGA-BHQ2 с флуоресцентными метками ROX и BHQ2 (с 542 по 565 нуклеотид) для проведения ПЦР-РВ. Чтобы повысить эффективность гидролиза зонда за счет увеличения 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы, к 5'-концу зонда RV7 были добавлены нуклеотиды ААТ, некомплементарные консенсусной последовательности G-L локуса генома *virus fixe* «Москва 3253».

Задача следующего этапа исследований заключалась в конструировании рекомбинантного штамма *E. coli* TG1 и создании на его основе набора ПЦР-стандартов для проведения количе-

ственной ПЦР-РВ. В качестве вектора использовали плазмиду pGem-T («Promega», США), мишенью для клонирования являлся изученный ранее фрагмент G–L области *virus fixe* «Москва 3253» размером 881 п.н., фланкированный праймерами BeshG и BeshL. В результате экспериментов был получен рекомбинантный штамм *E. coli* TG 1, несущий плазмиду pRV<sub>Moscow3253</sub>G-L, содержащую в своем составе фрагмент G-L области генома *virus fixe* «Москва 3253». При разработке ПЦР-стандартов для проведения ПЦР-РВ для определения количества *virus fixe* в вирусодержащем материале исходным продуктом являлась рекомбинантная плазида pRV<sub>Moscow3253</sub>G-L. На основании проведенных исследований получены ПЦР-стандарты: RV1 – разведение  $10^{-4}$  плазмидной ДНК, что соответствует  $n \times 10^8$  ГЭ/мл, RV2 – разведение  $10^{-5}$  плазмидной ДНК ( $n \times 10^7$  ГЭ/мл), RV3 – разведение  $10^{-7}$  плазмидной ДНК ( $n \times 10^5$  ГЭ/мл), RV4 – разведение  $10^{-9}$  плазмидной ДНК ( $n \times 10^3$  ГЭ/мл). В ходе экспериментов выявлено, что ПЦР-стандарты RV1, RV2, RV3 оптимально использовать при определении концентрации *virus fixe* «Москва 3253» в мозговом вирусном материале, а RV2, RV3, RV4 – при изучении культурального вируса. Указанные ПЦР-стандарты были апробированы при исследовании вирусодержащего материала органо-тканевого и культурального происхождения (Таблицы 5, 6).

Таблица 5 – Концентрация *virus fixe* «Москва 3253» в пробах мозговой суспензии

Наименование	Тип	СТ	Концентрация стандарта (ГЭ/мл)	Концентрация расчетная (ГЭ/мл)	Коэффициент вариации, %
RV3	стандарт	22,58	$3,44 \times 10^5$	$3,57 \times 10^5$	9,4
RV2	стандарт	16,51	$2,37 \times 10^7$	$2,67 \times 10^7$	8,6
RV1	стандарт	12,18	$1,94 \times 10^8$	$1,45 \times 10^8$	7,4
Проба 1	образец	12,05		$1,70 \times 10^8$	
Проба 2	образец	8,11		$3,07 \times 10^9$	
Проба 3	образец	14,57		$5,57 \times 10^7$	
Проба 4	образец	12,49		$1,00 \times 10^8$	
Проба 5	образец	9,35		$1,42 \times 10^9$	
ОКВ	образец	0		0	
К-	отрицательный контроль	0		0	

Таблица 6 – Концентрация *virus fixe* «Москва 3253» в пробах культуральной суспензии до концентрирования

Наименование	Тип	СТ	Концентрация стандарта (ГЭ/мл)	Концентрация расчетная (ГЭ/мл)	Коэффициент вариации, %
RV 2	стандарт	15,72	$2,37 \times 10^7$	$2,55 \times 10^7$	7,7
RV 3	стандарт	24,83	$3,44 \times 10^5$	$3,36 \times 10^5$	2,4
RV 4	стандарт	26,10	$3,00 \times 10^3$	$3,32 \times 10^3$	8,4
проба 1	образец	18,67		$6,28 \times 10^5$	
проба 2	образец	24,86		$3,31 \times 10^4$	
проба 3	образец	21,43		$1,69 \times 10^5$	
проба 4	образец	23,29		$6,96 \times 10^4$	
проба 5	образец	16,72		$1,59 \times 10^6$	
проба 6	образец	20,21		$3,02 \times 10^5$	
ОКВ	образец	0		0	
К-	отрицательный контроль	0		0	

В ходе исследования выявлено, что концентрация вируса в пробах мозговой ткани зараженных кроликов составила от  $5,57 \times 10^7$  до  $3,07 \times 10^9$  ГЭ/мл. Концентрация вируса бешенства «Москва 3253» в вирусосодержащей культуральной жидкости до концентрирования зарегистрирована в значениях от  $3,31 \times 10^4$  до  $1,59 \times 10^6$  ГЭ/мл. Кроме этого, с применением разработанных стандартов в ПЦР-РВ был определен уровень содержания вируса в концентрированном вирусном урожае, значение которого составило от  $3,5 \times 10^7$  до  $2,23 \times 10^8$  ГЭ/мл.

По результатам исследований, представленных в данной главе, получены патенты на изобретения № 2511029 РФ «Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* TG1(pRV<sub>Moscow3253</sub>G-L) для получения набора ПЦР-стандартов и набор ПЦР-стандартов для определения концентрации штамма вируса бешенства «Москва 3253 в рабическом антигене», опубл. 10.04.2014, бюл. № 10 и № 2511440 РФ «Способ количественного определения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», опубл. 10.04.2014, бюл. № 10.

В главе 6 представлены результаты исследований по отработке технологических приемов выделения гликопротеида из *virus fixe* культурального происхождения для использования при конструировании диагностикума с наночастицами коллоидного золота. Культуральную вирусосодержащую суспензию, инактивированную фенолом и концентрированную ультрафильтрацией кросс-флоу, очищали гель-хроматографией, в результате которой на хроматограмме были зафиксировали 3 пика (Рисунок 7).

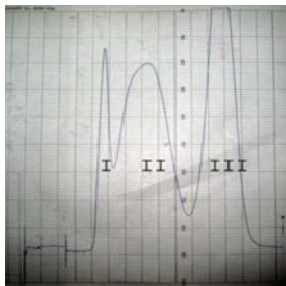


Рисунок 7 – Хроматографический профиль образца инактивированной культуральной вирусной суспензии при гель-фильтрации на TSK-геле HW-65

Фракции каждого пика исследовали иммунохимически непрямой ДИА с использованием АИГ лошадиного и коммерческого антивидового пероксидазного конъюгата. Дот-анализ выявил наличие вируса в образцах фракций пиков I и II; образец фракции пика III не содержал вирусного антигена. Полученные данные свидетельствовали о разделении культуральной суспензии в процессе очистки на вирусный материал и балластные низкомолекулярные компоненты. Далее в экспериментах для обработки *virus fixe* «Москва 3253» использовали тритон X-100 в концентрации 2 %. Для хроматографической очистки выделенного гликопротеида были апробированы два носителя. Первоначально был апробирован носитель Сефадекс G-200 с параметрами фракционирования 5–800 кДа, однако с его использованием не удалось полностью отделить G-белок от балластных молекул – на хроматограмме были зафиксированы нечеткие пики с зонами перекрытия. Применение другого носителя – TSK-геля HW-65 с параметрами по разделению белка 50–1000 кДа с использованием аналогичной хроматографической системы оказалось более эффективным; хроматограмма была представлена двумя основными пиками, из которых первый соответствовал конгломератам недезинтегрированного вируса, а второй – гликопротеиду (Рисунок 8). Содержание белка в образцах пика I составило 280 мкг/мл, пика II – 650 мкг/мл.

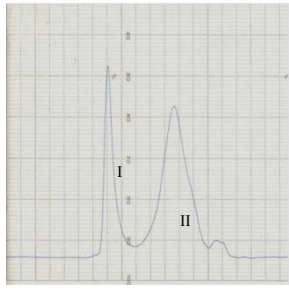


Рисунок 8 – Хроматографический профиль образца *virus fixe* «Москва 3253» при гель-фильтрации на TSK-геле HW-65

Получение очищенного гликопротеида вируса бешенства «Москва 3253» подтвердили и результаты электрофореза в 12 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия с использованием окраски азотнокислым серебром и кумасси R-250, на электрофореграмме была зафиксирована одна полоса при окраске на белок и на углеводы (Рисунок 9).

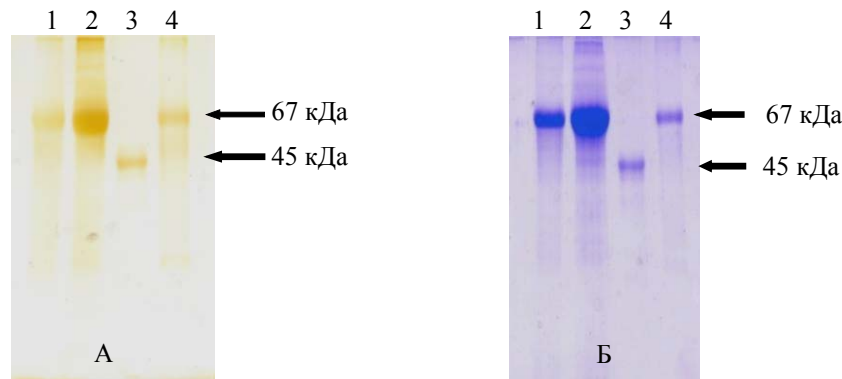


Рисунок 9 – Электрофореграмма гликопротеида *virus fixe* «Москва 3253»

А – окраска азотнокислым серебром; Б – окраска кумасси синим R-250.

1 – очищенный гликопротеид *virus fixe* «Москва 3253»; 2 – препарат после осаждения этанолом и ацетоном; 3 – маркер овальбумин 45 кДа; 4 – маркер БСА 67 кДа.

Иммуногенные свойства изолированного из *virus fixe* «Москва 3253» гликопротеида изучали в эксперименте по иммунизации выделенным антигеном белых мышей инбредной линии BALB/c. В эксперименте использовали очищенный гликопротеид и цельный вирус бешенства культурального происхождения, в качестве адъюванта применяли полный адъювант Фрейнда (ПАФ). Исследование иммунных сывороток мышей в непрямом ИФА с антивидовым пероксидазным конъюгатом показало, что очищенный гликопротеид *virus fixe* «Москва 3253» индуцирует образование защитных антител в большей степени, чем цельновирусный антиген, при этом введение гликопротеида совместно с ПАФ способствовало накоплению антител в большем титре (Таблица 7).

Таблица 7 – Значения защитного титра антител в сыворотках мышей, иммунизированных гликопротеидом *virus fixe* и цельновирусным антигеном (n=3)

Тип антигена и адъюванта	Результаты ИФА	
	после третьей иммунизации	после пятой иммунизации
Изолированный гликопротеид	1:80–1:160	1:160–1:320
Цельновирусный антиген	1:20–1:40	1:80
Гликопротеид с ПАФ	1:320–1:640	1:640–1:1280
Цельновирусный антиген с ПАФ	1:80–1:160	1:160–1:320
0,9 % раствор хлористого натрия (контроль)	отрицательный	отрицательный



Сыворотки мышей, иммунизированных антигеном на основе цельного вируса, характеризовались защитным титром на уровне 1:80; в иммунных сыворотках животных, которым вводили очищенный гликопротеид с ПАФ, зарегистрированы титры антител 1:640–1:1280.

Выделенный гликопротеид *virus fixe* «Москва 3253» использовали в дальнейшей работе при получении конъюгата с наночастицами коллоидного золота для постановки прямого ДИА, а также для сенсбилизации мембраны для непрямого варианта ДИА при исследовании активности антирабических препаратов.

Рисунок 10 иллюстрирует результаты исследования *in vitro* уровня содержания протективных антител в антирабических сыворотках лошадей-продуцентов в прямом ДИА с диагностикумом на основе гликопротеида с наночастицами коллоидного золота. Как показал анализ, содержание защитных антител в иммунных сыворотках животных соответствовало значениям титров 1:640–1:1280.

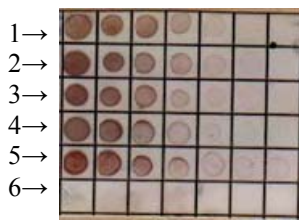


Рисунок 10 – Исследование активности иммунных сывороток лошадей-продуцентов *in vitro* в ДИА с конъюгатом на основе наночастиц коллоидного золота и гликопротеида *virus fixe*

1–5 ряды – двукратные разведения с 1:40 иммунных сывороток лошади; 6 ряд – двукратные разведения с 1:40 НЛС (отрицательный контроль).

Рисунок 11 отображает результаты тестирования АИГ коммерческих серий в прямом ДИА с данным диагностикумом. Специфическая активность АИГ, выявленная *in vitro*, соответствовала значениям титров антител 1:5000–1:10000.

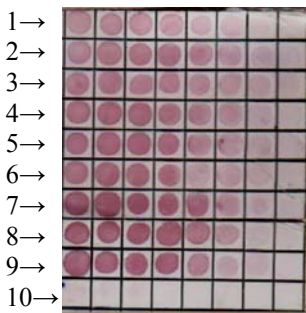


Рисунок 11 – Исследование активности АИГ *in vitro* в ДИА с конъюгатом на основе наночастиц коллоидного золота и гликопротеида *virus fixe*

1–9 ряды – двукратные разведения с 1:160 иммуноглобулина серий № 140–148; 10 ряд – двукратные разведения с 1:40 НЛС (отрицательный контроль).

В рамках настоящего исследования для экспресс-оценки в непрямом ДИА активности антирабических сывороток и иммуноглобулина был сконструирован конъюгат на основе белка *A. S. aureus* и наночастиц коллоидного золота со средним размером 15–17 нм. При постановке непрямого ДИА для повышения специфичности анализа в качестве антигена на твердую фазу сорбировали гликопротеид, изолированный из *virus fixe* «Москва 3253». При тестировании иммунных сывороток лошадей с использованием диагностикума на основе белка *A. S. aureus* зарегистрированы значения титров антител от 1:640 до 1:1280 (Рисунок 12), эти данные аналогичны полученным ранее результатам с использованием конъюгата на основе гликопротеида *virus fixe*.

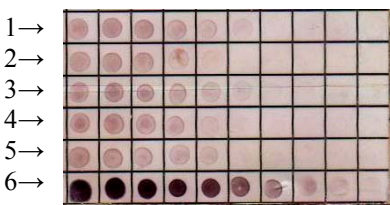


Рисунок 12 – Результаты непрямого ДИА при определении активности антирабических гетерологичных препаратов с диагностикумом на основе белка *A. S. aureus*

1–5 ряды – двукратные разведения с 1:80 антирабических сывороток лошади; 6 ряд – двукратные разведения с 1:80 гетерологичного АИГ.

На Рисунке 13 представлены результаты тестирования АИГ в непрямом ДИА с диагностикумом на основе белка *A. S. aureus*. В результате экспресс-анализа выявлен уровень содержания протективных антител в значениях от 1:5000 до 1:20000.

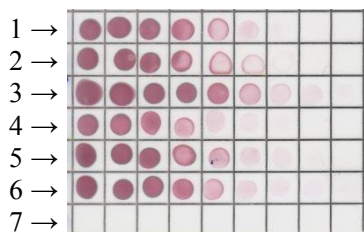


Рисунок 13 – Результаты непрямого ДИА при определении активности антирабического гетерологичного иммуноглобулина с диагностикумом на основе белка *A. S. Aureus*  
1–6 ряды – двукратные разведения с 1:160 антирабического иммуноглобулина; 7 ряд – двукратные разведения с 1:40 НЛС (отрицательный контроль).

Таким образом, сконструированы неферментные диагностикумы с наночастицами коллоидного золота с использованием двух видов иммунореагентов – гликопротеида *virus fixe* «Москва 3253» для постановки прямого ДИА и белка *A. S. aureus* для непрямого ДИА. Дот-анализ позволяет *in vitro* в течение нескольких часов определять активность иммунных сывороток продуцентов и выделенного из них иммуноглобулина. Данные варианты иммуноанализа являются альтернативой РН вируса бешенства на белых мышах и особенно актуальны на этапе промежуточного контроля при тестировании специфической активности иммунных сывороток продуцентов при производстве АИГ. Научная новизна подтверждена патентом на изобретение № 2360252 РФ «Диагностикум и тест-система для определения активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* методом дот-иммуноанализа», опублик. 27.06.2009, бюл. № 18. Экономические расчеты показали, что проведение анализа *in vitro* для выявления активности иммунных сывороток и готового препарата АИГ намного экономичнее теста *in vivo* на белых мышах. Затраты на проведение 1000 ДИА соответствуют 4600 руб.; постановка одной биологической РН обходится в 67000 руб.

**Глава 7** содержит результаты исследований по получению экспериментально-производственных серий гетерологичного АИГ с использованием культуральных технологий и оценке биологических и физико-химических показателей усовершенствованного препарата в соответствии с требованиями НД. Первоначально для экспериментальной оценки возможности получения активных специфических сывороток от животных с применением культурального антигена использовали мелких продуцентов – кроликов. Животных иммунизировали подкожно в объеме 1 мл на 0, 7, 21, 28, 52, 59 сут. Для стимуляции антителообразования при иммунизации использовали адъюванты: гидроксид алюминия (ГО) и полиоксидоний (ПО). Анализ в ДИА активности иммунных кроличьих сывороток, полученных в результате пробного кровопускания на 42 сут от начала иммунизации, показал, что каждый из примененных адъювантов обладал стимулирующим эффектом (Рисунок 14).

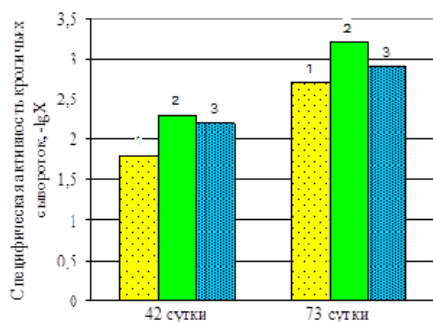


Рисунок 14 – Уровень антителообразования в крови кроликов, иммунизированных культуральным рабическим антигеном

- 1 – иммунизация без адъюванта;
- 2 – иммунизация с ГО;
- 3 – иммунизация с ПО.

К 73 сут от начала иммунизации титры антител возросли в сыворотках животных всех опытных групп, при этом наиболее активными явились сыворотки животных 2-ой группы – 1:1280–1:2560 или  $-lg(3,2 \pm 0,3)$ . У продуцентов 1-ой и 3-ей групп уровень содержания антител составил соответственно 1:320–1:640 или  $-lg(2,7 \pm 0,3)$  и 1:640–1:1280 или  $-lg(2,9 \pm 0,3)$ . Анализ активности сывороток позволил сделать заключение, что использование в качестве адьюванта ПО или ГО индуцирует более интенсивное антителообразование в крови животных в ответ на введение вируса, обеспечивая выработку защитных антител в титре не менее, чем 1:500, что соответствует требованиям НД на АИГ. При исследовании активности полученных сывороток в РН установлены значения титров специфических антител, соответствующие 1:640, 1:513 и 1:548 при требовании нормативной документации на антирабический иммуноглобулин не менее 1:500. Специфические сыворотки крови кроликов, иммунизированных культуральным рабическим антигеном, служили сырьем для выделения из них антирабического иммуноглобулина. Всего были получены 3 лабораторные серии экспериментального антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови кролика, специфическая активность которого в РН составила 332, 347 и 345 МЕ/мл соответственно для серий 01, 02, 03 при требовании НД не менее 150 МЕ/мл. Полученный экспериментальный иммуноглобулин успешно прошел тесты на соответствие НД по показателям содержания белка, электрофоретической однородности, рН, токсичности, цветности, прозрачности, пирогенности, стерильности (Таблица 8).

Таблица 8 – Исследование основных физико-химических и биологических показателей антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови кролика экспериментальных серий 01, 02, 03

Показатель	Требования НД	Антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови кролика		
		Серия 01	Серия 02	Серия 03
Активность в РН на белых мышцах, МЕ/мл	Не менее 150	332	347	345
Содержание белка, %	10,0±1,0	10,0	10,0	10,0
Электрофоретическая чистота	$\gamma$ -глобулин – не менее 80 %; наличие примесей $\alpha$ , $\beta$ -глобулинов – не более 20 %. Альбумин должен отсутствовать	$\gamma$ -глобулин – 97,9 %; $\alpha$ -глобулины – 0,9 %; $\beta$ -глобулины – 1,2 %. Альбумин отсутствует	$\gamma$ -глобулин – 99,86 %; $\alpha$ -глобулины – 0,00 %; $\beta$ -глобулины – 0,14 %. Альбумин отсутствует	$\gamma$ -глобулин – 98,76 %; $\alpha$ -глобулины – 0,11 %; $\beta$ -глобулины – 1,13 %. Альбумин отсутствует
рН	7,0±0,4	7,2	6,8	7,0
Токсичность	должен быть нетоксичным	нетоксичен	нетоксичен	нетоксичен
Пирогенность	должен быть апиrogenным	апиrogenен	апиrogenен	апиrogenен
Прозрачность	не более 0,05	0,05	0,04	0,04
Цветность	не более 0,15	0,14	0,13	0,14
Стерильность	должен быть стерильным	стерилен	стерилен	стерилен

Положительные результаты опыта по иммунизации кроликов, получению от них иммунных сывороток с защитным титром не менее 1:500 и выделению антирабического иммуноглобулина с активностью не менее 150 МЕ/мл позволили нам заключить, что рабический антиген на основе культурального *virus fixe* «Москва 3253» возможно использовать для иммунизации крупных продуцентов иммунной сыворотки – лошадей, традиционно используемых для масштабного производства АИГ в РосНИПЧИ «Микроб».

В эксперименте использовали животных, ранее не иммунизированных другими антигенами. В качестве адъюванта использовали полиоксидоний в конечной концентрации 1 мг/мл. Результаты исследования иммунных сывороток, полученных на 63 сут от начала иммунизации, представлены на Рисунке 15. Анализ показал наличие в сыворотках специфических антител в титре 1:640–1:1280, что позволило говорить об антигенной активности культурального вируса бешенства.

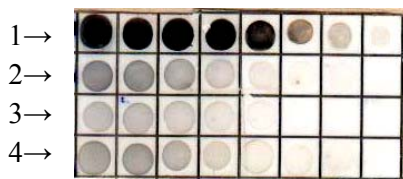


Рисунок 15 – Исследование в ДИА активности иммунных сывороток лошади, полученных с применением антигена на основе культурального *virus fixe* «Москва 3253»

1 ряд – двукратные разведения АИГ коммерческой серии № 143 с 1:80, титр 1:10000 (положительный контроль); 2–4 ряды – двукратные разведения антирабических сывороток лошади с 1:80, титр 1:640–1:1280.

Сыворотки, полученные от лошадей-продуцентов через 77 дней после начала иммунизации, были изучены фармакопейным методом в РН на белых мышах с контрольным вирусом бешенства CVS. В ходе исследования сывороток № 01–03 зарегистрированы титры специфических антител на уровне 1:987; 1:1024 и 1:898 соответственно. Учитывая величину защитного титра, полученные иммунные сыворотки в дальнейшем были использованы в качестве сырья для выделения АИГ. Были получены три экспериментально-производственные серии АИГ, образцы которых были изучены комиссионно в межлабораторных испытаниях. Результаты испытаний усовершенствованного АИГ из сыворотки крови лошади представлены в Таблице 9.

При исследовании активности усовершенствованного иммуноглобулина в прямом ДИА зарегистрированы титры защитных антител на уровне 1:5000 (Рисунок 16).

Рисунок 16 – Результаты определения активности усовершенствованного антирабического иммуноглобулина в прямом ДИА с применением диагностикума на основе гликопротеида *virus fixe* «Москва 3253» и наночастиц коллоидного золота

1–3 ряды – двукратные разведения с 1:160 экспериментального антирабического иммуноглобулина серий 001–003, титр 1:5000; 4 ряд – двукратные разведения с 1:160 антирабического иммуноглобулина (коммерческого), титр 1:5000 (положительный контроль); 5 ряд – двукратные разведения с 1:20 НЛС (отрицательный контроль).

Анализ показал, что экспериментальный иммуноглобулин не уступает по величине защитного титра коммерческому АИГ, производимому с применением органо-тканевого рабического антигена.

Таблица 9 – Результаты испытаний образцов экспериментально-производственных серий АИГ, полученного по усовершенствованной технологии

Показатели	Антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади			Норма НД Р N 002639/01-250210
	Серия 001	Серия 002	Серия 003	
Описание	Слабо опалесцирующая бесцветная жидкость			Прозрачная или слабо опалесцирующая жидкость, от бесцветной до слабо-желтой окраски. Не допускается розового окрашивания препарата. В процессе хранения допускается появление незначительного осадка, исчезающего при встряхивании при температуре (20±2) °С
Подлинность: Видоспецифичность	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Имуноглобулин должен образовывать четкое кольцо преципитации с сывороткой, преципитирующей белки сыворотки крови лошади, и не образовывать кольцо с сыворотками, преципитирующими белки сыворотки крови человека, крупного рогатого скота и свиньи
Специфичность антител	Антирабические антитела присутствуют в титре 1:3661	Антирабические антитела присутствуют в титре 1:3364	Антирабические антитела присутствуют в титре 1:3556	Должны присутствовать антирабические антитела
Специфическая активность <i>in vivo</i> , МЕ/мл	165	151	160	Не менее 150 в РН на белых мышах с <i>virus fixe</i> CVS
Специфическая активность <i>in vitro</i>	1:5000			–
Белок, %	10	9,4	9,3	От 9 до 11
рН	7,0	7,1	7,0	От 6,6 до 7,4
Цветность	0,08	0,08	0,09	Не более 0,15
Прозрачность	0,029	0,026	0,024	Не более 0,05
Электрофоретическая однородность	γ-глобулин – 100 %; α, β-глобулины – 0 %.  Альбумин отсутствует	γ-глобулин – 100 %; α, β-глобулины – 0 %.  Альбумин отсутствует	γ-глобулин – 99,93 %; α-глобулин – 0 %; β-глобулин – 0,07 %.  Альбумин отсутствует	Фракция γ-глобулина – не менее 80 %; наличие примесей – α, β-глобулинов – не более 20 %.  Альбумин должен отсутствовать
Спирт этиловый	Менее 1 %			Не более 4,5 %
Риванол	Отсутствует			Должен отсутствовать
Стерильность	Стерилен. Микоплазмы отсутствуют			Препарат должен быть стерильным
Токсичность	Нетоксичен			Препарат должен быть нетоксичным
Пирогенность	Апирогенен			Препарат должен быть апирогенным

Таким образом, все три экспериментально-производственные серии АИГ в ходе испытаний продемонстрировали соответствие требованиям НД, что засвидетельствовано в актах межлабораторных испытаний, утвержденных директором института 28.08.2014 г. Полученные результаты позволяют сделать вывод об эффективности разработанной технологии получения культурального рабического антигена. Результаты исследований явились основанием для разработки производственно-технологической документации, регламентирующей технологические процедуры масштабного культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой клеточной линии Vero и приготовления рабического антигена на основе культурального *virus fixe*.

**Глава 8** посвящена разработке модульной системы очистки и стерилизации раствора АИГ с применением фильтрационных материалов отечественного производства. Разработанная ранее уникальная система каскадной фильтрации раствора иммуноглобулина обеспечивает эффективную очистку АИГ от балластных примесей и его стерилизацию, однако уязвимым местом данной схемы является использование импортных фильтрационных материалов. Для решения проблемы нам предстояло определиться с типом фильтра (глубинный, мембранный); формой фильтрационного модуля (диски, патрон, капсула) и подобрать оптимальный микронный рейтинг материала, на основе которого изготовлен фильтроэлемент. В главе рассмотрены как предварительные баромембранные процессы, целью которых является очистка раствора иммуноглобулина от балластных примесей, так и финишные, обеспечивающие стерилизацию продукта. Для коррекции цветности раствора АИГ нами традиционно использовались угольные дисковые картонные фильтры Zeta Carbon (CUNO, Франция). Для подбора отечественного аналога были изучены фильтрационные материалы глубинного типа для фармацевтической промышленности, выпускаемые в Российской Федерации. В результате проведенного поиска выбор был остановлен на предварительных картонных фильтрах (ФПК) с активированным углем в виде дисков диаметром 142 мм от ЗАО «Владисарт». В эксперимент по изучению эффективности осветляющей фильтрации с использованием отечественных дисков ФПК в сравнении с импортным аналогом был взят раствор АИГ с показателем цветности ( $0,37 \pm 0,01$ ) опт. ед. Учитывая собственный практический опыт, свидетельствующий о зависимости эффективности сорбции от величины интенсивности потока, осветляющую фильтрацию проводили при минимальной величине давления 0,03 МПа. По окончании фильтрации с использованием глубинных фильтров двух производителей были получены растворы с показателями цветности, соответствующими требованиям НД (Таблица 10).

Таблица 10 – Результаты сравнительных испытаний картонных фильтров с активированным углем для удаления гемпигмента из раствора антирабического иммуноглобулина (n=5)

Фильтр	Производитель	Тип фильтра	Условия проведения фильтрации	Показатель цветности, опт. ед. (норма – не более 0,15)	
				до фильтрации	после фильтрации
ФПК	Владисарт, Россия	Глубинный дисковый, 142 мм	( $37 \pm 1$ ) °С под давлением 0,03 МПа	$0,37 \pm 0,001$	$0,041 \pm 0,001$
Zeta Carbon	CUNO (3M Purification, Франция)	Глубинный дисковый, 142 мм	( $37 \pm 1$ ) °С под давлением 0,03 МПа	$0,37 \pm 0,001$	$0,026 \pm 0,002$

Результаты опыта свидетельствовали о возможности использования угольных картонных фильтров ФПК для удаления гемпигмента из раствора АИГ на этапе проведения предварительной фильтрации. Далее были отработаны условия депирогенизации АИГ, для проведения которой ранее мы использовали модифицированные глубинные фильтры Zeta Plus (CUNO, Франция) на основе диатомита. При решении проблемы поиска аналога данного фильтра наше внимание привлек относительно новый класс отечественных мембранных материалов – положительно заряженных мембранных микрофильтров, изготовленных из модифицированного полиамида (nylon<sub>66+6</sub>) (капрона) с положительно заряженными функциональными группами (ООО НПП «Технофильтр», Россия). Решив первую задачу по выбору депирогенизирующего фильтра, далее необходимо было определиться с типом фильтрационного модуля и размером пор его основы – мембранного сорбента. Оптимальным фильтроэлементом является использование фильтрационных капсул на основе указанной модифицированной мембраны. В эксперимент были взяты фильтрационные капсулы КФМ.К+ с двуслойным мембранным сорбентом с размером пор 020/020 мкм, высотой 60 и 125 мм. Поскольку раствор иммуноглобулина относится к числу вязких труднофильтруемых жидкостей, исследовали пропускную способность каждого типа капсулы. Поскольку раствор иммуноглобулина относится к числу вязких труднофильтруемых жидкостей, исследовали пропускную способность каждого типа капсулы. Полученные результаты послужили нам дальнейшим ориентиром при выборе типа фильтра в зависимости от количества раствора, требующего очистки. Для партий объемом не более 20 дм<sup>3</sup> целесообразно применять мини-капсулы высотой 60 мм, для партии от 30 до 40 л – миди-капсулы 125 мм. Потери продукта при фильтрации через капсульные фильтры, как показал эксперимент, весьма незначительны – (0,57±0,02) и (0,42±0,02) % (Таблица 11).

Таблица 11 – Результаты испытаний фильтрационных капсул КФМ.К+ с различной площадью фильтрации при очистке раствора антирабического иммуноглобулина (n=5)

Тип фильтрационной капсулы	Размер пор, мкм	Площадь фильтрации, м <sup>2</sup>	Объем профильтрованного раствора АИГ, дм <sup>3</sup>	Потери препарата	
				дм <sup>3</sup>	%
КФМ.К+-020/020-К-60	020/020	0,13	21±1	0,120±0,005	0,57±0,02
КФМ.К+-020/020-К-125		0,20	36±2	0,150±0,007	0,42±0,02

Размер пор выбранного нами мембранного сорбента (020/020 мкм) обусловлен тем, что к этапу депирогенизации раствор иммуноглобулина проходит стадии двухступенчатой предварительной осветляющей фильтрации, организованной по принципу каскада через патронные элементы 0,80/0,45 и 0,45/0,20 мкм и его нагрузка, в том числе микробиологическая, сведена к минимуму. Для изучения эффективности мембранного сорбента в отношении удержания пирогенов в работу был взят раствор иммуноглобулина с показателем пирогенности (3,2±0,1) °С, превышающим предельно допустимый по НД уровень (1,4 °С) более чем в 2 раза. Эффективность фильтра оценивали по показателю пирогенности пропущенного через него раствора. После однократной фильтрации пирогенного раствора через капсулу КФМ.К+-020/020-К-125 (способ 1) нам не удалось снизить первоначальный показатель пирогенности до порогового уровня, в испытаниях на кроликах регистрировали значение пирогенности (1,8±0,2) °С (Рисунок 17).

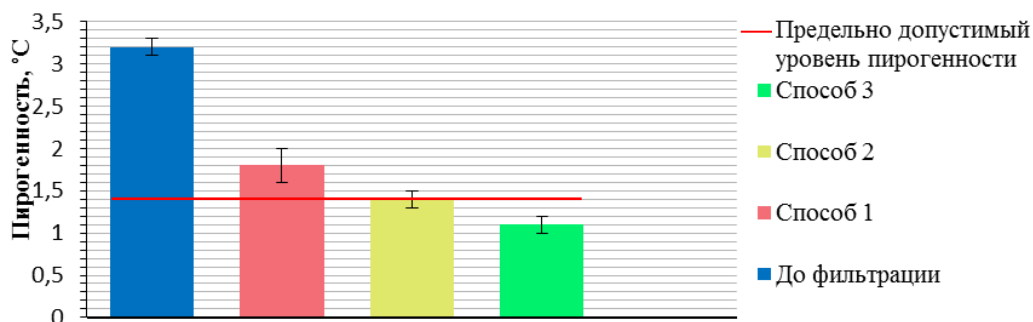


Рисунок 17 – Эффективность депирогенизации раствора антирабического иммуноглобулина с использованием отечественных мембранных сорбентов «Технофильтр»

Для повышения эффективности процесса депирогенизации было решено добавить использование мембранного сорбента на стадии предварительной осветляющей фильтрации. Ранее для этой цели использовали последовательную фильтрацию через два патрона ЭПМ.К-080/045 и ЭПМ.К-045/020. Несколько видоизменив фильтрационный каскад, мы апробировали на этой стадии фильтр с Zeta-потенциалом: вместо традиционно используемого патронного элемента с мембраной 0,45/0,20 мкм применили такой же 10" патрон, но на основе модифицированного мембранного сорбента ЭПМ.К+-045/020 (способ 2). В результате двухэтапной очистки через мембранные сорбенты значение пирогенности снизилось до порогового уровня и составило  $(1,4 \pm 0,1)$  °C. Учитывая, что содержание пирогенов в растворе иммуноглобулина после завершения первичного цикла все же имело значение, близкое к пороговому, продукт еще раз подвергли очистке с использованием капсулы КФМ.К+-020/020-К-125 (способ 3). В результате трехкратной депирогенизирующей фильтрации значение пирогенности раствора иммуноглобулина, подаваемого для розлива в первичную упаковку, составило  $(1,1 \pm 0,1)$  °C (Рисунок 17).

Таким образом, испытание отечественных мембранных сорбентов на основе модифицированной полиамидной мембраны позволило рекомендовать их для депирогенизирующей очистки иммуноглобулина от пирогенов взамен импортных глубинных фильтров с Zeta-потенциалом.

Ориентируясь на отечественного производителя фильтрационных материалов, а также с целью максимального исключения зависимости производства иммуноглобулина от зарубежных расходных фильтроматериалов, на дальнейшем этапе была изучена эффективность стерилизующих фильтрующих элементов капсульного типа с двуслойными мембранами КФМ.К+-0,45/0,20 и КФМ.К+-0,20/0,20; КФМ.К-0,45/0,20 и КФМ.К-0,20/0,20; КФМ.ПС-0,45/0,20. Образцом для сравнения служила стерилизующая капсула Sartobran P зарубежного производства на основе мембраны на основе ацетата целлюлозы. Как показали результаты экспериментов, отечественные стерилизующие капсулы по эффективности процесса стерилизации не уступали фильтроэлементу Sartobran P (Германия), обеспечив стерильность раствора на заключительном этапе фильтрационного каскада (Таблица 12).

Использование на финальной стадии очистки иммуноглобулина капсульных элементов на основе модифицированного капрона КФМ.К+-0,20/0,20 позволяет совместить стерилизацию и дополнительную депирогенизацию. На завершающем этапе стерилизации иммуноглобулина мембранные элементы с минимальным размером пор 0,20/0,20 мкм обеспечивают высокий запас надежности на столь критичной стадии технологического процесса.



Таблица 12 – Результаты испытаний фильтроэлементов капсульного типа отечественного производства при стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина (n=10)

Тип фильтрующего капсульного элемента	Фирма-производитель	Средний размер пор мембраны, мкм	Материал мембраны	Количество положительных испытаний на целостность мембраны, %	Число проведенных исследований n / Количество стерильных процедур, %
Sartobran P	«Sartorius» Германия	0,45/0,20	Ацетат целлюлозы	100	10 / 100
КФМ.ПС	ООО НПП «Техно-фильтр», Россия	0,45/0,20	Полисульфон	100	10 / 100
КФМ.К+		0,20/0,20	Модифицированный полиамид (Nylon-6+ Nylon-66) с положительным Zeta-потенциалом	100	10 / 100
КФМ.К+		0,45/0,20		100	10 / 100
КФМ.К		0,20/0,20	Полиамид	100	10 / 100
КФМ.К		0,45/0,20		100	10 / 100

Производитель отечественных стерилизующих капсул указывает на возможность их многократного использования при грамотной регенерации (не менее 5 раз), что, безусловно, позволило бы снизить затраты на производство препарата. Однако, во избежание риска пирогенизации фильтров во время процедур отмывки, последующей сборки системы и автоклавирования разработанная нами система фильтрации однонаправленна и не предусматривает повторное использование материалов для проведения баромембранных процессов по очистке и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина. Данная позиция отвечает требованиями надлежащей производственной практики.

Таким образом, в результате исследований предложена оригинальная модульная система очистки, осветления, депирогенизации и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина с использованием отечественных фильтроматериалов, внедренная в серийное производство препарата. Показано, что глубинные и мембранные фильтры российских производителей «Владисарт» и «Технофильтр» являются приемлемой альтернативой использованию дорогостоящих импортных фильтроматериалов. С применением разработанного фильтрационного каскада произведено 6 производственных серий препарата, прошедших необходимые контрольные испытания и показавшие соответствие требованиям НД. На препарат указанных серий получены сертификаты соответствия, разрешающие применение препарата в практическом здравоохранении. Результаты проведенных исследований вошли в новую редакцию промышленного регламента ПР № 01898109-47-15 на производство антирабического иммуноглобулина (утвержден директором института 28.12.2015). Экономический эффект от внедрения предложенных технологических решений по очистке и стерилизации антирабического иммуноглобулина с применением отечественных фильтрационных материалов составляет 216508,25 руб. при выпуске препарата объемом 400 л в год.

В главе 9 приведено научно-экспериментальное обоснование получения новой формы выпуска АИГ – лиофилизата для приготовления раствора для внутримышечных инъекций. На первом этапе исследований для выбора оптимальной температуры замораживания АИГ представлялось целесообразным определить его эвтектическую температуру (*Тэвт*) с учетом состава

ва стабилизирующих веществ, введенных в состав препарата. Определение *Тэвт* раствора АИГ проводили методом электропроводности с использованием образцов № 1, 2, 3, содержащих различные комбинации лиопротекторов: глицин (2,25±0,25) %; глицин (2,25±0,25) % и сахароза (1 %); глицин (2,25±0,25) % и мальтоза (1 %). Рисунок 18 иллюстрирует зависимость температуры исследуемых растворов от величины удельного электрического сопротивления.

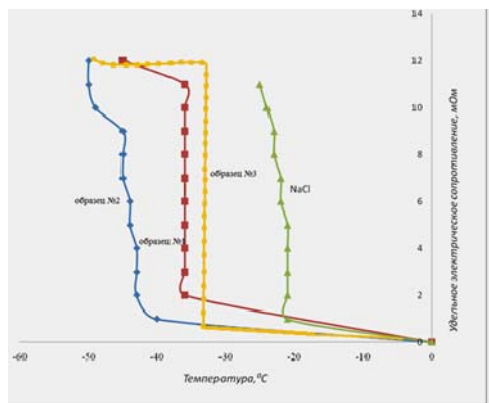


Рисунок 18 – Зависимость удельного электрического сопротивления от температуры растворов иммуноглобулина с различными лиопротекторами

Образец № 1 – раствор АИГ с глицином (2,25±0,25) %; образец № 2 – раствор АИГ с сахарозой (1 %) и глицином (2,25±0,25) %; образец № 3 – раствор АИГ с мальтозой (1 %) и глицином (2,25±0,25) %.

Добавление в раствор АИГ лиопротекторов с различным составом повлияло на значения эвтектической температуры, выявленные в эксперименте: *Тэвт* раствора АИГ с глицином (образец № 1) соответствовала значению минус 36 °С; *Тэвт* раствора АИГ, содержащего глицин в комбинации с сахарозой (образец № 2), оказалась равной минус 44 °С; *Тэвт* раствора АИГ с глицином и мальтозой (образец № 3) составила минус 34 °С. *Тэвт* контрольного раствора хлористого натрия оказалась равной минус 21 °С, что совпадает с литературными данными (Новикова Л.С. и др., 1977). С учетом полученных значений проводили дальнейшие эксперименты по подбору оптимального лиопротектора, для чего высушивали образцы АИГ с различными комбинациями защитных веществ: глицин (2,25±0,25) % в комбинации с сахарозой (1, 5, 10 %); глицин (2,25±0,25) % в комбинации с мальтозой (1, 5, 10 %). В качестве образца для сравнения использовали иммуноглобулин с содержанием глицина (2,25±0,25) %. Наличие стабилизаторов углеводной природы – сахарозы и мальтозы в составе АИГ обусловило более длительный процесс сушки, чем в случае высушивания иммуноглобулина с глицином – соответственно 24, 21 и 15 ч, что может быть обусловлено стеклованием двух первых образцов при замораживании (Рисунок 19).

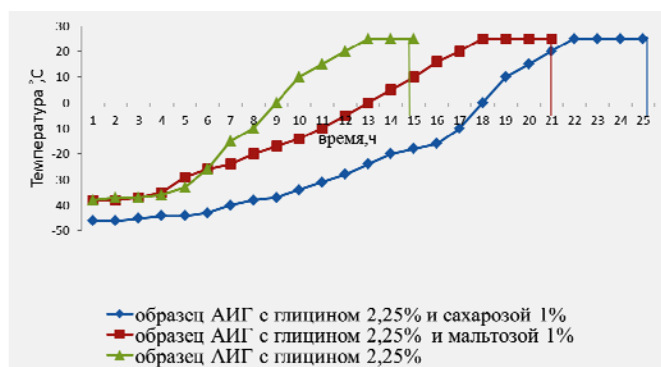


Рисунок 19 – Длительность процесса сублимационного высушивания АИГ с лиопротекторами различной природы

Эффективность использования указанных лиопротекторов оценивали по следующим показателям лиофилизатов – описание (внешний вид) полученной таблетки, содержание белка, ПМВ, время растворения. Активность сухого препарата оценивали на момент получения и в тесте на «ускоренное старение» (Петухов В.Г., 2003) через месяц хранения лиофилизата при 37 °С. Опыт показал, что все полученные лиофилизаты представляли собой хорошо сформированную таблетку, плотно прилегающую к стенкам флакона. Образцы, содержащие сахарозу и глицин, характеризовались белым цветом; у лиофилизатов с включением мальтозы наблюдалось незначительное потемнение. «Ускоренное старение» образцов сухого АИГ не привело к изменениям цвета таблетки. Включение в состав препарата, помимо глицина, углеводов сахарозы и мальтозы в различных концентрациях обусловило стабильность свойств лиофилизатов АИГ после хранения в условиях «ускоренного старения». Содержание белка в лиофилизированных образцах соответствовало требованиям, предъявляемым к препарату АИГ в форме раствора для инъекций (Таблица 13).

Таблица 13 – Результаты исследования свойств лиофилизированного антирабического иммуноглобулина с включением различных лиопротекторов (n=3)

Показатель Лиопротектор	Содержание белка, % (норма НД – 10±1) %		Потеря в массе при высушивании, %		Время растворения, мин	
	на момент получения	через 1 мес. хранения при 37 °С	на момент получения	через 1 мес. хранения при 37°С	на момент получения	через 1 мес. хранения при 37°С
глицин (2,25±0,25) %	9,4±0,1	9,3±0,2	1,58±0,02	1,37±0,03	0,25±0,03	0,22±0,02
мальтоза 10 % + глицин (2,25±0,25) %	9,5±0,1	9,4±0,3	2,30±0,05	1,96±0,02	1,00±0,40	1,60±0,30
мальтоза 5 % + глицин (2,25±0,25) %	9,2±0,2	9,3±0,1	1,70±0,04	2,13±0,01	1,00±0,10	1,10±0,20
мальтоза 1 % + глицин (2,25±0,25) %	9,5±0,3	9,3±0,1	0,90±0,02	1,23±0,03	0,55±0,01	0,60±0,04
сахароза 10 % + глицин (2,25±0,25) %	9,4±0,3	9,4±0,2	2,45±0,05	1,57±0,04	1,00±0,10	1,20±0,20
сахароза 5 % + глицин (2,25±0,25) %	9,2±0,1	9,1±0,1	1,90±0,08	1,78±0,05	1,30±0,20	1,60±0,20
сахароза 1 % + глицин (2,25±0,25) %	9,2±0,1	9,1±0,3	1,40±0,03	1,42±0,01	1,40±0,30	1,40±0,40

При изучении в ДИА активности лиофилизатов выявлено, что на момент получения все лиофилизаты АИГ характеризовались уровнем содержания антирабических антител, соответствующим 1:5120, это же значение было зафиксировано по окончании испытаний. Результаты проведенных опытов позволили заключить, что использование в качестве лиопротекторов глицина или комбинации глицина с мальтозой и сахарозой является вполне приемлемым; однако включение в состав препарата мальтозы или сахарозы менее целесообразно, поскольку углеводная природа последних ведет к увеличению длительности процесса лиофилизации и, соответственно, повышению энергозатрат. В связи с этим далее в опытах по отработке оптимальных параметров лиофильного высушивания АИГ в качестве лиопротектора использовали глицин в концентрации (2,25±0,25) %.

Дальнейшие эксперименты по лиофилизации антирабического иммуноглобулина проводили на современной сублимационной установке Power Dry 9000. Жидкий иммуноглобулин с показателями, соответствующими требованиям ФСП Р N 002639/01-250210 на антирабический иммуноглобулин, высушивали в стеклянных флаконах объемом 10 мл в дозировке 5 мл. Указанный объем лекарственного средства близок к терапевтической дозе, что создает удобство для использования потребителем. Использование флаконов обусловлено современными тенденциями в использовании первичной упаковки при производстве инъекционных растворов в мире и Российской Федерации. Замораживание препарата проводили с учетом ранее выявленной *Тэвт* до минус 38 °С. Традиционно применяемая в институте схема лиофилизации диагностических иммуноглобулинов, используемая нами в первых экспериментах по получению лиофилизата АИГ, предполагает замораживание иммуноглобулинов до температуры минус 45 °С. Применение оптимизированной схемы позволило сократить длительность данного этапа с 14 до 9 ч при скорости замораживания 7,6 °С/ч, что способствует сокращению энергозатрат (Рисунок 20).

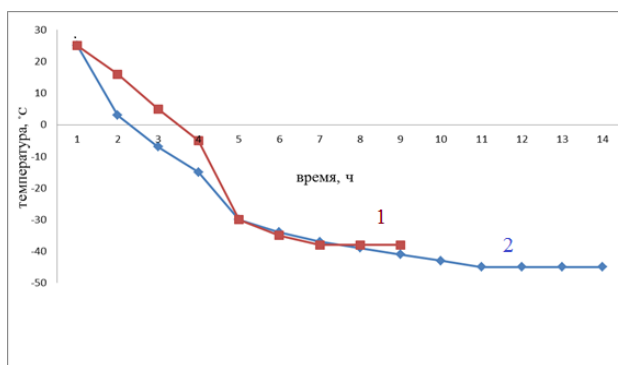


Рисунок 20 – Влияние температуры замораживания на длительность этапа замораживания

1 – температура замораживания минус 38 °С;  
2 – температура замораживания минус 45 °С.

При отработке условий сублимации препарата устанавливали оптимальный режим подвода тепла к продукту, для чего замороженный АИГ высушивали при различных значениях температуры плиты сублиматора ( $T_{пл}$ ): (30±1); (35±1); (40±1) °С при величине вакуума от 7 до 10 Па. Процесс сублимации достаточно тонкий – при недостаточном нагреве процесс лиофилизации будет слишком длительным; интенсификация процесса за счет максимально возможного нагрева плиты и сокращения времени данного этапа может повлечь за собой изменение структуры белковой молекулы и привести в конечном итоге к ухудшению свойств иммуноглобулина. Эксперимент показал, что при интенсивном подводе тепла, когда  $T_{пл}$  составляла (40±1) °С,  $T_m$  во время сублимации превышала эвтектическую, при значениях  $T_{пл}$  (35±1) и (30±1) °С процесс сублимации происходил в температурной зоне, близкой или несколько ниже значения эвтектической температуры. Длительность этапа сублимации составила (9±1) ч при  $T_{пл}$ , равной (40±1) °С; (13±1) ч при  $T_{пл}$  (35±1) °С и (18±1) ч при  $T_{пл}$  (30±1) °С (Рисунок 21).

Внешний вид таблетки лиофилизата иммуноглобулина был удовлетворительным при всех трех способах сублимации. Однако при определении содержания белка в образцах после растворения были выявлены определенные различия: в лиофилизате, сублимированном по способу 3 ( $T_{пл}$  (40±1) °С), отмечено снижение содержания белка до значения (8,5±0,1) %. Значительные потери белка (10,5±0,8) % обусловлены частичным плавлением замороженного продукта, так как удаление влаги происходило при температуре, превышающей эвтектическую. В образцах сухого АИГ, полученного при двух других способах сублимации, содержание белка соответствовало требованиям НД и составило (9,4±0,1) и (9,3±0,2) %.

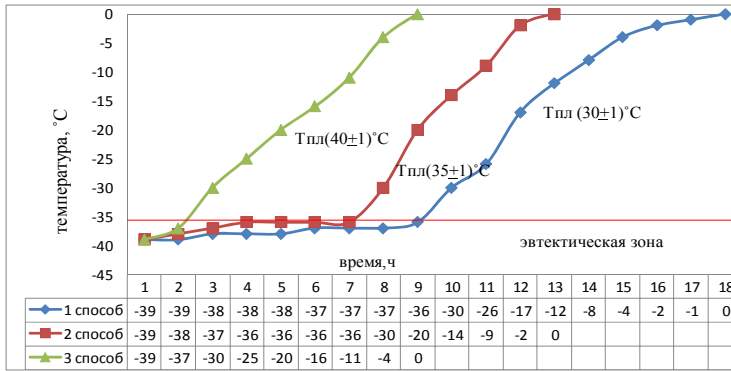


Рисунок 21 – Температура антирабического иммуноглобулина при сублимации в зависимости от режима подвода тепла

Полученные данные свидетельствуют о том, интенсификация процесса сублимации иммуноглобулина за счет повышения  $T_{пл}$  неэффективна и ведет к потере белка и увеличению времени растворения препарата при хранении. Значения  $T_{пл}$   $(30 \pm 1)$  и  $(35 \pm 1)$  °C являются приемлемыми, обеспечивая удаление влаги из продукта в зоне  $T_{эвт}$ , что минимизирует риск деградации молекулы белка. При данных значениях зафиксированы и минимальные потери белка –  $(0,7 \pm 0,03)$  и  $(0,8 \pm 0,01)$  % соответственно. Однако при  $T_{пл}$ , равной  $(35 \pm 1)$  °C,  $T_m$  при сублимации соответствует значениям, вплотную приближенным к значению  $T_{эвт}$ , поэтому во избежание риска выхода  $T_m$  за пределы эвтектической зоны процесс сублимации иммуноглобулина целесообразно проводить при  $T_{пл}$ , равной  $(30 \pm 1)$  °C.

Далее в ходе экспериментов были установлены следующие условия десорбции АИГ для достижения оптимального показателя ПМВ: конечная  $T_m$  –  $(25 \pm 1)$  °C;  $T_{пл}$  –  $(30 \pm 1)$  °C; период досушивания при достижении максимальной температуры – не более 3 ч. Более длительный период досушивания обуславливает снижение ПМВ и, как доказано в опыте, у лиофилизаторов АИГ с ПМВ менее 1 % ухудшаются показатели растворимости. Выявлен оптимальный показатель ПМВ для лиофилизата АИГ, соответствующий значению  $(2 \pm 1)$  %. При использовании оборудования Power Dry 9000 для лиофилизации АИГ длительность этапа десорбции при положительных температурах от 0 до 25 °C при  $T_{пл}$   $(30 \pm 1)$  °C составила  $(10 \pm 1)$  ч, аналогичный период с использованием устаревшей установки Frigera LZ 9 при тех же условиях соответствовал значению  $(23 \pm 1)$  ч. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение современного лиофильного оборудования Power Dry 9000 для сублимационного досушивания гетерологичного антирабического иммуноглобулина позволило оптимизировать процесс лиофилизации препарата.

Для оценки эффективности разработанной нами технологии лиофильного досушивания АИГ в межлабораторных испытаниях была проведена оценка свойств полученных лиофилизатов на соответствие требованиям НД, а также исследована стабильность основных показателей АИГ в долгосрочных испытаниях. Комиссионное изучение выявило соответствие свойств полученных лиофилизатов АИГ требованиям НД, а по показателям описание, время растворения, ПМВ, молекулярные параметры – требованиям Европейской фармакопеи на лиофилизированные лечебные иммуноглобулины (Таблица 14).

Результаты исследований засвидетельствованы в актах межлабораторных испытаний, утвержденных директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 10.06.2014 г.

Таблица 14 – Характеристика основных биологических и физико-химических показателей лиофилизированного гетерологичного антирабического иммуноглобулина

Показатель	Результаты испытаний лиофилизатов АИГ экспериментально-производственных серий			Норма согласно НД Р N 002639/01-250210, Европейской фармакопеи
	серия 0101	серия 0102	серия 0103	
Описание	Пористая гигроскопичная масса в виде таблетки белого цвета. После растворения – слабо опалесцирующая бесцветная жидкость			Пористая гигроскопичная масса в виде таблетки или порошка белого цвета, допускается слабо-желтая окраска. После растворения – прозрачная или слабо опалесцирующая жидкость, от бесцветной до слабо-желтой окраски. Не допускается розового окрашивания препарата. В процессе хранения допускается появление незначительного осадка, исчезающего при встряхивании при температуре (20±2) °С
ПМВ, %	1,2	1,4	1,7	Не более 3
Время растворения, мин	1,5	2,0	2,2	20 мин при температуре 20–25 °С
Цветность, ед. ОП	0,076	0,068	0,066	Не более 0,15
Прозрачность, ед. ОП	0,031	0,020	0,021	Не более 0,05
Специфическая активность <i>in vivo</i> в РН, МЕ/мл	165	170	171	Не менее 150 МЕ/мл
Белок, %	9,2	9,3	9,2	От 9 до 11
рН	7,0	7,1	7,1	От 6,6 до 7,4
Стерильность	Стерилен			Препарат должен быть стерильным
Риванол	Отсутствует			Должен отсутствовать
Электрофоретическая однородность	γ-глобулин – 100%; α-, β-глобулины, альбумин отсутствуют			Фракция γ-глобулина – не менее 80 %; наличие примесей – α-, β-глобулинов – не более 20 %. Альбумин должен отсутствовать
Токсичность	Нетоксичен			Препарат должен быть нетоксичным
Пирогенность	Апирогенен			Препарат должен быть апирогенным
Молекулярные параметры	Фракции мономеров и димеров – 100 %; агрегаты и полимеры отсутствуют			Сумма площадей пиков мономеров и димеров IgG должна составлять не менее 85 %, агрегатов и полимеров – не более 10 % от общей площади хроматограммы

При исследовании специфической активности лиофилизатов АИГ в прямом ДИА с диагностикумом на основе наночастиц коллоидного золота и гликопротеида вируса бешенства отмечено наличие специфических антител в титре 1:5000–1:10000 (Рисунок 22).

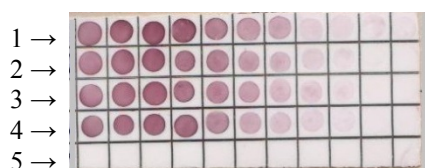


Рисунок 22 – Результаты ДИА при исследовании активности лиофилизированного гетерологичного антирабического иммуноглобулина серий 0101, 0102, 0103

1–3 ряды – двукратные разведения с 1:80 лиофилизата АИГ (серии 0101, 0102, 0103); титр 1:5000–1:10000. 4 ряд – положительный контроль (двукратные разведения с 1:80 жидкого АИГ серии 101); титр 1:5000–1:10000. 5 ряд – отрицательный контроль (двукратные разведения с 1:20 НЛС)

Антирабический иммуноглобулин, сублимированный с использованием оборудования Power Dry 9000, оценивали в долгосрочных испытаниях через 6, 12, 24 и 36 мес. хранения. На основании данных, полученных в долгосрочных испытаниях, можно рекомендовать срок годности антирабического иммуноглобулина в форме лиофилизата в течение 3 лет. Экспериментально доказано, что в течение этого периода времени качественные показатели лиофилизованного препарата остаются на уровне, соответствующем требованиям НД.

Таким образом, в ходе опытов отработаны оптимальные параметры лиофилизации АИГ на данной установке: температура замораживания – минус  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ ; продолжительность замораживания  $(8 \pm 1)$  ч; скорость замораживания –  $7,6^\circ\text{C}/\text{ч}$ ; рабочий вакуум –  $(7 \pm 3)$  Па; температура плиты сублиматора –  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ ; скорость повышения температуры продукта при сублимации –  $(1,56 \pm 0,59)^\circ\text{C}/\text{ч}$ ; продолжительность этапа сублимации –  $(18 \pm 1)$  ч; конечная температура продукта при десорбции –  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ; продолжительность этапа десорбции –  $(10 \pm 1)$  ч (Рисунок 23).

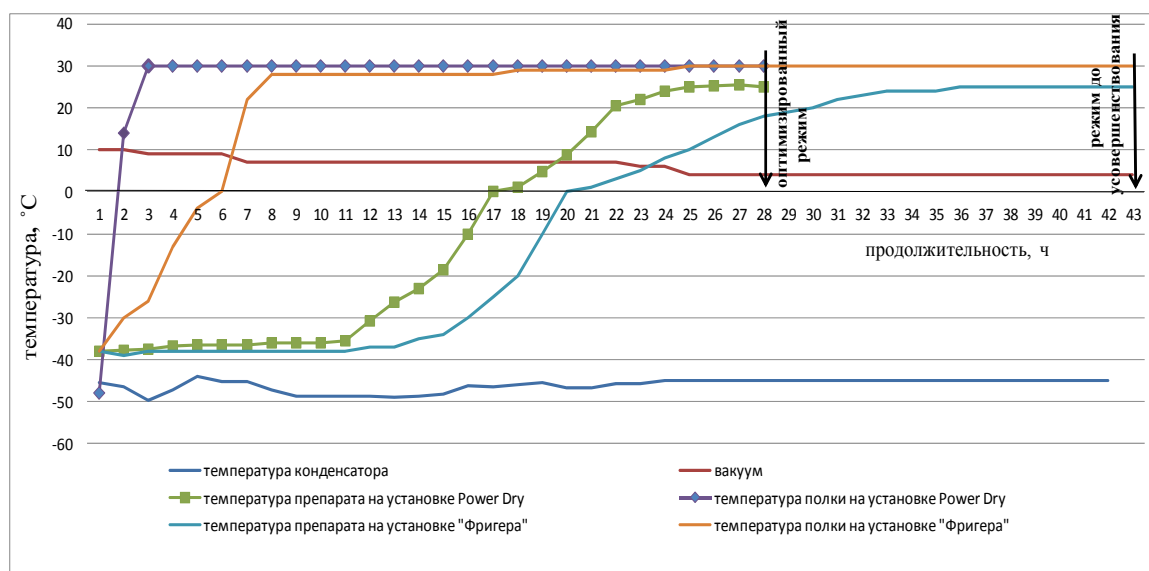


Рисунок 23 – Параметры лиофилизации гетерологичного АИГ (5 мл) на оборудовании Frigera LZ-9 и Power Dry 9000

Практический интерес представляли исследования по лиофилизации экспериментальных серий  $F(ab')_2$ -фрагментов АИГ на оборудовании Power Dry. Препарат  $F(ab')_2$ -фрагментов высушивали в дозировке 1 мл во флаконах объемом 3 мл с учетом параметров лиофилизации цельного иммуноглобулина. В результате исследований экспериментально обоснованы следующие условия лиофилизации  $F(ab')_2$ -фрагментов: температура замораживания – минус  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ ; скорость замораживания –  $7,6^\circ\text{C}/\text{ч}$ ; продолжительность замораживания  $(6 \pm 1)$  ч; рабочий вакуум –  $(7 \pm 3)$  Па; температура нагрева плиты сублиматора –  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ ; скорость повышения температуры при сублимации –  $(4,1 \pm 0,1)^\circ\text{C}/\text{ч}$ ; продолжительность сублимации –  $(12 \pm 1)$  ч; конечная температура материала при десорбции –  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ; продолжительность десорбции –  $(4 \pm 1)$  ч. Качественные характеристики экспериментальных образцов лиофилизированных  $F(ab')_2$ -фрагментов были изучены в межлабораторных испытаниях, показавших соответствие биологических и физико-химических показателей лиофилизатов  $F(ab')_2$ -фрагментов требованиям НД. Так, уровень специфической активности образцов, определенный *in vivo*, составил 173, 186, 179 МЕ/мл соответственно для серий 01–03 при требовании НД не менее 150 МЕ/мл.

Далее с использованием установки Epsilon 2-6 D «Christ» были отработаны параметры лиофилизации АИГ в дозировке 1 мл во флаконах объемом 3 мл. Данная дозировка целесообразна при изготовлении стандартных образцов предприятия (СОП), в частности, СОП специфической активности, а указанное оборудование является наиболее подходящим для лиофилизации небольших объемов препарата. Экспериментально обоснованы следующие параметры лиофилизации АИГ (1 мл): температура замораживания – минус  $(38 \pm 1)$  °С; скорость замораживания –  $(6,5 \pm 0,1)$  °С/ч; продолжительность замораживания  $(2 \pm 1)$  ч; рабочий вакуум –  $(7 \pm 3)$  Па; температура нагрева плиты сублиматора –  $(30 \pm 1)$  °С; скорость повышения температуры при сублимации –  $(3,0 \pm 0,5)$  °С/ч; продолжительность сублимации –  $(8 \pm 1)$  ч; конечная температура материала при десорбции –  $(25 \pm 1)$  °С; продолжительность десорбции –  $(3 \pm 1)$  ч. Основным критерием качества полученного лиофилизата являлась специфическая активность, значения которой, по результатам тестов *in vivo*, превышали 150 МЕ/мл, что соответствует требованиям ФСП на АИГ. Результаты исследования подтвердили эффективность разработанной технологии лиофильного высушивания АИГ в дозировке 1 мл.

Таким образом, на данном этапе исследований экспериментально обоснованы оптимальные параметры лиофильного высушивания гетерологичного АИГ в дозировке 5 и 1 мл и F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов в дозировке 1 мл на современном сублимационном оборудовании Power Dry 9000 и Epsilon 2-6 D «Christ». В долгосрочных испытаниях показано, что гетерологичный АИГ в новой форме выпуска – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения сохраняет свои спецификационные показатели на соответствующем НД уровне в течение 3 лет, что вдвое превышает срок годности препарата в форме раствора для инъекций.

**Глава 10** содержит результаты исследований, направленных на совершенствование системы контроля качества антирабического иммуноглобулина. Рассмотрены вопросы разработки и метрологической характеристики СОП специфической активности АИГ, предназначенного для оценки специфической активности АИГ коммерческих серий, а также изучения молекулярных параметров АИГ с целью расширения перечня показателей качества, представленного в спецификации ФСП. При изготовлении СОП специфической активности были учтены требования НД. Кандидат для изготовления СОП представлял собой специфический иммуноглобулин, полученный в соответствии с промышленным регламентом на производство АИГ. Аттестуемой метрологической характеристикой СОП являлась специфическая активность в Международных единицах (МЕ) в ампуле/флаконе. В качестве образцов сравнения использовали Первый Международный стандартный образец антирабического иммуноглобулина с активностью 59 МЕ и Второй Международный стандартный образец иммуноглобулина человеческого против бешенства с активностью 30 МЕ. Результаты аттестации образцов трех серий СОП специфической активности АИГ относительно Международных стандартов свидетельствовали о соответствии полученных характеристик требованиям НД (Таблица 15).

Стабильность СОП по показателю «специфическая активность» в процессе хранения подтверждена в долгосрочных испытаниях в течение предполагаемого срока годности (2 года) с использованием образцов СОП серии 32-01-11. Всего в период с 2010 года по настоящее время было приготовлено и аттестовано 3 серии СОП специфической активности АИГ. СОП внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях и в отделе биологического и технологического контроля. По результатам исследований внесены изменения № 4 в ФСП на АИГ Р N 002639/01–250210 от 09.02.2016 г., утвержденные Минздравом РФ.



Таблица 15 – Результаты аттестации СОП специфической активности АИГ биологическим методом в РН (n=28)

Серия СОП	Дата проведения экспериментов	Титр активности международного образца	Активность международного образца, МЕ/амп.	Титр активности СОП	Специфическая активность СОП, МЕ/мл	Аттестованное значение СОП, МЕ/мл ( $\bar{x} \pm \Delta x$ )
32-01-11	28.10.10–10.11.10	1:1503	59	1:4391	172	177,33±13,89
				1:5084	200	
				1:4888	176	
	19.11.10–01.12.10	1:1260	59	1:4000	187	
				1:3274	153	
				1:4375	205	
	09.12.10–22.12.10	1:1000	59	1:2828	167	
				1:2639	155	
				1:3076	181	
32-02-14	29.11.13 – 13.12.13	1:278	30	1:2000	216	192,10±13,45
				1:1741	188	
	13.12.13 – 27.12.13	1:616	30	1:3563	174	
				1:3364	164	
	17.01.14 – 31.01.14	1:590	30	1:3408	173	
				1:3562	181	
				1:4000	203	
	07.02.14 – 21.02.14	1:500	30	1:3585	215	
				1:3497	210	
1:3281				197		
32-03-15	13.03.15–27.03.15	1:1300	59	1:4000	182	198,67±16,62
				1:4491	200	
				1:4393	199	
	10.04.15–24.04.15	1:1455	59	1:5040	204	
				1:4709	191	
				1:5769	234	
	22.05.15–05.06.15	1:2000	59	1:5270	156	
				1:7199	212	
				1:7126	210	

Целью дальнейших исследований явилась оценка уровня содержания фракций мономеров, фрагментов и агрегатов в препарате АИГ. В экспериментах были изучены 12 образцов иммуноглобулина в форме раствора для инъекций и лиофилизата. В результате опытов показано, что жидкий АИГ на момент получения характеризуется 100 % содержанием мономеров – при хроматографическом молекулярном разделении образцов при записи профиля элюции регистрировали один пик мономерной фракции (Рисунок 24 а). Аналогичные результаты были получены при исследовании жидкого иммуноглобулина после хранения в течение 1 год 6 мес., что свидетельствовало о стабильности жидкого АИГ в течение срока годности. Дополнительный пик, соответствующий фракции фрагментов, наблюдали после хранения жидкого препарата после 3 лет при рекомендуемой температуре от 2 до 8 °С, при этом содержание фрагментов в среднем составило (3,15±0,16) %, агрегатов не наблюдали ни в одной из серий (Рисунок 24 б). При испытании жидкого АИГ в стресс-условиях (56 °С в течение 1 ч) на хроматограмме была зафиксирована фракция агрегатов в количестве (15,4±0,09) % (Рисунок 24 в). В аналогичных условиях были изучены образцы сухого АИГ. Показано, что лиофилизаты АИГ сохраняют первоначальные молекулярные параметры (100 % фракция мономеров) как после 3 лет хранения, так и после испытаний в стресс-условиях, что позволяет говорить о преимуществе лиофилизированной формы АИГ для обеспечения стабильности молекулярных параметров в процессе длительного хранения и при неблагоприятных температурных воздействиях.

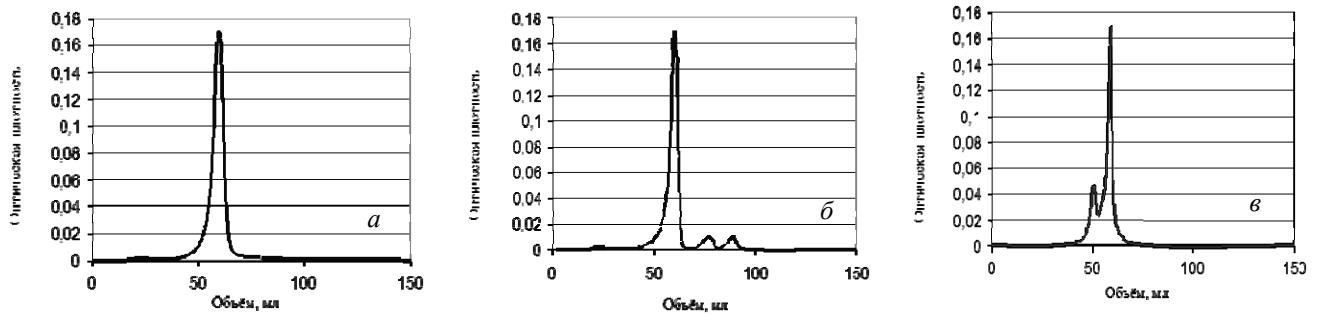


Рисунок 24 – Профили элюции образцов жидкого АИГ: *a* – на момент получения; *б* – через 3 года хранения; *в* – после испытаний в стресс-условиях

Результаты исследований явились основой для разработки проекта изменений № 5 в ФСП на антирабический иммуноглобулин с целью расширения перечня показателей качества готового препарата. Проект изменений направлен для утверждения в Департамент государственного регулирования обращения лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации (заявление № 83494 о внесении изменений в документы, содержащиеся в регистрационном досье, от 27.04.2017 г.).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совершенствование производства иммунобиологических лекарственных препаратов является одним из важнейших направлений развития отечественной медицинской биотехнологии. В настоящей работе отражены вопросы оптимизации производства и совершенствования качества антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Актуальность и важность исследований вызваны тем, что, несмотря на всю значимость для практического здравоохранения выпускаемого нами препарата, его применение при проведении комбинированного антирабического лечения сопряжено с риском возникновения у пациентов нежелательных реакций. Учитывая, что производство иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб» развернуто в 2004 г. по восстановленной технологии, разработанной в 70-е годы прошлого века в Томском НИИ ВС, биотехнологическая схема выпуска препарата в настоящее время требует внедрения современных решений, способствующих повышению безопасности данного лекарственного средства. Производство антирабического иммуноглобулина представляет собой комплекс взаимосвязанных биотехнологических процессов, поэтому для решения проблемы совершенствования качества выпускаемого лекарственного средства нами применен многовекторный подход, заключающийся как в оптимизации большинства стадий технологической схемы получения препарата, так и в разработке новых этапов. В ходе исследований решен комплекс научно-практических задач: разработана технология масштабного культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero для получения культурального рабического антигена для иммунизации животных взамен органо-тканевого антигена; отработаны условия концентрирования культурального вируса методом тангенциальной ультрафильтрации; с применением культурального антигена получен активный специфический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади и отработаны условия проведения баромембранных процессов его очистки и стерилизации с применением отечественных фильтроматериалов; разработан способ *in vitro* количественного определения *virus fixe* штамма «Москва 3253» и антител к нему; разработана технология новой формы выпуска гетерологичного антирабического

иммуноглобулина – лиофилизата для приготовления раствора для внутримышечного введения; усовершенствованы этапы контроля коммерческих серий антирабического иммуноглобулина. Результаты исследований явились основанием для внесения изменений в фармакопейную статью предприятия на антирабический иммуноглобулин Р N002639/01-250210 (ведомость изменений № 4 Р N002639/01-090216 от 09.02.2016 г., утвержденная Министерством здравоохранения Российской Федерации) и переработки промышленного регламента ПР № 01898109-47-15 на производство антирабического иммуноглобулина. Модульная система очистки и стерилизации иммуноглобулина с использованием отечественных фильтров внедрена в производство – с применением усовершенствованной технологии выпущены 6 коммерческих серий антирабического иммуноглобулина общим объемом 400 л на сумму более 39 млн руб., препарат реализован в лечебно-профилактические учреждения 68 субъектов Российской Федерации и применяется в настоящее время для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей. Объемы финансовых затрат на приобретение отечественных расходных материалов снижены на 216508,25 руб. в год при серийном выпуске препарата объемом 400 л.

Подводя итог диссертационной работы, считаем возможным заключить, что в результате проведенных исследований по разработке комплекса современных биотехнологических решений, направленных на оптимизацию производства и совершенствование качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина решена проблема, имеющая важное народно-хозяйственное значение для обеспечения Российской Федерации отечественным уникальным иммунобиологическим лекарственным средством для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей, включенным в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан комплекс научно обоснованных современных биотехнологических решений для оптимизации технологии промышленного производства и совершенствования качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей.

2. Разработана технология масштабного культивирования фиксированного вируса бешенства производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero суспензионным, псевдосуспензионным и роллерным методами. Показано, что усовершенствованные технологические приемы по очистке и концентрированию культурального вируса бешенства тангенциальной ультрафильтрацией позволяют получать рабический антиген, по иммуногенным свойствам не уступающий органо-тканевому антигену. Экспериментально доказана эффективность культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов при получении активных иммунных сывороток.

3. Впервые в промышленных условиях с применением культуральных технологий получены экспериментально-производственные серии усовершенствованного гетерологичного антирабического иммуноглобулина, качественные характеристики которого соответствуют требованиям нормативной документации.

4. Разработаны методические подходы с использованием полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов для количественной оценки содержания *virus fixe* «Москва 3253» в культуральном вирусном материале для последующей направленной иммунизации продуцентов.

5. Отработаны условия выделения и очистки гликопротеида вируса бешенства «Москва 3253» для использования в иммунохимических реакциях. Для оценки специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина *in vitro* предложено использование дот-иммуноанализа с диагностикумами на основе наночастиц коллоидного золота с гликопротеидом вируса бешенства в прямом варианте и с белком А *Staphylococcus aureus* в непрямом варианте.

6. Разработана оригинальная модульная система проведения баромембранных процессов по очистке и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина с использованием фильтроматериалов отечественного производства, внедренная в промышленное производство препарата. Показана экономическая целесообразность новых технологических решений.

7. Впервые разработана экспериментально-производственная технология новых форм выпуска антирабического иммуноглобулина и его F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов – лиофилизатов для приготовления раствора для внутримышечного введения, апробированная в промышленных условиях. Исследованы качественные характеристики лиофилизатов антирабического иммуноглобулина и его F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов. Показано соответствие выявленных значений требованиям нормативной документации на коммерческий препарат. В долгосрочных испытаниях доказана стабильность новой формы выпуска и установлен срок годности – 3 года, что вдвое превышает срок годности препарата в форме раствора для инъекций.

8. С целью расширения перечня спецификационных показателей качества антирабического иммуноглобулина исследованы молекулярные параметры антирабического иммуноглобулина жидкой и сухой форм. Выявлено преимущество лиофилизатов антирабического иммуноглобулина по показателю «молекулярные параметры» при длительном хранении.

9. Разработан и внедрен в производство для проведения контрольных испытаний стандартный образец предприятия специфической активности гетерологичного антирабического иммуноглобулина, аттестованный по Международному образцу антирабического иммуноглобулина.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:**

1. Генералов, С.В. Получение препарата F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента антирабического иммуноглобулина с использованием иммобилизованного пепсина / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, Е.М. Храмова, И.А. Шепелев, Л.В. Савицкая, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Н.Н. Кочкалова, М.Н. Киреев // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2008. – № 3. – С. 53–56.

2. Шарапова, Н.А. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе / Н.А. Шарапова, **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, Л.В. Савицкая, Л.Н. Минаева, Т.А. Михеева, М.В. Галкина, Я.М. Краснов // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2010. – № 1. – С. 63–66.

3. **Абрамова, Е.Г.** Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина – итоги первых пяти лет / **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, О.А. Лобовикова, С.А. Еремин, Ю.Г. Васин, Т.А. Михеева, И.М. Жулидов, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Л.В. Савицкая, А.Г. Селезнева, Р.А. Свинцов, С.В. Генералов, И.В. Шульгина // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2010. – № 3. – С. 58–62.

4. **Абрамова, Е.Г.** Определение молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина методом гель-фильтрации / **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров,

М.Н. Киреев, Н.Н. Кочкалова, С.В. Генералов, А.Г. Селезнева, Л.В. Савицкая, Ю.В. Иванов // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2010. – № 4. – С. 54–57.

5. **Абрамова, Е.Г.** Получение лиофилизированного препарата антирабического иммуноглобулина и исследование его основных свойств / **Е.Г. Абрамова**, Н.Н. Кочкалова, А.К. Никифоров, А.Ю. Бутырский, Ю.В. Иванов, Н.В. Сеницына, Т.А. Михеева, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Л.В. Савицкая, С.В. Генералов, М.Н. Киреев, Н.А. Шаропова // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2011. – № 2 (108). – С. 75–78.

6. Генералов, С.В. Клеточные культуры в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, Ж.В. Матвеева // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2011. – № 4 (110). – С. 76–80.

7. Кочкалова, Н.Н. Определение эвтектической температуры и исследование тепловых параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина методами электропроводности и дифференциальной сканирующей калориметрии / Н.Н. Кочкалова, А.К. Никифоров, Н.Г. Манин, **Е.Г. Абрамова** // **Биотехнология**. – 2011. – № 5. – С. 80–84.

8. Генералов, С.В. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, А.К. Никифоров, О.А. Лобовикова, Л.В. Савицкая, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Т.А. Михеева, А.В. Комиссаров, М.Н. Киреев // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2012. – № 2 (112). – С. 78–81.

9. Кочкалова, Н.Н. Оптимизация формы выпуска и потребительской тары иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади / Н.Н. Кочкалова, **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, О.А. Лобовикова, Л.В. Савицкая, С.А. Бадарин, С.В. Генералов, Н.И. Костылева, Н.А. Шаропова, Ю.В. Иванов // **Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН**. – 2012. – № 5 (87). – Ч. 1. – С. 236–238.

10. Шаропова, Н.А. Выделение гликопротеида из фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» и конструирование на его основе диагностикума для дот-иммуноанализа / Н.А. Шаропова, М.Н. Киреев, **Е.Г. Абрамова**, С.В. Генералов, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, Н.Е. Терешкина, Е.А. Михеева, Л.В. Савицкая, А.В. Гаева, А.К. Никифоров // **Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН**. – 2012. – № 5 (87). – Ч. 1. – С. 347–350.

11. Генералов, С.В. Культуральный антиген в технологии получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, А.К. Никифоров, О.А. Лобовикова, Р.А. Свинцов, А.В. Разживин, Л.В. Савицкая, М.В. Галкина, Т.А. Михеева, А.В. Комиссаров, М.Н. Киреев // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2012. – № 4 (114). – С. 65–69.

12. Генералов, С.В. Оптимизация условий масштабированного культивирования фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в культуре клеток Vero / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, Л.В. Савицкая, О.А. Лобовикова // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2014. – № 2. – С. 101–103.

13. Матвеева, Ж.В. Разработка способа количественной оценки содержания фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в рабическом антигене / Ж.В. Матвеева, **Е.Г. Абрамова**, С.В. Генералов, Н.В. Майоров // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова**. – 2014. – Т. 10, № 2. – С. 12–17.

14. Матвеева, Ж.В. Получение рекомбинантного штамма и набора ПЦР-стандартов для количественного определения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в рабическом антигене // Ж.В. Матвеева, И.В. Тучков, **Е.Г. Абрамова**, Н.В. Майоров // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова**. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 50–53.

15. Генералов, С.В. Крупномасштабное культивирование фиксированного вируса бешенства штамма Москва 3253 на перевиваемой линии клеток Vero (B): методы и сравнительный анализ / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, Р.А. Свинцов // **Биотехнология**. – 2014. – № 5. – С. 38–43.

16. Матвеева, Ж.В. Обнаружение и предупреждение микоплазменной контаминации клеток перевиваемой линии VERO при производстве антирабического иммуноглобулина с использованием культуральных технологий / Ж.В. Матвеева, С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, А.В. Фадеева, Н.В. Майоров // **Дезинфекционное дело**. – 2015. – № 1. – С. 54–59.

17. **Абрамова, Е.Г.** Оптимизация депирогенизирующей фильтрации раствора гетерологичного антирабического иммуноглобулина / **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, И.М. Жулидов, А.Г. Селезнева, Л.В. Савицкая, О.А. Лобовикова, С.В. Генералов // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова**. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 34–38.

18. **Абрамова, Е.Г.** Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина / **Е.Г. Абрамова**, С.В. Генералов, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, А.К. Никифоров, А.В. Комиссаров // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2016. – № 2. – С. 95–102.

#### Патенты

19. Патент на изобретение № 2360252 Российская Федерация. Диагностикум и тест-система для определения активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* методом дот-иммуноанализа / Н.А. Подборонова, **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, Я.М. Краснов, Н.П. Гусева, М.Н. Киреев, В.В. Кутырев. Заявитель и патентообладатель ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Оpubл. 27.06.2009. Бюл. № 18.

20. Патент на изобретение № 2511029 Российская Федерация. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* TG1(pRVMoscow3253G-L) для получения набора ПЦР-стандартов и набор ПЦР-стандартов для определения концентрации штамма вируса бешенства «Москва 3253» в рабическом антигене / Ж.В. Матвеева, Н.А. Осина, Т.В. Бугоркова, И.В. Тучков, Ю.И. Ящечкин, **Е.Г. Абрамова**, Н.В. Майоров, А.К. Никифоров, В.В. Кутырев. Заявитель и патентообладатель ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Оpubл. 10.04.2014. Бюл. № 10.

21. Патент на изобретение № 2511440 Российская Федерация. Способ количественного определения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» / Ж.В. Матвеева, Н.А. Осина, Т.В. Бугоркова, **Е.Г. Абрамова**, С.В. Генералов, Н.В. Майоров, А.К. Никифоров, В.В. Кутырев. Заявитель и патентообладатель Российская Федерация, от имени которой выступает Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Оpubл. 10.04.2014. Бюл. № 10.

#### Публикации в сборниках научных и научно-практических конференций:

22. **Абрамова, Е.Г.** Получение и изучение качества лиофилизированной формы антирабического иммуноглобулина / **Е.Г. Абрамова**, Н.Н. Кочкалова, А.К. Никифоров, Н.В. Синицына, Ю.В. Иванов, М.Н. Киреев, Н.А. Подборонова // Материалы научно-практической конференции «Окружающая среда и здоровье человека». – 29 мая – 1 июня 2007, г. Рязань. – С. 233–235.

23. Кочкалова, Н.Н. Исследование основных свойств лиофилизированного антирабического иммуноглобулина / Н.Н. Кочкалова, **Е.Г. Абрамова**, Н.В. Синицына, Н.И. Костылева, Ю.В. Иванов, М.Н. Киреев, Н.А. Подборонова, О.А. Лобовикова, А.К. Никифоров // Материалы VIII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями в государствах-участниках СНГ». – 25–26 сентября 2007, г. Саратов. – С. 231–232.

24. Киреев, М.Н. Конструирование и изучение потребительских характеристик тест-системы для определения антирабических антител в сыворотках животных / М.Н. Киреев, Н.А. Подборонова, **Е.Г. Абрамова**, Н.П. Гусева, Л.В. Савицкая, А.А. Багаев, С.В. Генералов, А.К. Никифоров // Материалы VIII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями в государствах-участниках СНГ». – 25–26 сентября 2007, г. Саратов. – С. 219–221.

25. **Абрамова, Е.Г.** Производство антирабического иммуноглобулина: современные технологии при проведении баромембранных процессов / **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, Ю.Г. Васин, С.В. Генералов, А.Г. Селезнева, И.М. Жулидов, Д.А. Щербаков // Материалы IX Межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в реализации глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями на территории государств-участников содружества независимых государств». – 30 сентября – 2 октября 2008, г. Волгоград. – С. 49–50.

26. **Абрамова, Е.Г.** Оптимизация потребительской формы гетерологичного антирабического иммуноглобулина / **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, Н.Н. Кочкалова, Л.В. Савицкая, А.Г. Селезнева, Т.А. Михеева, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Н.А. Шарапова, М.Н. Киреев, Ю.В. Иванов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – 11–12 ноября 2008, г. Москва. – С. 12.

27. **Абрамова, Е.Г.** Дот-иммуноанализ при определении активности антирабических сывороток и иммуноглобулиновых препаратов / **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, Н.А. Шарапова, М.Н. Киреев, Л.В. Савицкая, С.В. Генералов, Т.А. Михеева, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – 11–12 ноября 2008, г. Москва. – С. 13.

28. **Абрамова, Е.Г.** Современные фильтрационные технологии в производстве антирабического иммуноглобулина / **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, Ю.Г. Васин, С.В. Генералов, А.Г. Селезнева, И.М. Жулидов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – 11–12 ноября 2008, г. Москва. – С. 12.

29. Матвеева, Ж.В. Разработка полимеразно-цепной реакции с гибридизационно-флюоресцентным учетом результатов для определения количественного содержания вируса бешенства в материале для иммунизации животных / Ж.В. Матвеева, Н.А. Осина, **Е.Г. Абрамова**, И.В. Тучков, Н.В. Майоров, А.В. Степанов, Л.Н. Минаева, Т.А. Михеева, М.В. Галкина, А.К. Никифоров // Материалы юбилейной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Ростовского научно-исследовательского института микробиологии и паразитологии

«Актуальные вопросы инфекционной патологии». – 23–24 сентября 2009, г. Ростов-на-Дону. – С. 293–295.

30. **Абрамова, Е.Г.** Результаты использования дот-иммуноанализа для оценки специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина / **Е.Г. Абрамова**, Н.А. Шарапова, А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, Л.В. Савицкая, С.В. Генералов, Т.А. Михеева, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина // Материалы Пятого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 16–20 марта 2009, г. Москва. – С. 104–105.

31. Никифоров, А.К. Производство препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина: достижения и пути совершенствования / А.К. Никифоров, **Е.Г. Абрамова**, О.А. Лобовикова, С.В. Генералов, Н.Н. Кочкалова, Ю.В. Иванов // Материалы Пятого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 16–20 марта 2009, г. Москва. – С. 182–183.

32. **Абрамова, Е.Г.** Оценка активности антирабических сывороток и иммуноглобулиновых препаратов *in vitro* / **Е.Г. Абрамова**, Н.А. Шарапова, А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, Л.В. Савицкая, С.В. Генералов, Т.А. Михеева, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, А.Ю. Бутырский // Материалы Второго международного конгресса «ЕвразияБио-2010», 13–15 апреля 2010, г. Москва. – С. 5–6.

33. Кочкалова, Н.Н. Определение молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина методом гель-фильтрации / Н.Н. Кочкалова, **Е.Г. Абрамова** // Материалы научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности». – 25–27 мая 2010, ФГУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск. – С. 279–282.

34. Бутырский, А.Ю. Разработка отраслевого стандартного образца специфической активности иммуноглобулина рабического (ОСО АИГ) / А.Ю. Бутырский, А.А. Мовсисянц, **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – 11–12 ноября 2010, г. Москва. – С. 30–31.

35. Кочкалова, Н.Н. Определение эвтектической температуры и исследование тепловых параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина методами электропроводности и дифференциальной сканирующей калориметрии / Н.Н. Кочкалова, А.К. Никифоров, **Е.Г. Абрамова**, Н.Г. Манин // Материалы III научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности». – 31 мая – 2 июня 2011, г. Оболенск. – С. 273–275.

36. **Абрамова, Е.Г.** Разработка лиофилизированной формы гетерологичного антирабического иммуноглобулина / **Е.Г. Абрамова**, Н.Н. Кочкалова, А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, Ю.В. Иванов, Н.В. Синицына, Т.А. Михеева, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Л.В. Савицкая, А.Г. Селезнева, С.В. Генералов // Материалы X Съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации». – 12–13 апреля 2012, г. Москва. – **Инфекция и иммунитет**. – Т. 2, № 1–2. – С. 91.

37. Шарапова, Н.А. Изучение специфической активности антирабического иммуноглобулина и иммунных сывороток *in vitro* в дот-иммуноанализе / Н.А. Шарапова, **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, Л.В. Савицкая, С.В. Генералов // Материалы X Съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов



«Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации». – 12–13 апреля 2012, г. Москва. – **Инфекция и иммунитет**. – Т. 2, № 1. – С. 113.

38. Генералов, С.В. Культивирование фиксированного вируса бешенства Москва 3253 на перевиваемой линии клеток Vero для получения рабического антигена / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, И.М. Жулидов, Ж.В. Матвеева, А.К. Никифоров, Л.В. Савицкая, Л.Н. Минаева, Т.А. Михеева, М.В. Галкина, А.В. Комиссаров, О.А. Лобовикова, Р.А. Свинцов // Материалы X Съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации». – 12–13 апреля 2012, г. Москва. – **Инфекция и иммунитет**. – Т. 2, № 2. – С. 250–251.

39. Генералов, С.В. Культуральный *Virus fixe* как потенциальный рабический антиген в производстве иммуноглобулина для профилактики бешенства / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, И.М. Жулидов, Ж.В. Матвеева, А.К. Никифоров, Л.В. Савицкая, Л.Н. Минаева, Т.А. Михеева, М.В. Галкина, А.В. Комиссаров, О.А. Лобовикова, Р.А. Свинцов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения». – 16–18 мая 2012, г. Пермь. – Т.1. – С. 137–139.

40. Шарапова, Н.А. Результаты использования дот-иммуноанализа для определения активности профилактических антирабических препаратов и иммунных сывороток / Н.А. Шарапова, **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, Л.В. Савицкая, С.В. Генералов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения». – 16–18 мая 2012, г. Пермь. – Т. 2. – С. 346–348.

41. Генералов, С.В. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культуральных технологий / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, А.К. Никифоров, О.А. Лобовикова, Л.В. Савицкая, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Т.А. Михеева, М.Н. Киреев // Материалы научно-практической конференции Роспотребнадзора «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения». – 11 апреля 2012, г. Нижний Новгород. – С. 157–159.

42. Матвеева, Ж.В. Концентрирование инактивированной суспензии культурального фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» методом тангенциальной ультрафильтрации / Ж.В. Матвеева, **Е.Г. Абрамова**, А.В. Комиссаров, С.В. Генералов, И.М. Жулидов, А.К. Никифоров // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных». – 23–24 мая 2012, г. Ставрополь. – С. 176.

43. Генералов, С.В. Культуральный антиген в тактике развития технологии получения антирабического иммуноглобулина / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, Л.В. Савицкая, Р.А. Свинцов, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Т.А. Михеева, А.В. Комиссаров // Сборник трудов Международной интернет-конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее». – 17–19 апреля 2012, г. Казань. – С. 60–61.

44. Генералов, С.В. Получение антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади с применением культуральных технологий / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, А.К. Никифоров, Р.А. Свинцов, Л.В. Савицкая, М.В. Галкина, Т.А. Михеева, А.В. Комиссаров // Материалы Международной практической конференции, посвященной

100-летию СГАУ «Биотехнология: реальность и перспективы». – 28–30 января 2013, г. Саратов. – С. 26–28.

45. Генералов, С.В. Роллерное культивирование вируса бешенства «Москва 3253» в культуре клеток Vero / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, И.М. Жулидов, Ж.В. Матвеева // Материалы III международной научной интернет-конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее». – 25–26 марта 2014, г. Казань. – С. 42–43.

46. Генералов, С.В. Масштабированное культивирование фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» на клеточной линии Vero / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов // Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы». – 1–3 декабря 2014, г. Саратов. – С. 117–119.

47. Матвеева, Ж.В. Обнаружение и предупреждение микоплазменной контаминации клеток перевиваемой линии VERO при получении антирабического иммуноглобулина с использованием культуральных технологий / Ж.В. Матвеева, **Е.Г. Абрамова**, С.В. Генералов, А.В. Фадеева, Н.В. Майоров // Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы». – 1–3 декабря 2014, г. Саратов. – С. 174–177.

48. Шарапова, Н.А. Конструирование неферментных диагностикумов с наночастицами золота для определения активности антирабических сывороток в дот-иммуноанализе / Н.А. Шарапова, **Е.Г. Абрамова** // Материалы 19-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – 20–24 апреля 2015, г. Пущино. – С. 54.

49. **Абрамова, Е.Г.** Разработка стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности антирабического иммуноглобулина / **Е.Г. Абрамова**, О.А. Лобовикова, И.В. Шульгина, Л.В. Савицкая, С.В. Генералов, А.Г. Селезнева, И.М. Жулидов, А.В. Комиссаров // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посв. 95-летию со дня рождения акад. РАМН И.Н. Блохиной «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями». – 24–26 мая 2016, г. Нижний Новгород. – С. 116–118.

#### **ОСНОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ**

АИГ – антирабический иммуноглобулин;

ГО – гидроксид алюминия;

ГП – гликопротеид;

ГФ – Государственная Фармакопея;

ДИА – дот-иммуноанализ;

ИЛП – иммунобиологический лекарственный препарат;

КЗ – коллоидное золото;

КРС – крупный рогатый скот;

ЛД<sub>50</sub>/мл – летальная доза для 50 % животных, взятых в опыт;

МЕ – международная единица;

НД – нормативная документация;

ОСО – отраслевой стандартный образец;

ПО – полиоксидоний;

ПР – промышленный регламент;

РН – реакция нейтрализации;

СОП – стандартный образец предприятия;

ФСП – фармакопейная статья предприятия;

ЧСА – человеческий сывороточный альбумин.