

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ
ИНСТИТУТ «МИКРОБ»

На правах рукописи

Абрамова Елена Геннадьевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА
ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук, доцент
Алексей Константинович Никифоров

Саратов – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	25
ГЛАВА 1 АНТИРАБИЧЕСКИЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ: ОТ ПРИВИВКИ ПАСТЕРА К СОВРЕМЕННЫМ БИОТЕХНОЛОГИЯМ.....	25
1.1 Современные особенности распространения бешенства в мире и Российской Федерации.....	25
1.2 Антирабические лекарственные препараты в Российской Федерации и за рубежом: достижения и перспективы	28
ГЛАВА 2 АКТУАЛЬНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ПРОТИВОВИРУСНЫХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	39
2.1 Культуральные технологии в производстве иммунобиологических противовирусных препаратов	39
2.2 Развитие методов очистки, концентрирования и фильтрации полуфабрикатов на биотехнологических производствах	42
2.3 Современные методические подходы к количественному определению вирусов и антител к ним.....	46
2.4 Получение лиофилизированных лекарственных препаратов иммуноглобулиновой природы.....	53
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	67
ГЛАВА 3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	67
3.1 Материалы.....	68
3.1.1 Вирусные и бактериальные штаммы.....	68
3.1.2 Сыворотки и препараты.....	68
3.1.3 Вирусные антигены.....	68
3.1.4 Клеточная линия.....	69
3.1.5 Реактивы, растворы и питательные среды.....	69
3.1.6 Экспериментальные животные	72
3.1.7 Оборудование и приборы	72
3.2 Методы	76
3.2.1 Биотехнологические методы.....	76
3.2.2 Вирусологические методы	77
3.2.3 Микробиологические методы	77
3.2.4 Биологические методы	77
3.2.5 Иммунохимические методы.....	77
3.2.6 Молекулярно-генетические методы.....	79

3.2.7 Биохимические, физико-химические и биофизические методы	82
3.2.8 Статистические методы обработки результатов исследований	84
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	85
ГЛАВА 4 НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ МАСШТАБНОГО ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА ФИКСИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА «МОСКВА 3253» НА КЛЕТКАХ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ VERO	85
4.1 Отработка условий адаптации вируса бешенства «Москва 3253» к клеткам перевиваемой линии Vero	85
4.2 Экспериментальное обоснование оптимальных технологических параметров масштабного культивирования вируса бешенства производственного штамма «Москва 3253» на клетках Vero суспензионным и псевдосуспензионным способами в биореакторе	90
4.3 Экспериментальное обоснование оптимальных технологических параметров масштабного культивирования вируса бешенства производственного штамма «Москва 3253» на клетках Vero роллерным способом	96
4.4 Разработка биотехнологических приемов по очистке и концентрированию вирусного материала.....	102
4.5 Сравнительный анализ эффективности накопления клеток Vero и вируса бешенства «Москва 3253» при масштабном культивировании <i>in vitro</i>	109
4.6 Разработка системы мероприятий по предупреждению контаминации микоплазмами клеточной культуры и готового продукта, полученного с применением культуральных технологий	113
ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО СПОСОБА ОПРЕДЕЛЕНИЯ <i>IN VITRO</i> ФИКСИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА «МОСКВА 3253» В АНТИГЕНСОДЕРЖАЮЩЕМ МАТЕРИАЛЕ	120
5.1 Подбор ДНК-мишени, праймеров и зонда.....	120
5.2 Получение рекомбинантного штамма и набора ПЦР-стандартов для количественной оценки содержания <i>virus fixe</i> «Москва 3253»	125
5.3 Определение содержания вируса бешенства в инактивированном органо-тканевом и культуральном антигенном материале в ПЦР-РВ с использованием разработанных ПЦР-стандартов.....	127
ГЛАВА 6 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ <i>IN VITRO</i> СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНА.....	130
6.1 Отработка технологических приемов выделения гликопротеида из <i>virus fixe</i> культурального происхождения для конструирования антигенного диагностикума с наночастицами коллоидного золота.....	130
6.2 Разработка методических приемов определения активности антирабических сывороток и иммуноглобулина <i>in vitro</i> в дот-иммуноанализе с применением	

диагностикума на основе гликопротеида вируса бешенства и наночастиц коллоидного золота.....	135
6.3 Разработка методических приемов определения титра специфических антител в антирабических препаратах в непрямом дот-иммуноанализе с применением диагностикума на основе белка A <i>Staphylococcus aureus</i> и наночастиц коллоидного золота.....	137
ГЛАВА 7 ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ СЕРИЙ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	140
7.1 Получение антирабических сывороток и иммуноглобулина от продуцентов, иммунизированных культуральным рабическим антигеном	140
7.2 Исследование биологических и физико-химических показателей гетерологичного антирабического иммуноглобулина, полученного с применением культурального антигена, в сравнении с фармакопейными показателями.....	149
7.3 Разработка производственно-технологической документации на получение гетерологичного антирабического иммуноглобулина с применением культуральных технологий	153
ГЛАВА 8 РАЗРАБОТКА МОДУЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ОЧИСТКИ И СТЕРИЛИЗАЦИИ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ФИЛЬТРАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА	159
8.1 Изучение целесообразности применения отечественных фильтров патронного и капсульного типов для осветления, депирогенизации и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина.....	160
8.2 Эффективность внедрения фильтрационной технологии с использованием отечественных фильтров в производство антирабического иммуноглобулина	171
ГЛАВА 9 НАУЧНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОЛУЧЕНИЯ НОВОЙ ФОРМЫ ВЫПУСКА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА – ЛИОФИЛИЗАТА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ВНУТРИМЫШЕЧНЫХ ИНЪЕКЦИЙ.....	173
9.1 Определение эвтектической температуры и исследование тепловых характеристик антирабического иммуноглобулина.....	173
9.2 Влияние лиопротекторов различной природы на качество антирабического иммуноглобулина в лиофилизированной форме	179
9.3 Оптимизация технологических параметров лиофильного высушивания гетерологичного антирабического иммуноглобулина и его F(ab') ₂ -фрагментов.	183
9.4 Эффективность внедрения оптимизированной технологии лиофильного высушивания антирабического иммуноглобулина	195
9.5 Анализ показателей качества лиофилизатов антирабического иммуноглобулина и его F(ab') ₂ -фрагментов	198
9.6 Изучение стабильности лиофилизированного антирабического иммуноглобулина при длительном хранении	204

ГЛАВА 10 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА	207
10.1 Разработка стандартного образца предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади	207
10.2 Исследование молекулярных параметров антирабического иммуноглобулина и обоснование включения раздела «молекулярные параметры» в спецификацию фармакопейной статьи предприятия	210
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	216
ВЫВОДЫ	230
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	232
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	236

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований и состояние проблемы.

Бешенство – опасное природно-очаговое заболевание человека и животных с абсолютной летальностью, возбудителем которого является нейротропный вирус семейства *Rhabdoviridae*, рода *Lyssavirus* [121, 208, 263, 319, 408]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), бешенство занимает 5 место среди инфекционных болезней, наносящих значительный экономический ущерб [553, 554, 555]. 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. По оценке ВОЗ, смертность людей от бешенства ежегодно в мире составляет от 35000 до 70000 человек [217, 555]. ВОЗ совместно с Глобальным альянсом по борьбе с бешенством на конференции, состоявшейся в Женеве в декабре 2015 г. с участием делегатов из 100 стран, поставлена глобальная цель – ликвидировать к 2030 г. смертность людей от бешенства в соответствии с намеченными практическими действиями в данном направлении [271].

В России также отмечается неблагоприятная эпизоотическая ситуация по бешенству, тенденций к улучшению нет [171, 172, 213]. К примеру, в 2015 г. в Московской области зарегистрировано рекордное за 63 года количество случаев бешенства животных (389), больше было только в 1952 г. – 1225 случаев [37]. Бешенство среди животных регистрируется практически во всех федеральных округах России, наиболее неблагоприятными являются регионы Центрального, Приволжского и Южного федеральных округов [187, 408].

Из-за абсолютной летальности бешенства вопросы постэкспозиционной профилактики заболевания имеют исключительно важное значение. Существует единая мировая тактика профилактики заболевания после контакта с бешеными или подозрительными на бешенство животными, заключающаяся в немедленной местной обработке раны с последующим введением концентрированной культуральной антирабической вакцины (КОКАВ), а при укусах опасной локализации – в комбинации с иммуноглобулином антирабическим (АИГ) [134, 135, 489, 555]. Ежегодно в России за антирабической помощью в связи с укусами больных или подозрительных на бешенство животных обращаются свыше 400 тыс. человек, половине из которых назначают специфическое антираби-

ческое лечение [136, 223]. В Государственном Реестре лекарственных средств (ГРЛС) в качестве средств пассивной иммунизации в России зарегистрированы гомологичный антирабический иммуноглобулин (Израиль, Китай), широкое применение которого ограничено в связи с высокой стоимостью, и гетерологичный антирабический иммуноглобулин, производимый РосНИПЧИ «Микроб» (Россия) и ПАО «Фармстандарт-Биолек» (Украина). В настоящее время гетерологичный антирабический иммуноглобулин, выпускаемый РосНИПЧИ «Микроб», является единственным отечественным зарегистрированным лекарственным средством пассивной иммунизации, минимизирующим риск заболевания людей бешенством при укусах опасной локализации. Гетерологичный АИГ, входящий в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения (ЖНВЛП), является самым востребованным иммунобиологическим лекарственным препаратом (ИЛП) в Российской Федерации из всех зарегистрированных отечественных гетерологичных иммуноглобулинов и сывороток против различных бактериальных и вирусных инфекций [41].

До 1999 г. Российская Федерация не располагала собственным производством антирабического иммуноглобулина, 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 антирабического иммуноглобулина. В 1999 г. по поручению Главного государственного санитарного врача РФ (№ 2510/12020-99-26 от 09.11.99 г.) и решению Межведомственной комиссии Совета Безопасности РФ по охране здоровья населения (№ 1 от 24.10.2000 г.) в РосНИПЧИ «Микроб» были начаты экспериментальные разработки по получению антирабического иммуноглобулина, а в 2004 г. институт приступил к серийному выпуску препарата.

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. По данным ВОЗ, частота нежелательных реакций в ответ на введение АИГ животного происхождения составляет 1–2 % [554, 555]. В Российской Федерации, по сведениям Российской базы данных АИС-Росздравнадзор-Фармаконадзор, за последние 7 лет ежегодно регистрируется от 6 до 58 случаев нежела-

тельных 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 [126, 220]. Учитывая, что производство иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб» развернуто 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. Важнейшей научно-практической задачей, способствующей повышению качества гетерологичного АИГ, является внедрение в производство препарата культуральных технологий. На сегодняшний день для иммунизации продуцентов и получения специфической сыворотки используют органо-тканевой 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 вируса бешенства, репродуцированного на клеточных культурах [554, 555]. Производство гомологичного АИГ, осуществляемое в экономически развитых странах, связано с использованием культуральных антирабических вакцин для иммунизации доноров. Что касается гетерологичного АИГ, производимого, помимо России, в развивающихся странах, культуральный рабический антиген применяют при его получении в Турции [447], Индии [346], Таиланде [406]. Надо отметить, что 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 клеточным культурам. Вакцинный штамм *virus fixe* «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 и репродукции на клеточных культурах. Работы в данном направлении были впервые начаты нами в 2009 г. в рамках реализации задач Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)» в направлении совершенствования качества выпускаемых иммунобиологических лекарственных препаратов.

Что касается выбора системы репродукции фиксированного вируса бешенства «Москва 3253», обширный практический опыт вирусологов-рабиологов свидетельствует о преимуществе перевиваемых клеток по сравнению с первичными. Это обусловлено стандартностью биологических свойств клеток, высокой потенцией их роста, возможностью масштабного культивирования [35, 53, 176, 259]. Одной из самых распространенных в производстве антирабических профилактических препаратов считается гетеропloidная перевиваемая линия клеток зеленой мартышки Vero, аттестованная по всем требованиям ВОЗ, и применяющаяся для этих целей уже более 30 лет [283, 391, 526, 545]. Применение в производстве гетерологичного АИГ культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов взамен органо-тканевого антигена направлено на улучшение качества антирабического лечения за счет снижения риска развития нежелательных побочных реакций у пациентов, получающих специфическое лечение для предупреждения бешенства.

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 мышках с определением инфекционной дозы ЛД₅₀ является трудоемким, длительным (не менее 14 сут), предполагает использование большого количества лабораторных животных и патогенного биологического агента (ПБА). В связи с этим актуальны исследования по разработке методических подходов *in vitro*, позволяющих количественно оценить содержание вируса в антигенном материале без использования животных. Использование полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов является одним из альтернативных подходов к количественной оценке вирусов. Использование в производственной практике указанного методического подхода будет способствовать стандартизации получаемых серий культурального рабического антигена, кроме того, преимуществом является возможность исследования инактивированного антигенсодержащего материала. В биотехнологии производства профилактических иммунобиологических препаратов данный подход успешно используется для количественного определения протективного антигена у вакцинных штаммов вирусов краснухи, кори, эпидемического паротита [7, 76], для оценки содержа-

ния антигена Е вируса клещевого энцефалита (КЭ) при культивировании на культуре клеток [141].

В направлении внедрения альтернативных технологий *in vitro* на этапах производства и контроля антирабического иммуноглобулина актуальны исследования, направленные на оптимизацию разработанной в РосНИПЧИ «Микроб» тест-системы с использованием наночастиц коллоидного золота, позволяющей определять в до-иммуноанализе специфическую активность антирабических препаратов [258]. Выделение из *virus fixe* культурального происхождения основного иммуногена – гликопротеида и его использование при конструировании диагностикума и постановке до-иммуноанализа направлено на выявление в исследуемых образцах антител с вируснейтрализующей направленностью, что позволит оценить *in vitro* специфическую активность иммунных сывороток и иммуноглобулина.

Одной из задач, решение которой способствует улучшению качества комбинированного антирабического лечения, является разработка стабильной лекарственной формы, обеспечивающей сохранность спецификационных свойств АИГ при транспортировании и хранении. 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 препарата при несоблюдении температурного режима хранения или транспортирования. Безусловно, разработка технологии получения лиофилизата АИГ обеспечит стабильность данного лечебно-профилактического средства в условиях длительного транспортирования, что актуально для Российской Федерации в связи со значительной протяженностью ее транспортных путей, а также позволит полностью удовлетворить потребность организаций Минздрава Российской Федерации в столь востребованном препарате за счет увеличения срока годности.

Одним из актуальных современных направлений совершенствования технологии производства антирабического иммуноглобулина является переход к использованию на этапах очистки и стерилизации раствора иммуноглобулина 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, разработана уникальная каскадная система очистки и стерилизации раствора антирабического

иммуноглобулина с использованием различных мембранных и глубинных фильтров, главным образом, импортных [164]. В связи с этим представляются актуальными исследования по разработке альтернативной схемы фильтрации с использованием отечественных мембранных и глубинных фильтров и их оценке по следующим критериям: удаление эндотоксина и гемпигмента, пропускная способность и стерильность раствора иммуноглобулина после фильтрации с подбором наиболее подходящих условий для осветления, депирогенизации и стерилизации раствора АИГ.

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 [136]. 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 против указанного Международного стандарта ВОЗ [245]. 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 Российской Федерации высококачественным иммунобиологическим лекарственным средством для постэкспозиционной профилактики бешенства, входящим в перечень ЖНВЛП [168]. 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 [100].

В связи с вышеизложенным, свидетельствующем об актуальности обозначенных нами научных направлений, сформулированы 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')₂-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 ис-

пользованием суспензионного, псевдосуспензионного и роллерного методов. Разработана оригинальная методика 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_{Moscow3253}G-L) для получения 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')₂-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_{Moscow3253}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')₂-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')₂-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 лио-

фильного 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 пост-экспозиционной 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 ФСП 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 вирусосодержащем материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-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 инаktivированной 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» псевдосупернатантным 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 продуцентов 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 следующие основные методы:

- биотехнологические – масштабное культивирование фиксированного *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero суспензионным, псевдосуспензионным и роллерным способами; выделение антирабического гамма-глобулина из иммунной сыворотки продуцентов риванол-спиртовым методом;
- вирусологические – определение титра вируса бешенства с вычислением ЛД₅₀/мл на белых мышах; определение специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в реакции нейтрализации *virus fixe* на белых мышах;
- микробиологические – определение стерильности антирабического иммуноглобулина методом прямого посева на тиогликолевую среду; культивирование рекомбинантного штамма *E. coli* TG1 на агаре LB с добавлением ампициллина;
- биологические – испытания антирабического иммуноглобулина на токсичность на белых мышах и морских свинках; пирогенность на кроликах;
- иммунохимические – определение активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в прямом и непрямом вариантах дот-иммуноанализа с неферментным диагностикумом на основе наночастиц коллоидного золота; оценка свойств культурального вируса бешенства и выделенного гликопротеида в иммуноферментном анализе; определение видоспецифичности иммуноглобулина в реакции диффузной преципитации;
- молекулярно-генетические – оценка содержания вируса бешенства в вирусном материале органо-тканевого и культурального происхождения в полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов; конструирование 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 % полиамилакридном геле для определения молекулярной массы гликопротеида вируса бешенства; метод нековалентной (адсорбционной) конъюгации для конструирования диагностикума на основе гликопротеида с наночастицами коллоидного золота; метод лиофильного высушивания антирабического иммуноглобулина и его F(ab')₂-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 прозрачности 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 (pH);
- статистические – для обработки результатов исследований.

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-производителей, 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')₂-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 болезнями 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» (Оболensk, 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 противоэпидемической 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 дот-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 новой 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. Шараповой, 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» (2005–2009 гг., номер госрегистрации 0120.0504663); 40-2-09 «Оптимизация технологических этапов производства МИБП и разработка новых препаратов для диагностики ООИ» (2009–2014 гг., номер госрегистрации 0120.0853923); 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов» (2014–2016 гг., 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 изда-

ний, 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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1 АНТИРАБИЧЕСКИЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ: ОТ ПРИВИВКИ ПАСТЕРА К СОВРЕМЕННЫМ БИОТЕХНОЛОГИЯМ

1.1 Современные особенности распространения бешенства в мире и Российской Федерации

Бешенство – древнейшая опасная вирусная инфекция зоонозной природы с абсолютной летальностью, возбудителем которой является нейротропный вирус рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae* [18, 52, 123, 306, 550]. Род *Lyssavirus* объединяет 13 генотипов: 1 генотип – вирус классического (уличного) бешенства (RABV), распространенный в Европе, Азии, Северной и Южной Америке; 2 – *Lagos bat* (LBV), циркулирующий среди собак, кошек и плотоядных летучих мышей в Центральной и Южной Африке; 3 – *Mokola* (MOKV), изолированный от человека, собак, кошек и землероек в Центральной и Южной Африке; к 4 генотипу относится вирус *Duvenhage* (DUVV), выделенный от укушенного летучей мышью человека и летучих мышей в Зимбабве и Южной Африке; 5 генотип – лиссавирус европейских летучих мышей типа 1 (EBLV1), циркулирующий в Европе, в т.ч. в европейской части России; 6 генотип – лиссавирус европейских летучих мышей типа 2 (EBLV2), также циркулирующий в Европе; 7 – лиссавирус австралийских летучих мышей, изолированный от людей в Австралии (ABLV); новыми генотипами признаны вирусы Центральной Азии *Khujand* (KHUV) и *Aravan* (ARAV), отнесенные к 8 и 9 генотипам; 10 генотип представлен вирусом *Shimoni bat* (SHIBV) от летучей мыши в Африке; 11 генотип – вирус *Irkut* (IRKV), изолированный А.Д. Ботвинкиным в Восточной Сибири; к 12 и 13 генотипам отнесены вирус летучих мышей Западного Кавказа (WCBV), обнаруженный в Краснодарском крае, и вирус *Vokeloh Bat* (BBLV), выделенный от летучей мыши в Германии [119, 408].

Молекулярно-генетические исследования полевых изолятов вируса бешенства из различных регионов России подтверждают их принадлежность преимущественно к первому генотипу, однако зафиксирована циркуляция лиссавирусов не первого генотипа среди летучих мышей [78, 127, 188, 255, 264].

По данным ВОЗ, ежегодно от бешенства на земном шаре погибает от 35000 до 70000 человек, более 40 % из которых – дети; подавляющее большинство смертей при-

ходится на страны Азии и Африки [554, 555]. Заболевания людей бешенством регистрируются более чем в 150 странах, свободными от данного заболевания являются некоторые островные государства (Япония, Новая Зеландия, Великобритания), ряд стран Северной Европы (Швеция, Норвегия), Антарктида [263]. Есть мнение, что бешенство начало формироваться более 70 млн лет назад в результате эволюционирования вирусов семейства *Rhabdoviridae* и их адаптации в направлении от растений к беспозвоночным, а затем позвоночным животным [217]. Опубликованы данные, что из всего многообразия животных только 4 отряда холоднокровных не подвержены бешенству [16].

По данным ВОЗ, бешенство занимает одно из первых мест среди зоонозных инфекций, наносящих наибольший экономический ущерб [555]. В совокупности наносимый ущерб складывается из потерь от падежа животных; расходов средств на профилактические и карантинные мероприятия; отлов бродячих животных; вакцинацию домашних и диких животных; проведение диагностических исследований; постэкспозиционное лечение пациентов, контактировавших с больными или подозрительными на бешенство животными. Комитет экспертов ВОЗ по бешенству в последнем техническом докладе № 982 (2013 г.) приводит следующие данные: в США ежегодно на борьбу с бешенством вкладывается более 300 млн долларов; в Германии с 1983 по 2008 год было потрачено 122 млн долларов на оральную вакцинацию диких животных, преимущественно лис; во Франции в период с 1988 по 1993 год затраты на постэкспозиционное лечение, превентивную вакцинацию домашних и диких животных составили 261 млн долларов согласно программам, действующим в этих странах [555]. Благодаря действию подобных программ в большинстве стран Западной Европы бешенство среди типичных переносчиков (собак, лисиц) практически не регистрируется [432, 505, 564]. А. Аікімбауев et al., приводя в пример эффективность мер по борьбе с собачьим бешенством в Западной Европе и Латинской Америке, говорят о необходимости проведения подобных мероприятий в регионах Среднего Востока, Центральной Азии и Восточной Европы с напряженной эпизоотологической ситуацией по бешенству [270, 278]. В рамках проекта фонда Билла и Мелинды Гейтс под руководством ВОЗ достигнуты успехи в борьбе с бешенством в Южной Африке, Танзании, на Филиппинах [23, 394].

В последние десятилетия угрозой представляет распространение вируса бешенства среди летучих мышей, данная проблема наиболее актуальна для США, стран Латинской Америки, Канады, некоторых стран Африки [280]. С недавних пор эпизоотии бешенства

в популяциях летучих мышей зафиксированы также в Австралии и государствах Европы: Германии, Дании, Голландии, Испании, Франции, Словакии [217, 477].

Самая сложная ситуация по бешенству на сегодняшний день отмечается в Азии, где основными переносчиками вируса, как и в Африке, являются собаки [281, 416, 421, 449, 509]. Число людей, умерших от бешенства в Азии, достигает до 40 тыс. в год [306, 330, 436, 515]. Весьма впечатляют данные, которые приводит в своем обзоре R. Menezes: в Индии каждые 2 секунды собака кусает человека и каждые 30 мин регистрируется смерть людей от бешенства [420]. Помимо собак, бешенством в Азии болеют коровы, верблюды, свиньи, обезьяны. В связи с развитием туризма в данном регионе нередки случаи нападения больных животных на прибывающих туда иностранных граждан [339]. P. Gautret et al. сообщают о 2697 подобных случаях в период с 1997 по 2012 год на территории Таиланда, Индии, Китая, Непала, Индонезии и рекомендуют туроператорам информировать своих клиентов об эпидемиологических особенностях этих популярных у туристов регионов [340]. Н.Т. Gozdas указывает на необходимость профилактической вакцинации для путешествующих в эндемичных по бешенству странах [351].

На постсоветском пространстве в настоящее время доминируют очаги бешенства природного типа с тенденцией к увеличению их числа в связи с миграцией диких животных и вовлечением в эпизоотии новых видов животных, таких как барсуков, хорьков, рысей, бобров, медведей, лосей, нутрий. Природные эпизоотии бешенства протекают на территориях Беларуси [247], Молдовы, Украины [217], Казахстана [270], Эстонии, Литвы, Латвии [473]. Для Средней Азии и Закавказья, а также юга Казахстана характерно сочетание природных и антропогенных очагов бешенства собак [263].

Антропогенные очаги бешенства регистрируются и на юге Российской Федерации, хотя на эпидемический процесс бешенства в нашей стране в основном оказывают влияние природные очаги [187, 408].

В России ежегодно регистрируется от 839 до 7633 случаев бешенства животных, 34,5 % заболеваний приходится на лис, 18 – собак, 14 – крупный рогатый скот (КРС), 11 – домашних кошек [408]. Наиболее неблагоприятными по бешенству регионами Российской Федерации являются территории Центрального ФО – 36 % случаев бешенства у людей; Южного ФО – 19 %; Приволжского ФО – 16 % и Северо-Кавказского ФО – 13 % [72, 73, 106, 150, 213, 253].

Всего в России за период с 1975 по 2014 год зафиксировано 489 случаев смертей людей от бешенства, что составляет в среднем 12,5 случаев в год [138, 139, 187]. 40,1 % от общего числа смертей вызваны контактами с собаками; 33,3 – с лисами; 13,2 – с кошками; 7 – с волками; 5,5 – с енотами; по 0,4 % – с полярными лисами и коровами [408]. Отмечены 2 случая гибели людей от бешенства после укусов летучих мышей [188].

1.2 Антирабические лекарственные препараты в Российской Федерации и за рубежом: достижения и перспективы

Вирус бешенства передается человеку со слюной больного животного через укус, далее из мышечной ткани, достигнув нервных окончаний, вирус начинает распространяться центростремительно по центральной нервной системе, вызывая острый прогрессирующий энцефалит со смертельным исходом. В зависимости от места укуса, инкубационный период длится в среднем от 15 до 45 сут, а скорость продвижения вируса, по данным S. Gluska et al., составляет около 8 см в день [345]. Способов неспецифического лечения бешенства на сегодняшний день не разработано и при появлении признаков заболевания прогноз для пациента неблагоприятный. Отметим, что в изученной нами литературе имеются сообщения о найденных неспецифических ингибиторах вируса бешенства (вирозол, ремантадин, рифампицин), но в медицинской практике их назначают только в комплексе с иммунобиологическими антирабическими препаратами, как, например, в Беларуси, где рифампицин разрешен МЗ Республики Беларусь для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей и применяется в комплексе с антирабической вакциной на всей территории республики [95].

На сегодняшний день единственным способом предотвратить заболевание бешенством является своевременное введение пациенту антирабических препаратов – вакцины как обязательного компонента и антирабического иммуноглобулина при укусах опасной локализации [124, 137, 549]. По данным ВОЗ, более 15 млн человек в мире ежегодно получают антирабическое лечение, что позволяет предотвращать сотни тысяч случаев смерти от бешенства [23, 555]. В Российской Федерации в связи с укусами и контактами с больными или подозрительными на бешенство животными от 400000 до 450000 человек ежегодно обращаются за медицинской помощью, более половины из них проходит курс постэкспозиционного лечения [136, 408].

Антирабические профилактические препараты, практическую ценность которых невозможно переоценить, прошли длительный путь непрерывного совершенствования.

История вакцинации против бешенства началась в XIX веке, когда выдающийся французский микробиолог Луи Пастер поставил науку о бешенстве на прочную экспериментальную основу и создал методику предупреждения заболевания с помощью антирабических прививок, считающуюся одним из самых великих открытий в области медицины. В лаборатории Пастера путем многочисленных внутримозговых пассажей на кроликах взвеси мозга зараженного животного был получен частично аттенуированный вакцинный штамм вируса бешенства с укороченной и постоянной инкубацией для кроликов – фиксированный вирус. *Virus fixe*, полученный в лаборатории Пастера, является родоначальником многих вакцинных штаммов, используемых в настоящее время в производстве антирабических препаратов, в том числе вируса штамма «Москва 3253», одного из объектов изучения в данной диссертационной работе. Филогенетический анализ G-гликопротеина *virus fixe* «Москва 3253», проведенный в 2013 г. учеными РосНИПЧИ «Микроб», подтверждает происхождение данного штамма от оригинального пастеровского вируса [239].

Вирус Пастера, рекомендованный Комитетом экспертов ВОЗ по бешенству в 1972 г. для производства нервно-тканевых антирабических вакцин, был передан для производства антирабической вакцины во многие страны мира, где в специальных лабораториях он поддерживается методом интрацеребрального заражения кроликов [208, 209]. Оригинальный вирус из института Пастера в Париже остается эталонным вакцинным вирусом. Помимо указанного штамма, для производства антирабических препаратов возможно использовать и другие вакцинные штаммы, такие как Внуково-32, CVS (*Challenge Virus Standard*), PM (*Pitman-Moore*), SAD (*Street Alabama Dufferin*), ERA (*Evelyn Rokitniki Abelseth*), Flury LEP (*low egg passage*), Flury HEP (*high egg passage*), *Kelev*, являющиеся производными как вируса Пастера, так и двух других штаммов вируса бешенства, выделенных в США в 1935 г. из мозга бешеной собаки и в 1939 г. из мозга девочки, погибшей от бешенства [17, 116, 218, 332, 514].

Первые антирабические вакцины типа Ферми [397], приготовленные из мозга овец и других животных, допускали присутствие в них вакцинного вируса, что служило причиной развития осложнений под названием «лабораторное бешенство», поэтому следующим шагом стал выпуск инактивированных вакцин [135, 208, 209]. Наиболее широко в свое время в мировой практике здравоохранения применялась вакцина Семпла на основе инактивированного фенолом *virus fixe* из мозговой ткани кролика [458, 488]. Мозго-

вые вакцины из-за содержания в них миелина нередко вызывали неврологические осложнения у пациентов и для снижения реактогенности был налажен выпуск инактивированных вакцин на основе вируса из мозга новорожденных животных [337, 343], однако и эти вакцины оказались энцефалитогенными [137, 208]. Надо сказать, мозговые вакцины, несмотря на рекомендации ВОЗ отказаться от их производства в связи с имеющимися побочными эффектами, до сих пор используют для профилактики бешенства у людей в некоторых странах Азии, Африки, Латинской Америки [324].

Очередным этапом совершенствования технологии получения антирабических вакцин явилось культивирование фиксированного вируса бешенства в тканях куриных и утиных эмбрионов. В монографии М.А. Селимова данный тип вакцин носит название авианизированных [208]. Адаптация фиксированного *virus fixe* к организму утиного зародыша способствовала разработке и внедрению в медицинскую практику утиной инактивированной антирабической вакцины, которая в свое время достаточно широко применялась для профилактики бешенства в США [363]. Но и этот тип вакцин не оправдал надежд, их применение сопровождалось тяжелыми генерализованными реакциями и осложнениями неврологического характера [223].

Принципиально новым этапом и настоящим прорывом в производстве вакцин явилось получение культуральных антирабических вакцин, чему способствовали успехи в разработке методик культивирования вируса *in vitro* в культуре клеток [277, 490]. Первые культуральные вакцины были получены в конце 60-х годах прошлого века и до сих пор с успехом используются для профилактики бешенства во всем мире. Культуральные вакцины признаны наиболее эффективными и безопасными; тем не менее, в литературе довольно многочисленны сообщения о побочных эффектах после их применения [314, 350, 375, 424]. R. Kumar et al. описывают случаи возникновения нежелательных реакций в виде энцефаломиелитов после введения пациентам культуральной антирабической вакцины Рабипур (Индия), полученной на клетках куриных фибробластов [392]. С.А. Consales et al. приводят данные, что осложнения неврологического характера после вакцинации наблюдаются с частотой 1/500 тыс. пациентов; аллергические реакции регистрируются в 0,11 % случаях (11 случаев/10 тыс. пациентов) [306]. В исследовании T. Sari et al. сообщается о имеющихся побочных реакциях у людей, привитых по показаниям антирабическими вакцинами *Verorab*, полученной на перевиваемой линии Vero, и *Abhayrab*, полученной на диплоидных клетках человека [479]. Авторы указывают на

преимущество вакцины *Verorab*, после применения которой наблюдалось меньше нежелательных реакций.

На сегодняшний день в биотехнологии производства антирабических вакцин вирус бешенства успешно репродуцируют на различных клеточных субстратах, среди которых: диплоидные клетки человека [296, 386, 508]; перепелиные и куриные фибробласты [149, 411, 413]; первичные клетки почки сирийского хомячка (ПСХ) [208, 223]; первичные клетки зародышей свиньи и собаки [452]; перевиваемые клетки почечного эпителия африканской зеленой мартышки Vero [283, 354, 374, 461, 463]; перевиваемые клетки почки сирийского хомячка ВНК-21 [365, 448].

В Российской Федерации производят антирабическую вакцину КОКАВ на основе *virus fixe* вакцинного штамма Внуково-32, репродуцированного в первичной культуре клеток почки сирийского хомячка [135, 208]. Направления в совершенствовании производства имеющихся антирабических вакцин связаны с новыми подходами к селекции вакцинного вируса по количественному уровню экспрессии основного иммуногена вируса бешенства – гликопротеида (ГП) [50, 66, 117, 434]; поиском оптимальных субстратов для культивирования вируса [35] и новых адьювантов [117, 539]; оптимизацией биотехнологических приемов очистки и фильтрации ростовых и поддерживающих сред [146].

В последние десятилетия интенсивное развитие биотехнологии и молекулярной биологии способствовало экспериментальным разработкам вакцин четвертого поколения – генно-инженерных вакцин с заданными свойствами. Разрабатываются вакцины как на основе рекомбинантного вируса бешенства, так и гибридные вакцины, где ген белка G встроен в геном других вирусов. Основной мишенью для модификаций при разработке вакцин на основе рекомбинантного вируса бешенства является гликопротеид, отвечающий за индукцию протективного иммунитета. Существуют два подхода при исследованиях в данном направлении. Создаются инактивированные вакцины на основе вируса бешенства, в геном которого встроены две или три копии гена *gpG*, что усиливает иммунный ответ и увеличивает его продолжительность [387, 404, 514]. Во втором случае разрабатываются живые рекомбинантные вакцины на основе вируса бешенства с мутантной формой G-белка с аминокислотными заменами, в результате которых вирус теряет патогенность при сохранении высокой иммуногенной активности [320, 326]. Живые рекомбинантные вакцины используют для иммунизации животных, приме-

нение их для вакцинации людей маловероятно ввиду опасности возникновения побочных эффектов. Так, C. Rupprecht et al. описывают случай возникновения прогрессирующих болей, эритемы, крупных волдырей, некроза на левом предплечье пациента вследствие случайного контакта с рекомбинантной живой вакциной при благоприятном исходе [476].

Разработка рекомбинантных вакцин на основе вирусных векторов является весьма перспективным направлением. X. Xuan et al. сообщили о создании эффективной антирабической вакцины с использованием герпесвирусов [558]. Для получения вакцин против вируса бешенства с успехом используют и другие системы – вирус осповакцины [212], аденовирусы [522, 557, 565], поксвирусы [272, 543], бакуловирусы [460], экспрессирующие протективный белок G вируса бешенства.

В 2015 г. M. Willet et al. опубликовали данные о конструировании поливалентной рекомбинантной вакцины RABV/EBOV против вирусов бешенства и Эбола на основе инактивированного вируса бешенства с встроенным гликопротеидом вируса Эбола, иммуногенность созданной вакцины подтверждена в доклинических испытаниях на мышах и приматах [552].

Не менее интересным направлением является получение генно-инженерных антирабических вакцин на основе G-белка, синтезируемого в растениях; вирусные антигены попадают в макроорганизм через пищеварительный тракт, индуцируя иммунный ответ [59]. В качестве подобных «биофабрик» используют табак [275], томаты [418], морковь и кукурузу [405]. A. Modelska et al. [427], V. Yusibov et al. [561] сообщают о конструировании рекомбинантного вируса табачной мозаики со встроенными химерными пептидами, соответствующими эпитопам G-белка вируса бешенства. Поедание мышами шпината, пораженного рекомбинантным вирусом табачной мозаики, способствовало выработке у них иммунитета против бешенства [427]. При тестировании «съедобной вакцины» на добровольцах также регистрировали наличие в сыворотке крови вируснейтрализующих антител (ВНА) против бешенства [561]. Трансгенные растения синтезируют G-белок вируса бешенства в количестве до 1 % от общего содержания растительных белков, что позволяет рассматривать данный тип вакцин перспективным для оральной иммунизации.

В обзоре Е.С. Седовой и М.М. Шмарова, посвященном новым антирабическим рекомбинантным вакцинам, приведены данные об использовании вирусоподобных частиц

(ВПЧ) в качестве вакцинных кандидатов, способных индуцировать гуморальный и клеточный иммунные ответы [207]. ВПЧ представляют собой антигенные детерминанты вириона без фрагментов генома, что исключает возможность инфекционного процесса. При разработке ВПЧ, несущих антигены вируса бешенства, основным вопросом является получение с помощью плазмид или вирусных векторов стабильных клеточных линий для выработки целевого продукта, а также введение в состав ВПЧ различных молекулярных адъювантов [207].

Интересны данные о применении для вакцинации животных против бешенства иммуносом, получаемых при использовании очищенного оболочечного белка вируса бешенства – гликопротеида [212]. Иммуносомы (или виросомы) напоминают оболочку вириона без нуклеиновой кислоты. Иммуносомы получают прикреплением очищенного ГП к поверхности липосом, имитируя природную структуру поверхности вириона. Приготовленные таким образом иммуносомы индуцировали строгоспецифичный гуморальный и клеточный ответ и обладали высокой протективной активностью.

Еще одним перспективным направлением в области совершенствования антирабических вакцин можно считать конструирование ДНК-вакцин на основе плазмидного вектора, кодирующего G-белок вируса бешенства; этому направлению посвящены исследования ряда отечественных и зарубежных авторов [48, 240, 324, 445, 516, 530]. Плазмидная ДНК при попадании в организм животного индуцирует выработку в цитоплазме целевого продукта – протективного белка, однако клинические испытания многих вирусных ДНК-вакцин показали недостаточную эффективность иммунного ответа для защиты от вирусных инфекций [328]. В связи с этим проводятся научные исследования по повышению эффективности антирабических ДНК-вакцин, об этом сообщают P.T. Ullas et al. [530], L. Touihri et al. [525].

Для предотвращения заболевания человека бешенством при укусах опасной локализации обязательным является введение специфического иммуноглобулина в комбинации с антирабической вакциной, что является единой тактикой во всем мире [124, 136, 140, 209, 210, 348, 349]. В результате комбинированного постэкспозиционного лечения происходит формирование пассивного иммунитета против бешенства за счет введения специфических антител до начала проявления активного иммунитета в ответ на введение вакцины. Эффективность комбинированных прививок была показана еще в начале XX века, когда в СССР, Индии и Румынии были получены данные по снижению заболе-

ваемости бешенством людей, укушенных больными животными, при назначении им антирабической сыворотки в комбинации с вакциной [208]. Однако недостаточно высокий уровень защитных антител в сыворотке и высокая реактогенность, сопряженная с большими объемами вводимой сыворотки, не позволили обосновать целесообразность внедрения комбинированного метода в практику здравоохранения. Дальнейшие исследования были направлены на получение очищенной и концентрированной сыворотки с более высоким титром вируснейтрализующих антител. В СССР в Московском институте вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова в 50-х годах прошлого века М.А. Селимов с соавт. разработали технологию получения концентрированной лошадиной антирабической сыворотки, успешно прошедшей испытания в опытах в Иране по программе ВОЗ, что способствовало признанию комбинированного способа лечения [489]. К этому же периоду относятся исследования М.А. Селимова с соавт. по выделению из антирабической сыворотки гамма-глобулина, характеризующегося более выраженным лечебным эффектом по сравнению с сывороткой [208]. Гетерологичный АИГ с 70-х годов прошлого века успешно применяется в мировом здравоохранении в схеме комбинированного постэкспозиционного лечения, а современные методы очистки и фильтрации, используемые при его производстве, способствуют снижению риска развития нежелательных побочных реакций у пациентов до 1–2 % [370, 371, 437, 555]. К примеру, в середине XX века частота возникновения поствакцинальных осложнений в ответ на введение иммуноглобулина животного происхождения составляла в среднем 46 % [381], а в конце 80-х годов – 6 % [547, 548]. На сегодняшний день в Российской Федерации ежегодно регистрируются от 6 до 58 случаев нежелательных побочных реакций на введение гетерологичного АИГ, что говорит о том, что технология производства данного лекарственного препарата нуждается в усовершенствовании с целью снижения поствакцинальных осложнений у пациентов, получающих антирабическую помощь [126, 169, 220]. Руководитель Федерального Центра по борьбе с бешенством, профессор А.А. Мовсесянц, рассматривая вопрос применения гетерологичного АИГ, указывает на перспективные направления совершенствования комбинированной профилактики бешенства в Российской Федерации, среди которых – использование для иммунизации продуцентов концентрированного очищенного культурального антигена и совершенствование методов контроля коммерческих серий АИГ за счет расширения перечня контролируемых показателей, в частности, показателей «осмолярность» и «молекулярные параметры» [136].

На сегодняшний день в мировом здравоохранении для предупреждения заболевания людей бешенством наряду с гетерологичным АИГ применяют гомологичный иммуноглобулин на основе сыворотки крови человека, иммунизированного антирабической вакциной [554, 555]. Гомологичный иммуноглобулин отличается хорошей переносимостью, низкой частотой поствакцинальных осложнений и применяется преимущественно в развитых странах. В развивающихся странах спрос на гомологичный АИГ, несмотря на преимущества его использования при комбинированном лечении, ограничен высокой стоимостью и небольшими объемами препарата, связанными с трудностями иммунизации волонтеров-доноров [549, 555]. По этим же причинам отсутствует масштабное производство гомологичного АИГ в Российской Федерации, где весьма сложная эпизоотологическая обстановка по бешенству влечет за собой большое количество обращающихся за антирабической помощью и, следовательно, значительную ежегодную потребность в препарате. В отечественной литературе имеются сообщения о разработке экспериментального антирабического иммуноглобулина из крови человека сотрудниками НПО «Иммунопрепарат» (г. Уфа) [260].

Для снижения частоты нежелательных побочных реакций на введение гетерологичного АИГ предлагаются усовершенствованные технологии очистки препарата [214, 215, 294, 344, 362, 395, 412]. К настоящему времени в мировой и отечественной биотехнологической практике, в том числе в институте «Микроб», разработаны технологии получения высокоочищенного гетерологичного антирабического иммуноглобулина на основе $F(ab')_2$ -фрагментов с низкими анафилактогенными свойствами [42, 165, 487]. За рубежом препарат на основе $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина *Favirab* эффективно применяют для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей на Филиппинах, о чем сообщают В.Р. Quiambao et al. [462].

Одним из направлений совершенствования качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина является применение для иммунизации животных-производителей антигена на основе культурального вируса [136]. S.K. Goel et al. описывают способ получения антирабической сыворотки от лошадей с применением в качестве антигена культуральных вакцин из клеток куриных эмбрионов *Rabipur* (Индия) и *PVRV* (Франция) на основе *virus fixe*, репродуцированного на перевиваемых клетках Vero [346]. Авторы указывают на преимущество использования культуральных вакцин по сравнению с вирусной мозговой суспензией, позволяющих получать сыворотки с высо-

ким уровнем защитной активности. Применение культурального рабического антигена в серийном производстве АИГ в Таиланде описывают Т. Luekrajan et al. [406]. Как подчеркивают авторы, активность АИГ, получаемого с применением культуральных технологий, составляет не менее 200 МЕ/мл, что отвечает требованиям ВОЗ. В работе О. Ozkan et al. авторы предлагают вводить культуральный антиген внутрикожно вместо подкожного способа, что способствует увеличению титра антител в сыворотке крови лошадей [447].

Х. Liu et al. придерживаются мнения, что замена продуцентов-лошадей при получении антирабических гетерологичных сывороток на животных других видов позволит снизить реактогенность конечного продукта – специфического иммуноглобулина [403]. Авторами получен препарат кроличьего АИГ со сниженной реактогенностью, который может стать альтернативой лошадиному АИГ и гомологичному АИГ, практически недоступному для населения в развивающихся странах. Использование других видов животных для получения активных антирабических сывороток описано в работах Н.П. Ситник с соавт. [215], В.В. Недосекова с соавт. [153], Е.-R. Redvan et al. [467]. Японские ученые Y. Motoi et al. получили ВНА из желтка кур, иммунизированных рекомбинантным штаммом *E. coli*, продуцирующим ГП вируса бешенства [430].

Х. Дуглас и Д. Бернхард [63], А.В. Bakker et al. [279], L. Both et al. [293], P. De Benedictis et al. [315], Т. Nagarajan et al. [433], J. Goudsmit et al. [347] опубликовали данные о принципиальной возможности использования моноклональных антител (МКА) для постэкспозиционной профилактики бешенства. В исследовании L.S. Girard et al. рассмотрен вопрос получения человеческих моноклональных антител (МКА) против вируса бешенства на клеточной культуре растительного происхождения [342].

В изученной литературе вызывают интерес работы, связанные с использованием методов генной инженерии при получении антител к вирусу бешенства с нейтрализующей активностью и их фрагментов [321, 322, 400, 465, 494, 527, 541].

В работах отечественных ученых С.В. Беневоленского с соавт. [21], П.Г. Свешникова с соавт. [203], Т.П. Ягудина [268] изложены подходы к конструированию гуманизированных антигенсвязывающих Fab-фрагментов против вируса бешенства. Российский рабиолог С.В. Грибенча высказывал мнение, что оптимальными для пассивной иммунизации людей могут являться гуманизированные МКА против ГП вируса бешенства, не вызывающие анафилактических реакций [49]. Несмотря на успехи в данном

направлении, широкое практическое применение МКА против бешенства на сегодняшний день отсутствует.

В последние десятилетия активно развивается область молекулярной иммунобиотехнологии, связанной с получением и использованием наноантител [20, 235, 532]. Наноантитела – уникальный класс полнофункциональных антител размером 2×4 нм, состоящих исключительно из тяжелых цепей и присутствующих в норме наряду с обычными антителами в крови у представителей сем. *Camelidae* (Верблюдовые), а также у некоторых видов хрящевых рыб – скатов и акул [497]. Преимуществами наноантител являются их способность за счет малых размеров проникать в труднодоступные органы или ткани организма, стабильность, низкая иммуногенность, что указывает на перспективу их использования в иммунотерапии множества заболеваний, в том числе вирусных. А.С. Вятчанин с соавт. предлагают использовать модифицированную процедуру фагового дисплея для повышения эффективности селекции антигенсвязывающих доменов наноантител [39]. С.В. Тиллиб с соавт. сообщает о получении тримеризованных однодоменных антител, специфически связывающихся с ГП вируса бешенства и нейтрализующих вирус бешенства [236].

Недостатками препаратов нового поколения являются недостаточно высокий уровень специфической активности, небольшие объемы выхода целевого продукта, сложные технологии получения и контроля, влияющие на конечную стоимость препарата.

Таким образом, в направлении поиска современных эффективных антирабических препаратов ведутся активные исследования, в том числе с привлечением методов молекулярной иммунобиотехнологии. Однако несмотря на современные достижения молекулярной биологии и генной инженерии, практическое применение препаратов нового поколения сегодня рассматривается только как перспектива.

Очевидно и то, что потребность в препаратах для постэкспозиционной профилактики бешенства не имеет тенденции к снижению, что обусловлено неблагоприятной эпизоотологической обстановкой по бешенству практически на всех континентах земного шара. Средствами пассивной иммунизации для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей, разрешенных к применению ВОЗ, являются гомологичный антирабический иммуноглобулин, не всегда доступный населению в развивающихся странах в связи с его высокой стоимостью, и гетерологичный иммуноглобулин, применение которого сопряжено с риском возникновения анафилактикоидных реакций в 1–2 % случаев. В

связи с этим исследования, направленные на усовершенствование качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина, являются актуальными в силу необходимости оказания антирабической помощи достаточно большому количеству людей.

ГЛАВА 2 АКТУАЛЬНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ПРОТИВОВИРУСНЫХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

2.1 Культуральные технологии в производстве иммунобиологических противовирусных препаратов

Разработка способов культивирования соматических клеток вне организма на искусственных питательных средах открыла новую эру в биотехнологии производства иммунобиологических препаратов противовирусной природы. Клеточные культуры используются при производстве ряда противовирусных вакцин (антирабической, гриппозной, цитомегаловирусной, коревой, герпетической, гепатитной и др.) [130, 131, 181]. Отечественная антирабическая культуральная вакцина, применяемая для профилактики бешенства у человека, выпускается с 1974 г. в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов (г. Москва) и с 1976 г. в НПО «Иммунопрепарат» (г. Уфа) [136]. В 1962 г. Томский НИИ ВС (ныне НПО «Вирион») начал выпуск вакцины против КЭ на основе репродуцированного в культуре клеток вируса, которая пришла на смену реактогенной мозговой вакцине [25]. Особенностью разработки томских ученых являлось использование для репродукции вируса КЭ фибробластов эмбриона курицы, культивируемых в монослое и во взвеси. М.П. Гаврилова с соавт. сообщают о разработке технологии получения препарата для первичной вакцинации против натуральной оспы двухэтапным методом «ОспаВир» на основе культурального вируса [40].

При изготовлении противовирусных иммунобиологических препаратов важным моментом является изучение чувствительности различных клеточных линий к определенным вирусам. В исследовании Р.Я. Подчерняевой с соавт. суммированы результаты по изучению данной проблемы и указаны культуры клеток, чувствительные к разным типам вирусов [184]. Кроме этого, авторы указывают на необходимость постоянного мониторинга клеточных линий на наличие контаминантов, наиболее актуальными из которых являются микоплазмы и вирус бычьей диареи [57, 185, 241]. Об актуальности разработки системы контроля за микоплазменной контаминацией культур клеток, используемых для производства иммунобиологических препаратов, говорится в обзоре В.М. Чернова с соавт., посвященном изучению особенностей микоплазм [251].

В производство антирабических препаратов культуральные технологии начали внедряться с середины прошлого века, о чем уже было упомянуто выше. В литературе описаны способы репродукции вакцинных штаммов вируса бешенства *in vitro* с использованием различных клеточных субстратов: первичнотрипсинизированных и перевиваемых клеток ПСХ [81, 380, 393, 423], перепелиных и куриных фибробластов [149, 411], диплоидных клеток человека [296], клеток зародышей собаки, свиньи [452], почек сайги (ПС) [53], перевиваемых клеток почечного эпителия зеленой мартышки Vero [259, 311, 391].

При сравнительном изучении чувствительности различных клеточных систем к вирусу бешенства показано преимущество перевиваемых клеток в качестве клеточного субстрата по сравнению с первичными клетками. Так, в конце шестидесятых годов XX века Р. Lеріne и Р. Атанасіu предложили иммунизировать продуцентов антирабической сыворотки вирусом бешенства, репродуцированным на первичной культуре ПСХ [128]. Однако культуральный вирус бешенства, репродуцированный на клеточной культуре, накапливался в меньшем титре и уступал по иммуногенности органо-тканевому вирусу из мозгового субстрата, поэтому для получения активных сывороток требовалось введение больших доз рабического антигена, что приводило к образованию низкоаффинных антител, или введение продуценту живого вируса [90].

Способ получения лошадиной антирабической сыворотки, предложенный С.А. Consales et al., оказался более эффективным [308]. Авторы использовали *virus fixe*, репродуцированный на перевиваемых клетках почек сирийского хомячка ВНК. Применение перевиваемых клеточных линий способствовало получению вирусосодержащего материала в больших количествах и с более высокой инфекционной активностью. Использование культурального антигена способствовало сокращению объема иммунизирующей дозы и ускорению накопления специфических антител в крови продуцентов.

Бесспорными преимуществами перевиваемых линий перед первичными клетками являются высокая потенция роста клеток, стандартность биологических свойств, а также возможность крупномасштабного реакторного культивирования.

Перевиваемая клеточная линия ВНК была использована М.В. Бабкиным с соавт. для получения активной овечьей антирабической сыворотки при комбинированной иммунизации, предусматривающей поочередное введение мозгового и культурального рабического антигена на основе *virus fixe* штамма «Щелково-51С» [15]. Использование

указанного метода позволило получить более активную сыворотку по сравнению с предложенным ранее способом, предусматривающим применение органо-тканевого антигена [153].

В настоящее время весьма востребована для биотехнологических целей перевиваемая клеточная линия Vero, которая оказалась наиболее чувствительной к целому ряду ДНК- и РНК-содержащих вирусов [181, 186, 496]. Преимуществом данной клеточной линии можно считать отсутствие у нее онкогенных свойств, что важно при производстве биофармпрепаратов [452, 475]. Клеточная линия Vero успешно используется за рубежом для производства вакцин против бешенства, японского энцефалита, полиомиелита. В Российской Федерации линия Vero, охарактеризованная согласно требованиям ВОЗ [237], разрешена для производства иммунобиологических препаратов [86, 144, 186]. В частности, линия Vero применяется для получения первой отечественной противогерпетической вакцины «Витогерпавак» [184]. Ю.Х. Хапчаев опубликовал результаты о возможности использования линии Vero для псевдосуспензионного культивирования вируса КЭ штамма Софьин, при котором в клетках происходит стабильно высокое накопление вирусного антигена [248].

На сегодняшний день в биотехнологии производства отечественной антирабической вакцины для иммунизации людей КОКАВ применяют первичнотрипсинизированные клетки почек сирийского хомяка. Отечественными исследователями разработаны экспериментальные технологии производства культуральной антирабической вакцины на клеточной линии Vero [35, 259]. В исследовании Н.П. Ситник с соавт. установлено, что использование культурального *virus fixe*, репродуцированного на перевиваемых клетках Vero, позволяет получать более активную сыворотку, чем при использовании вируса, культивированного на первичных клетках ПСХ [216]. Авторы предложили использовать *virus fixe* штамм Внуково-32, репродуцированный на перевиваемых клетках Vero, для иммунизации животных при получении экспериментального гетерологичного АИГ для внутримышечного и внутривенного введения.

Таким образом, перевиваемая клеточная линия Vero является наиболее перспективной клеточной системой для изготовления рабического антигена и использования в биотехнологической схеме производства гетерологичного АИГ на этапе получения иммунных сывороток от продуцентов.

2.2 Развитие методов очистки, концентрирования и фильтрации полуфабрикатов на биотехнологических производствах

Производство иммунобиологических противовирусных препаратов представляет собой сложный многостадийный процесс, важное место в котором занимают методы очистки, разделения, концентрирования и стерилизации биологических растворов.

Первые исследования по очистке и концентрированию *virus fixe* были проведены с вирусосодержащими суспензиями из ткани мозга зараженных животных. С этой целью применяли осаждение вируса метанолом [510] и ионообменные смолы [431, 483]. Р. Atanasiu et al. для очистки вируса использовали высокоскоростное центрифугирование при 140 тыс. г [276]. Данный подход обеспечил повышение инфекционности вируса, но не позволил добиться высокой степени очистки вируса из-за высокого содержания балластных белков.

С внедрением в биотехнологическую практику культуральных технологий встал вопрос разработки способов очистки и концентрирования культурального вируса, поскольку зачастую практики-биотехнологи сталкиваются с проблемой недостаточно высокой концентрации вирусов в исходной культуральной жидкости [26, 108]. Были предложены способы очистки вируса бешенства ультрацентрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия [151, 500], комбинированное осаждение вируса бешенства ацетатом цинка с градиентным центрифугированием [484], очистки и концентрирования вируса с использованием геля фосфата алюминия и полиэтиленгликоля (ПЭГ) [111]. Отметим, что обработка вирусов ПЭГ не изменяет их липопротеиновую природу, в связи с чем, ПЭГ довольно широко применяется для очистки и концентрирования вирусов [5, 111, 426]. Т.В. Акинъшиной опубликованы результаты исследований по очистке и концентрированию вируса бешенства комбинацией различных способов: осаждением ПЭГ, абсорбцией-элюцией на геле фосфата алюминия, высокоскоростным и равновесным центрифугированием в градиенте плотности сахарозы [2].

Надо сказать, метод высокоскоростного центрифугирования играет важную роль в вирусологии, именно этот подход впервые позволил получить очищенные препараты вирусов, и до настоящего времени ультрацентрифугирование достаточно широко используется на биотехнологических производствах. Для концентрирования культурального вируса бешенства предложено равновесное ультрацентрифугирование на подушке

сахарозы (55 %), хлористого цезия (22 %) и глицерина (80 %) при 161 тыс. g в течение 4 ч, что позволило получить высокоочищенный на 99,99 % вирус [51]. Однако нельзя не отметить и принципиальные недостатки метода ультрацентрифугирования: дороговизна центрифужного оборудования, значительная энерго- и трудоемкость при использовании больших объемов культуральной жидкости, жесткие требования по обеспечению биологической безопасности. В связи с этим в последние десятилетия при совершенствовании биотехнологических схем производства противовирусных иммунобиологических препаратов одной из тенденций является переход от методов очистки вирусов путем ультрацентрифугирования к более рентабельным и технически простым процедурам. Так, описаны технологические разработки по очистке и концентрированию вирусов с использованием гель-фильтрации и адсорбционной хроматографии на макропористых кремнеземах [77, 93]. Применение адсорбционной хроматографии позволяет совмещать этапы очистки и концентрирования вирусов, что можно считать важным преимуществом адсорбционного метода [389]. К недостатку указанного способа можно отнести предварительную отработку условий хроматографии, что зачастую представляет определенную сложность. Гель-фильтрация с использованием немодифицированных носителей, в отличие от адсорбционной хроматографии, не предусматривает предварительную отработку условий очистки. Недостатком гель-фильтрации является сохранение, а иногда увеличение исходного объема вирусной суспензии, что требует проведение дополнительного этапа концентрирования. Для решения этой проблемы сотрудники Института кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН (г. Москва) разработали и предложили для использования в биотехнологии ядерные (трековые) фильтры, представляющие собой тонкие пленки (5–10 мкм) из лавсана с пористой структурой с контролируемым диаметром отверстий и их густоты [4, 147]. Технология изготовления подобных мембран включала облучение пленок тяжелыми ионами с последующим травлением щелочью. С.Ю. Ключник с соавт., Б.В. Мчедлишвили с соавт. предложили универсальную технологию очистки и концентрирования вирусов, применимую для рабдовирусов, парамиксовирусов, ортомиксовирусов, тогавирусов [93, 94, 148]. Для предфильтрации вирусных суспензий авторы применили микрофильтрацию с использованием ядерных мембран с диаметром пор 0,5–1,8 мкм с последующим концентрированием на мембранах 0,03–0,09 мкм в сочетании с хроматографией на модифицированных макропористых кремнеземах.

А.А. Епачинцев с соавт. опубликовали результаты исследований по оптимизации очистки вирусосодержащей жидкости с помощью гель-фильтрации на макропористом стекле GLY-600-CPG при производстве вакцины против КЭ [71].

Для концентрирования вируса бешенства из вирусосодержащей жидкости разработаны мембранные технологии, такие как концентрирование с помощью универсальной мембраны на основе ацетата целлюлозы АЦ-300, позволяющей концентрировать вирус до 400 раз [45, 52]. Установлено, что при использовании мембран АЦ-300 потери вируса составляют не более 5 % при стократном концентрировании [249].

С.А. Гринь приводит результаты испытаний ряда методов, разработанных для очистки и концентрирования культурального вируса бешенства, среди которых – осаждение вируса ПЭГ с молекулярной массой 1000, 3000, 6000 и 20000 Да в различных концентрациях; ультрафильтрация с использованием полупроницаемых мембран с различной степенью пористости, позволяющая работать с большим объемом вирусосодержащей жидкости и минимизировать необходимость в использовании дорогостоящего оборудования [51].

Одним из перспективных направлений, применяемых в технологиях концентрирования биологических жидкостей, является их концентрирование тангенциальной («кросс-флоу») ультрафильтрацией. Данный метод становится все более востребованным при производстве лекарственных препаратов благодаря экономичности и бережной обработке фильтруемого продукта [30, 97]. По сравнению с традиционной тупиковой фильтрацией, когда удаляемые частицы образуют на поверхности мембраны слой, что снижает эффективность процесса, фильтрация «кросс-флоу» позволяет повысить производительность операции за счет того, что направления подачи продукта и фильтрации перпендикулярны друг другу [74]. За счет разницы направлений часть фильтруемого раствора проходит через мембрану как фильтрат, а основная часть потока возвращается в фильтрующий контур из рабочей емкости. Такой режим способствует самоочищению фильтрационного модуля, что увеличивает срок его эксплуатации. Преимуществом фильтрации «кросс-флоу» является то, что при правильно подобранном размере пор мембранного модуля можно практически без потерь концентрировать целевой продукт с различной молекулярной массой [97, 262]. В литературе описан процесс концентрирования фиксированного вируса бешенства ультрафильтрацией при получении гетерологичной антирабической сыворотки с использованием в качестве антигена

virus fixe штамма Внуково-32, репродуцированного на культуре перевиваемых клеток Vero или на первичной культуре клеток ПСХ, однако авторы не указывают величину номинальной отсечки по молекулярной массе используемых модулей [215]. S. Jagannathan et al., R.Z. Mendonça et al. указывают на возможность использования тангенциальной фильтрации для концентрирования *virus fixe* в производстве антирабической вакцины на основе вируса бешенства, репродуцированного на культуре клеток Vero [372, 373, 419]. Учитывая вышесказанное, можно заключить, что способ тангенциальной ультрафильтрации является весьма перспективным для использования на практике при очистке и концентрировании культурального вируса бешенства при получении рабического антигена для иммунизации животных.

Изготовление лекарственных препаратов иммуноглобулиновой природы подразумевает этапы очистки и стерилизации труднофильтруемых белковых растворов с помощью баромембранных процессов, где особое внимание уделяется качеству и эффективности фильтрационных материалов [205]. Традиционно для этих целей биотехнологами применяются высококачественные мембранные и глубинные фильтры зарубежного производства брендов Pall, Millipore, Sartorius, CUNO (3M Company) наряду с отечественными фильтрами «Технофильтр», «Владисарт» и «ЭкспрессЭко» [98, 105, 108, 158, 231, 232].

В последние годы значительно расширилась линейка фильтрационных материалов, предлагаемых отечественными производителями; кроме того, ужесточены требования к качеству выпускаемой продукции, что находит отражение в валидационной документации на предприятиях-изготовителях [11, 229]. Для повышения эффективности процессов очистки биологических растворов производители фильтров предлагают разнообразные модифицированные материалы, способствующие более глубокой очистке и удалению бактериальных эндотоксинов из фармацевтических растворов [114, 159, 206, 228, 230]. В связи с этим проблема перехода на использование отечественных фильтроматериалов без ущерба качеству выпускаемой продукции вполне решаема для российских производителей лекарственных средств. В настоящем исследовании в соответствующей главе представлены результаты решения данной задачи при промышленном выпуске АИГ.

2.3 Современные методические подходы к количественному определению вирусов и антител к ним

При культивировании вирусов применяют различные методы их количественной оценки. Количество вирусов можно выявить по локальным повреждениям в зараженных культурах клеток и на хорион-аллантаической оболочке куриных эмбрионов, при этом количество вируса выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ), оспообразующих единицах (ООЕ) [75, 238]. Использование указанных методов затруднено при высокой концентрации вируса в исследуемом материале, когда имеет место слияние бляшек, недостатком является трудоемкость и длительность [238]. В вирусологической практике широко используется метод определения титра вируса в единицах 50 % инфекционного действия, когда за единицу количества вируса принимается доза, способная вызвать инфекционный эффект у 50 % зараженных животных [128, 423]. Однако метод титрования вирусов *in vivo* трудоемкий, длительный, подразумевает использование лабораторных животных. К тому же не всегда более высокая доза вируса вызывает и более высокий инфекционный эффект, что обусловлено индивидуальной чувствительностью животных. Титр вирусов можно выражать в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ) при использовании метода, основанного на агглютинирующей способности вирусов в отношении эритроцитов определенных видов животных [238]. Однако данный метод применим только к гемагглютинирующим вирусам. Вышеописанные методы количественной оценки содержания вирусов основаны на воздействии живого вируса на биологические клетки и ткани и не подходят для количественной оценки вируса в инактивированном материале.

Анализ литературы подтверждает достаточно широкое применение иммуноферментного анализа (ИФА) для определения активности субстанций, содержащих вирус бешенства, в том числе антирабических вакцин [69, 250, 252]. Л.Ф. Еникеева с соавт. опубликовала данные по изучению в ИФА специфической активности вируса бешенства при культивировании в перевиваемых клетках Vero [69]. Е.М. Цетлин с соавт. и С.М. Чернов с соавт. предлагают использование ИФА для оценки специфической активности антирабических вакцин [250, 252].

Использование ИФА для оценки репродукции вируса бешенства обосновано сокращением времени исследования, этот метод приемлем для работы с инактивирован-

ным материалом и соответствует рекомендациям ВОЗ по замещению методов с использованием животных методами *in vitro* [555].

Альтернативным подходом к количественной оценке вирусов в инактивированном материале является использование ПЦР [385]. В литературе описано применение ПЦР с целью выявления РНК вируса бешенства в материале от человека и животных [289, 359, 480, 481, 536].

С момента развития ПЦР анализ результатов реакции проводили с помощью гелеэлектрофореза по окончании реакции. Однако такой метод учета результатов не позволял количественно измерить содержание ДНК-матрицы в исследуемом образце. В 90-х годах XX столетия было предложено регистрировать накопление ДНК непосредственно в ходе ПЦР и использовать данный метод для количественного определения исходного числа вирусных частиц, что делает подход более точным и существенно упрощает технику измерения [360, 361]. Количественная ПЦР-РВ, которую в свое время называли кинетической ПЦР, позволяет не только одномоментно детектировать и определять выход продукта реакции после каждого цикла амплификации, но и рассчитать относительную концентрацию субстрата на основании анализа стандартной кинетической кривой, построенной по полученным данным [197].

В ходе ПЦР-РВ для детекции продукта используют различные красители-флуорохромы, уровень флуоресценции которых прямо пропорционален количеству амплифицированной ДНК [551]. Исследователи разработали несколько подходов для детекции продукта амплификации в ходе ПЦР-РВ. Первый подход заключается в использовании интеркалирующих флуоресцентных красителей, уровень флуоресценции которых значительно возрастает при их специфическом связывании с молекулами двуцепочечной ДНК. В качестве таковых применяют бромистый этидий, YOYO [443, 504], SYBR Green I, YO-PRO-1 [367], SYBR Gold и другие [382, 429]. SYBR Green I является наиболее распространенным красителем для ПЦР-РВ [197]. Применение интеркаляторов считается удобным и сравнительно недорогим вариантом, однако недостатком данного подхода является недостаточная специфичность реакции за счет того, что интеркалирующие красители одинаково эффективно выявляют накопление любой двуцепочечной ДНК [31, 160, 197]. При использовании интеркаляторов исследователи предлагают подтверждать специфичность продукта ПЦР с помощью кривых плавления, подразумевая,

что фрагменты ДНК различных составов и длины будут плавиться при разных значениях температуры [197, 472].

Второй способ детекции результатов ПЦР-РВ подразумевает использование флуоресцентно меченых гибридизационных зондов, среди таких технологий наиболее популярны TaqMan и Molecular Beacons. Система TaqMan, характеризующаяся высокой специфичностью и простотой, представляет собой олигонуклеотид, меченый флуорохромом на одном конце и гасителем флуоресценции на другом. Меченый зонд при отжиге праймеров связывается с комплементарным участком ДНК с 5'-конца флуорофором, а с 3'-конца – гасителем флуоресценции. На стадии элонгации ДНК-полимераза синтезирует комплементарную ДНК и, дойдя до гибридизованного с зондом участка, начинает его расщеплять за счет 5'-эксонуклеазной активности, обуславливая тем самым повышение уровня флуоресценции в реакционной смеси за счет разделения флуоресцентных меток. С каждым циклом ПЦР интенсивность сигнала увеличивается пропорционально наработке ампликонов [70]. Данная технология широко применяется для количественной оценки уровня транскрипции в отдельных клетках, при детекции патогенов вирусной и бактериальной природы, в диагностике генетических заболеваний [31].

Технология Molecular Beacons основана на использовании так называемых шпильчатых нуклеотидов со спаренными концевыми последовательностями, на которых располагают флуорофор и гаситель флуоресценции [528, 529]. При гибридизации с ампликоном шпилька «раскрывается», что способствует разобщению флуорофора и гасителя и увеличению уровня флуоресценции [290, 415, 425]. Недостатком данной технологии является необходимость конструирования пробы с правильной конформацией шпильки, так как флуорофор и гаситель должны располагаться в непосредственной близости друг от друга.

A. Solinas et al. и ряд других авторов предложили вариант аналогичных праймеров с расположенным на отдельном дополнительном олигонуклеотиде гасителем [284, 503, 518, 544]. Технология получила название Scorpion за счет «выброса» данного олигонуклеотида во время раскрытия шпильки подобно хвосту скорпиона. При отжиге флуорофор и гаситель пространственно расходятся, что ведет к увеличению интенсивности флуоресценции.

В литературе описаны и другие подходы для детекции результатов ПЦР-РВ [24, 287, 317, 396, 531], однако наибольшее практическое применение имеют вышеописанные.

Использование ПЦР-РВ позволяет дать количественную оценку содержания ДНК/РНК инфекционных агентов в исследуемом материале, достоинствами метода являются автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. Применение ПЦР-РВ на биотехнологических производствах актуально на этапах получения вирусных антигенов, как, например, при производстве вакцины против КЭ. О.В. Морозова с соавт. описывают применение ПЦР-РВ для оценки динамики накопления вируса КЭ при культивировании на различных линиях клеток [141]. Преимущество ПЦР-РВ заключается в минимизации вероятности контаминации и получения ложноположительных результатов из-за отсутствия стадии электрофореза.

Поскольку ПЦР-РВ сама по себе не является количественной, необходимы ПЦР-стандарты для подсчета количества матрицы в образце, определения эффективности реакции и учета потерь. Исследователи применяют либо абсолютное определение количества копий с использованием стандартных образцов, когда требуется сравнить данные, полученные в различные дни или в различных лабораториях, либо относительное определение, когда необходимо сравнить два или несколько образцов в одном эксперименте. Предпочтение отдается первому подходу, поскольку его результаты базируются на постоянных величинах и выражаются в определенных стандартных единицах [451]. Абсолютное определение основано на построении стандартной кривой, отражающей линейное соотношение между пороговым циклом (СТ) и исходным количеством копий ДНК или РНК, с использованием серии разведений стандартных образцов с известной концентрацией молекул-мишеней. Известно несколько способов получения количественных стандартов, среди которых применение инфекционных образцов, идентичных исследуемым, с определенным методом электронной микроскопии количеством вирусных частиц [485]; разработка химерных конструкций, полученных путем введения в геном стандартного лабораторного вируса амплифицируемого фрагмента исследуемого вируса; клонирование исследуемого ампликона в стандартный плазмидный вектор, выделение необходимого количества плазмидной рекомбинантной ДНК, определение ее концентрации и использование в качестве стандарта непосредственно ампликона [292].

Преимущество можно отдать последнему, наиболее простому способу разработки ПЦР-стандартов.

Таким образом, при производстве противовирусных препаратов для определения количества вирусов в вирусосодержащем материале вполне приемлемо применение ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов.

При производстве иммунобиологических препаратов, используемых для профилактических целей, в том числе для профилактики бешенства, необходимым этапом контроля качества является оценка их протективной активности.

Для выявления уровня содержания антител к вирусу бешенства широко применяется реакция нейтрализации (РН) вируса бешенства на мышах, предложенная ВОЗ в прошлом веке [128]. Тест *in vivo* надежен, однако обладает существенными недостатками, связанными с использованием большого количества лабораторных животных, длительностью и необходимостью использования живого контрольного вируса бешенства, в связи с чем комитет экспертов ВОЗ по бешенству в последние десятилетия рекомендует наряду с РН использовать альтернативные методы титрования антирабических антител *in vitro* [554, 555].

В литературе описаны различные методы *in vitro* для определения антирабических антител: реакция диффузной преципитации (РДП), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция связывания комплемента (РСК), тест ингибиции фокуса флуоресценции (ТИФФ, RFFIT), флуоресцентный вируснейтрализующий тест (FAVN), ИФА и другие [29, 33, 152, 304, 444, 507, 542, 563]. Несмотря на многообразие разработанных методов, не все из них достаточно надежны. Так, РДП эффективна только тогда, когда антитело и антиген присутствуют в соответствующей пропорции, при этом отрицательный результат не может исключить присутствия антирабических антител [128]. Р.С. Шафеева с соавт. сообщают о применении сухого эритроцитарного диагностикума для определения в РНГА титра антител в сыворотках доноров при получении экспериментального гомологичного антирабического иммуноглобулина [260]. Отличительной чертой РНГА являются экспрессность, простота исполнения, общедоступность, но по чувствительности данный тест уступает ТИФА [260]. При исследовании сывороток крови животных, иммунизированных антирабической вакциной, установлено, что результаты РНГА коррелировали с результатами РН на мышах [331]. Для количественного определения антирабических комплементсвязывающих антител в свое время применяли РСК

[225]. Недостатком теста является возможность выявления только антител, образующихся в организме в ответ на введение нуклеокапсида вируса бешенства и активных в реакции связывания комплемента и иммунофлуоресценции, но не обладающих вирус-нейтрализующей активностью. Описанные тесты не нашли широкого применения для определения антирабических антител на практике.

Среди рекомендуемых ВОЗ методов *in vitro* с использованием клеточных культур клеток следует указать FAVN и RFFIT, которые позволяют по выявленному в исследуемых сыворотках титру антирабических антител оценивать уровень протективного иммунитета [498, 554, 555]. РН в культуре клеток считается достойной альтернативой традиционному методу РН на мышах и не уступает ему по своей чувствительности [152, 331, 423]. В.В. Недосеков с соавт. предложили модифицированную РН в культуре клеток ПС с использованием вакцинного штамма вируса бешенства ТС-80, которая характеризуется экспрессностью, безопасностью, высокой чувствительностью, экономичностью [151]. Недостатками RFFIT и FAVN являются трудоемкость, необходимость в специальном оборудовании для работы с перевиваемой культурой клеток, дороговизна, использование вируса, длительность постановки (2–3 дня), необходимость получения конъюгатов с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ).

В последние десятилетия для оценки уровня антирабических антител в сыворотках крови человека и животных широко используется ИФА в различных вариантах [13, 85, 196, 199, 341, 428]. При выявлении антител к вирусу бешенства наиболее распространен не прямой ИФА, отличающийся универсальностью меченого реагента. В.Р. Shankar et al. приводят данные, что чувствительность и специфичность непрямого ИФА не уступает РН на клеточной культуре [491]. S. Zhang et al. применили конкурентный ИФА для тестирования сывороток вакцинированных животных [563]. При сравнении ИФА (Platelia rabies) и метода FAVN для обнаружения антирабических антител в сыворотках людей М. Stantic-Pavlinic et al. установлено, что результаты указанных методов коррелируют, однако величина титров защитных антител в ИФА ниже по сравнению с FAVN [507]. О.П. Сельникова с соавт. сообщает о возможности выявления специфических антител к вирусу бешенства в сыворотках вакцинированных людей в количественном тесте ИФА с использованием диагностикума Platelia (r) rabies kit (Sanofi Pasteur Diagnostics, Франция) [211]. М. Feysaguet et al. выявили корреляцию результатов ИФА (Platelia Rabies II) и RFFIT при оценке иммунного статуса людей, вакцинированных против бешенства и

[329]. S. Shiota et al. приводят результаты исследований по обнаружению антител к вирусу бешенства в сыворотке крови человека методом RAPINA (модификация ИФА) и указывают на корреляцию результатов разработанного метода и РН на культуре клеток [493]. Кроме антивидовых препаратов, для постановки непрямого ИФА используют протеин А, конъюгированный с пероксидазой хрена [202, 459].

В модифицированном варианте ELISA – dot-ELISA (дот-иммуноанализ, ДИА) для адсорбции антигенов вместо поверхности лунок микротитровальных планшетов применяют нитроцеллюлозные мембраны (НЦМ) [234]. На белой НЦМ нерастворимые продукты ферментативной реакции образуют легко различимые цветные пятна, вследствие этого нет необходимости в использовании специального оборудования для учета результатов. Преимуществами ДИА являются простота постановки и малые расходы компонентов, необходимых для проведения реакции.

В последние годы в мембранных тестах вместо традиционных ферментных меток все шире применяют наночастицы коллоидного золота (КЗ) [64, 65, 96, 377, 560]. Применение конъюгатов на основе наночастиц КЗ обусловлено интенсивной красной окраской золотосодержащего маркера, что дает возможность визуально оценивать результаты иммунохимической реакции. По данным литературы, конъюгаты с КЗ превосходят таковые с изотопными, флуоресцентными и ферментными метками по чувствительности, стабильности, простоте выполнения анализа и экономичности [65, 535]. Учеными РосНИПЧИ «Микроб», в том числе с участием автора, разработана тест-система с использованием наночастиц КЗ, позволяющая определять активность антирабических сывороток и иммуноглобулина в ДИА, показана корреляция результатов РН вируса бешенства на белых мышах и ДИА [258].

При исследовании специфической активности антирабических препаратов в ИФА или ДИА с использованием цельного вируса необходимо учитывать, что, кроме ВНА, этот метод определяет антирабические антитела другой направленности. Для устранения данного недостатка применяют очищенный ГП вируса бешенства. ГП, или белок G в составе бислойной липопротеидной оболочки вируса составляет 44–47 % от общего количества белка. ГП является единственным гликозилированным белком и представляет собой эктодомен в виде шипов размером до 10 нм [305, 312, 499]. ГП – основной иммуноген вируса бешенства, индуцирующий образование вируснейтрализующих антител в макроорганизме [50, 286, 376, 546]. Для выделения ГП из вируса применяют неион-

ные детергенты или протеолитические ферменты [22, 338]. Применение очищенного ГП в качестве антигена при постановке иммунохимических реакций дает возможность настроить анализ на выявление антител вируснейтрализующей направленности.

О применении изолированного ГП вируса бешенства для выявления ВНА в антирабических сыворотках непрямым ИФА сообщается в работе Э.Я. Сазановой с соавт., при сравнительном исследовании результатов непрямого ИФА и РН коэффициент корреляции составил 0,94 [199]. Выделение очищенного ГП и его применение при разработке новых видов диагностикумов и тест-систем для выявления антирабических антител с применением современных маркеров является одной из практических задач, решение которой представлено в настоящем исследовании.

2.4 Получение лиофилизированных лекарственных препаратов иммуноглобулиновой природы

Жидкая форма ИЛП считается наиболее экономичной и удобной для потребителей, однако лечебные иммуноглобулины в жидкой форме обладают рядом существенных недостатков: низкая стабильность свойств при несоблюдении температурного режима, риск образования агрегатов и фрагментов при длительном хранении. Лиофилизированная форма иммуноглобулиновых препаратов предотвращает агрегацию и фрагментацию белков в процессе хранения, негативно влияющих на специфическую активность, а также поддерживает стабильность молекулярных параметров и специфической активности при транспортировании ИЛП, а для Российской Федерации это весьма актуально в связи со значительной протяженностью транспортных путей от производителя до потребителя. При образовании агрегатов в ИЛП жидкой лекарственной формы возрастает риск проявления побочных анафилактических реакций на введение препарата [12, 226, 378]. По данным ряда авторов, агрегация лекарственных белков способствует образованию в организме пациента труднорастворимых высокомолекулярных комплексов, вызывающих активацию системы комплемента [27, 506]. Агрегация молекул иммуноглобулинов жидкой лекарственной формы может быть следствием высокого негативного заряда стекла первичной упаковки препарата [102, 291, 334, 540], определенную роль играет наличие в препарате остаточного спирта, используемого для осаждения специфической фракции из иммунной сыворотки [79]. Установлено, что одной из причин агрегации белковых молекул в процессе хранения ИЛП может являться окисление липидов, в результате которого продукты окисления взаимодействуют с молекулами иммуноглобу-

линов и вызывают их агрегацию [27, 103]. Устойчивость белковых растворов снижается за счет образования дисульфидных связей между молекулами белка и липидами. Есть мнение, что агрегации, снижающей эффективность иммунологических реакций, может способствовать высокая концентрация белка в жидких формах ИЛП [295, 298, 316, 401, 438, 466].

Фрагментация, как и агрегация, является следствием нестабильности жидкой формы ИЛП и может способствовать снижению нейтрализующей активности антител и повышенному клиренсу препарата из организма [8]. Расщеплению молекулы белка с образованием низкомолекулярных фрагментов способствуют сывороточные протеазы, следы которых могут присутствовать в иммуноглобулинах после выделения их из сыворотки [113, 163].

В современной литературе практически отсутствуют публикации, касающиеся исследований молекулярных параметров гетерологичного АИГ из сыворотки крови лошади. Единичные работы, обнаруженные нами, выполнены сотрудниками Томского НИИ ВС и относятся к 70-м годам прошлого века [178, 179]. Авторы приводят следующие данные: на хроматограммах после гель-фильтрации АИГ регистрировали несколько пиков, соответствующих фракциям агрегатов, мономеров и фрагментов. Исследование АИГ на момент выпуска выявило содержание агрегатов в количестве 3,8 %; через два года хранения эта величина возросла до 27,9 % [178]. Содержание фракции фрагментов соответственно составило 0,9 и 14,8 %. Столь значительное содержание нежелательных для АИГ фракций можно объяснить несовершенными методами очистки, применяемыми в 70-х годах прошлого столетия при производстве препарата в Томском НИИ ВС.

Повышения стабильности иммуноглобулиновых препаратов можно добиться снижением концентрации липопротеидов и использованием антиоксидантов, подавляющих влияние свободных радикалов [34, 163]. Однако самым эффективным способом повысить стабильность свойств иммуноглобулиновых препаратов в процессе длительного хранения является лиофилизация [56, 82, 301, 335, 364, 417, 440, 441, 471, 495].

В последние десятилетия в мировой биотехнологической практике наблюдается тенденция увеличения выпуска лечебных иммуноглобулиновых препаратов в сухой форме. Например, в США за последнее десятилетие ведущим контрольным органом FDA зарегистрировано шесть лиофилизированных внутривенных иммуноглобулинов против двух препаратов в жидкой форме [84].

Из лиофилизированных ИЛП, применяемых в Российской Федерации, можно отметить Иммуновенин, Габриглобин-IgG, Сандоглобулин, Carimune (Германия) – иммуноглобулины человека нормальные для внутривенного применения; комплексный иммуноглобулиновый препарат (КИП) для энтерального применения; Лактоглобулин – иммуноглобулин коровий против условно патогенных бактерий и сальмонелл для перорального применения; VariZIG (*Varicella Zoster Immune Globulin human*, США) [58, 82, 84]. В литературе описаны исследования по разработке сухой формы сибиреязвенного гетерологичного иммуноглобулина из сыворотки крови лошади [99, 115]. Рациональные биотехнологические приемы по лиофилизации иммунобиологических препаратов могут быть успешно разработаны только с учетом особенностей свойств каждого препарата.

Физические закономерности процесса лиофилизации и их теоретические разработки являются предметом отдельной области фундаментальных исследований и обобщены в трудах ряда авторов [28, 118, 285, 352, 409, 410, 435, 470, 471]. В данном обзоре мы рассмотрим лишь общие основы лиофилизации, необходимые для практического использования при сублимационном высушивании биопрепаратов.

Для лиофилизации применяют сублимационные установки камерного и диффузатормого типов, отличающихся наличием охлаждающих элементов на их полках [26, 61]. При лиофилизации препарата его химическая структура практически не изменяется, что обусловлено отсутствием жидкой фазы растворителя, низкой температурой, минимальной концентрацией кислорода в газовой среде [112, 254]. Лиофилизат должен хорошо растворяться в воде, а после растворения сохранять все исходные свойства.

Процесс лиофилизации подразумевает три этапа: замораживание, сублимацию и десорбцию (досушивание) [92, 155, 333, 454].

Замораживание является одной из важнейших стадий лиофилизации, определяющей окончательную структуру продукта. На первой стадии замораживания происходят процессы первичной кристаллизации воды в препарате и вторичной кристаллизации растворенного вещества [335, 414]. В значительной степени на качество процесса замораживания влияет состав вещества. Соли или способные к кристаллизации вещества, такие как маннит или глицин, входящие в состав замораживаемого продукта, обуславливают замораживание по механизму эвтектики, при котором образуются смеси кристаллов льда и растворенных веществ. Замораживание по механизму стеклования обуслов-

ливают компоненты, либо не склонные к кристаллизации (полиглюкин, желатин), либо кристаллизующиеся при положительных температурах в течение длительного времени, например, углеводы (сахароза, лактоза, сорбит) [9, 468]. Уловить стеклование образца позволяет метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), широко применяющийся на практике при определении эвтектических зон высушиваемого образца [3, 227, 422, 450]. Данный метод термического анализа основан на установлении различий температур эталонного раствора, не имеющего эвтектической точки, и охлаждаемого (нагреваемого) объекта путем регистрации пиков в каждой эвтектической зоне.

Для этапа замораживания важно учитывать значение эвтектической температуры ($T_{эвт}$) объекта, подлежащего лиофилизации. Под температурой эвтектики понимают температуру полного отвердевания (кристаллизации) замораживаемого продукта [154]. Значение $T_{эвт}$ позволяет в дальнейшем определить допустимый уровень нагревания биологического объекта при лиофилизации [254]. Для анализа процессов замораживания или нагрева образца возможно использование микроскопии, позволяющей непосредственно наблюдать процесс лиофилизации в целом, о чем сообщает С. Roth et al. [474].

Структура и размер образующихся при лиофилизации кристаллов льда зависит от скорости замораживания [54, 269]. При быстром замораживании – от 2 с до 5 мин при температуре от 0 до минус 79 °С образуются мелкие кристаллы льда, обладающие высокой специфической поверхностью контакта, что может привести к адсорбции белка на поверхности и увеличению риска денатурации; при сверхбыстром охлаждении (витрификации) – менее 2 с при температуре от 0 до минус 190 °С вода при замерзании, минуя стадию кристаллизации, переходит в стекловидное состояние [162, 335]. Сверхбыстрое замораживание, когда объект погружается в жидкую охлаждающую смесь или сжиженные газы, считается наиболее щадящим и сохраняющим структуру клетки и чаще всего применяется для замораживания форменных элементов крови, эмбрионов, микроорганизмов, клеточных структур [44, 183, 194].

В промышленном производстве фармацевтических белковых препаратов чаще всего используется медленное замораживание – 10 мин и более при температуре от 0 до минус 79 °С.

Биотехнологи-практики сходятся во мнении, что невозможно дать единых рекомендаций по длительности этапа замораживания, которая определяется полнотой замерзания продукта при оптимальном соотношении температуры замораживания и вре-

мени. Температура и скорость замораживания, состав стабилизаторов определяют конкретно для каждого препарата с целью максимальной сохранности структурной целостности объекта [92, 155].

Вторым этапом лиофилизации является сублимация или первичное обезвоживание, во время которого происходит удаление из высушиваемого продукта основной массы воды. Данный процесс характеризуется наибольшей продолжительностью среди всех этапов лиофильного высушивания и может занимать от нескольких часов до нескольких дней, поэтому при разработке более экономичных режимов высушивания препаратов особое внимание уделяется оптимизации условий сублимации [19, 92, 457].

При оптимизации условий лиофильного высушивания ИЛП необходимо учитывать критические температурные точки, к которым относятся температура полного затвердевания – минимальная температура препарата, при которой продукт достигает полного замораживания, и температура зарождающегося плавления – максимальная температура препарата, которая должна поддерживаться в процессе сублимации во избежание плавления или других нежелательных явлений [92]. В практике лиофилизации существует понятие температура коллапса (T_k) – температура, выше которой продукт, подвергнутый лиофилизации, теряет макроскопическую структуру и разрушается при высушивании [410]. Если во время нагрева температура продукта будет соответствовать значениям вне эвтектической зоны, существует риск вспенивания продукта из-за образования микрон переохлажденной жидкости, что ведет к снижению качества сухого продукта; во избежание этого явления практики-биотехнологи рекомендуют снизить температуру материала (T_m) при первичном обезвоживании на несколько градусов ниже $T_{эвт}$ [61, 107, 155].

В ряде исследований авторы указывают на преимущество проведения процесса сублимации продуктов биологической природы в зоне верхних эвтектических температур с сохранением качественных и количественных показателей лиофилизата в связи с существенным снижением энергозатрат [155, 468]. Если жидкость переохлаждена, ее испарение способствует увеличению давления внутри продукта, его бурному «кипению», что снижает качество лиофилизации и, как следствие, качество целевого продукта [61, 162].

На этапе сублимации необходимое значение T_m достигается оптимальным уровнем подвода тепла, который определяется опытным путем и зависит от нескольких факторов

– величины давления в камере сублиматора и его конструктивных деталей, вида первичной упаковки. При недостаточном подводе энергии T_m в процессе лиофилизации упадет ниже требуемой, что чревато остановкой процесса. Превышение допустимых границ T_m , что наблюдается при избыточном подводе тепла, может привести к снижению качественных характеристик сухого препарата [155]. Во избежание перегрева препарата возникает необходимость снижения температуры плиты ($T_{пл}$) за счет уменьшения подвода тепла к материалу [9]. Кроме того, при проведении сублимации существует риск неравномерного протекания процесса в ампулах или во флаконах одной серии препарата – в периферийных емкостях лиофилизация происходит в 2–3 раза быстрее, чем в центральных, что способствует перегреву продукта. Для минимизации различий в значениях температур некоторые авторы предлагают размещать пустые емкости вокруг наполненных ампул, расположенных по периферии полки, либо размещать алюминиевую фольгу на внутренней части двери сублиматора для создания теплового щита [512].

Важным параметром при проведении сублимационного высушивания является давление в камере сублиматора, которое оказывает воздействие на процессы тепло- и массообмена. Считается, что для увеличения скорости сублимации процесс необходимо осуществлять при давлении, величина которого значительно ниже давления паров льда в продукте [28, 457]. Однако очень низкое давление в камере может спровоцировать загрязнение материала летучими компонентами масляного насоса, а неравномерный перенос тепла будет способствовать значительным различиям T_m в разных флаконах [455]. Наиболее оптимальные условия для равномерного переноса тепла в партии флаконов или ампул создаются при умеренном давлении в камере, значения которого находятся в пределах от 6,65 до 26,6 Па [456].

Большую роль в успешном протекании процесса лиофилизации играет конденсатор, которым снабжена сублимационная установка. От значения температуры конденсатора зависит степень связывания молекул водяного пара: при высокой температуре происходит более интенсивное отражение молекул пара от поверхности конденсатора, что увеличивает давление и снижает скорость сублимации. При оптимальной температуре конденсатора все молекулы пара, достигая охлажденной поверхности, полностью связываются и этим условиям соответствует значение температуры порядка минус 60 °С [352, 471]. Все современные лиофильные установки в настоящее время поддерживают температуру конденсатора в диапазоне от минус 50 до минус 90 °С.

Завершающим этапом лиофилизации является десорбция, в процессе которой удаляется связанная вода, объем которой занимает 5–20 %. Данная фракция воды не превращается в лед при замораживании и остается связанной с растворенным веществом посредством водородных связей. Уменьшение содержания связанной воды, как правило, приводит к улучшению качества лиофилизированного препарата [92]. Десорбцию условно можно разделить на две стадии, каждая из которых протекает соответственно при отрицательных и положительных значениях температуры [409]. На степень удаления связанной воды в значительной мере оказывают влияние температура и продолжительность нагрева продукта [155].

Скорость удаления остаточной влаги при десорбции существенно ниже по сравнению со скоростью удаления льда при первичной лиофилизации, что объясняется прочными водородными связями остаточной влаги с гидрофильными компонентами продукта. Некоторые авторы высказывают мнение, что проведение десорбции при высокой $T_{пл}$ в течение короткого периода времени эффективнее, чем при низких температурах в течение длительного периода времени и вторичную десорбцию следует проводить в течение 3–6 ч с предельной температурой 40–50 °С, дальнейшее увеличение продолжительности процесса приводит к замедлению удаления связанной влаги [457, 513]. Другие исследователи отмечают, что оптимальным является значение $T_{пл}$, не выходящее за температурные пределы 30–40 °С [61]. Практики-биотехнологи рекомендуют постепенное повышение $T_{пл}$ по окончании первичной сушки, поскольку резкое увеличение температуры может привести к коллапсу аморфного продукта. Рекомендуемая скорость увеличения $T_{пл}$ составляет от 0,1 до 0,4 °С /мин [454]. Содержание остаточной воды при десорбции снижается до 1,0–3,0 %, что, как правило, достаточно для обеспечения стабильности препарата [456].

Основными параметрами этапа десорбции, определяющими биологические и физико-химические свойства лиофилизатов, являются температура продукта и период досушивания. Именно на этой стадии могут произойти повреждения в биоструктуре молекулы препарата, поэтому при выборе оптимальных значений параметров десорбции необходимо учитывать биологические особенности лиофилизируемого препарата. Условия этапа десорбции зависят от нескольких факторов. Лيوфилизация аморфных продуктов протекает медленнее, чем кристаллических, поэтому сублимация таких продуктов происходит при более высокой температуре и требует большей продолжительности.

сти процесса для удаления связанной воды. Кроме этого, десорбция зависит от концентрации растворенных в препарате веществ. При концентрации более 10 % удаление фракции связанной воды в лиофилизированном препарате затрудняется и требуется более высокая температура и увеличение временного периода для завершения десорбции [513].

Важным показателем, играющим большую роль в сохранении лиофильно высушенных белков, является остаточная влажность или потеря в массе при высушивании (ПМВ). Высокое содержание остаточной воды в лиофилизированном продукте, как правило, снижает стабильность его свойств при хранении, но и очень низкий показатель ПМВ не гарантирует лучшую стабильность при хранении, по крайней мере, для белков и более сложных биологических препаратов. Крайне важно найти оптимальное промежуточное содержание остаточной влаги, при которой материал сохраняет стабильность при хранении [355, 356, 455].

В процессе лиофилизации препараты иммуноглобулиновой природы подвергаются риску деградации и потери активности, о возможном повреждающем действии лиофилизации на структуру белка говорится в ряде исследований [302, 309, 310, 399, 453]. Г.Р. Константино с соавт. продемонстрировали механизмы повреждения белков при лиофилизации, которые классифицировали на внутримолекулярные и межмолекулярные (агрегация) [101]. Межмолекулярные механизмы повреждения обусловлены тем, что в лиофилизированном состоянии молекулы белка значительно сближены друг с другом, что в сочетании с повышенной остаточной влажностью приводит к агрегации белка [295, 478, 521]. Внутримолекулярные механизмы повреждения белков могут быть связаны с дезаминированием аспарагина и глутамина, гидролизом пептидной связи и окислением остатков метионина [486]. Понимание механизмов повреждений, происходящих с белками при их лиофилизации, важно для успешного применения лиофилизированных иммуноглобулиновых препаратов.

Итак, повреждения белковых препаратов при лиофильном высушивании могут быть следствием химических и конформационных изменений. К. Griebenov и А. Klivanov описали обратимые изменения вторичной структуры многих белков, происходящие при лиофилизации [353]. Авторы выявили, что обратимо денатурированные белки при дегидратации восстанавливают исходную конформацию молекулы белка. Однако следует отметить, что процесс обратимой денатурации ведет к сближению от-

дельных реакционных групп аминокислотных остатков, что способствует образованию новых ковалентных связей [101]. Таким образом, лиофилизация белков, с одной стороны, создает возможность их хранения в течение приемлемого для лекарственных препаратов времени; с другой стороны, не исключена возможность изменения их конформационного состава, поскольку высокоструктурированные и динамичные молекулы белков при лиофильном высушивании переходят в условия, не имеющими ничего общего с нативными [353].

В литературе описаны различные молекулярные механизмы формирования ковалентных агрегатов лиофилизированных белков. Так, при наличии в молекуле белка свободных SH-групп становится возможным тиол-дисульфидный обмен с образованием новых межмолекулярных дисульфидных связей [309, 402]. При отсутствии свободных тиолов ковалентная агрегация происходит вследствие β -элиминирования с асимметрическим расщеплением исходной дисульфидной связи и последующим образованием тиоцистеина и дигидроаланина. Последний, взаимодействуя с ϵ -аминогруппой лизина, образует ковалентную связь; тиоцистеин расщепляется с образованием SH-групп, способных к тиол-дисульфидному обмену [309].

При решении проблемы стабилизации белковых препаратов во время лиофильного высушивания наиболее эффективным подходом является использование наполнителей, обеспечивающих окружение молекул белка подобно нативному состоянию, что препятствует межбелковому контакту и возникновению нежелательных химических реакций [92, 274]. Современные исследования механизмов защиты белковых препаратов стабилизирующими наполнителями при лиофилизации рассматривают термодинамические (гипотеза замены раствора) и кинетические (гипотеза витрификации) механизмы. Основной гипотезы замены раствора является утверждение, что термодинамическая дестабилизация белков происходит при разрушении на этапе досушивания водородных связей между молекулами белка и молекулами воды, а использование лиопротекторов в качестве «водного заменителя» термодинамически стабилизирует нативную структуру белка, сохраняя его активность [273]. Гипотеза витрификации базируется на кинетическом механизме стабилизации белка, а под процессом витрификации подразумевается перевод белкового препарата в стеклоподобное твердое аморфное состояние, стабильное как в процессе лиофилизации, так и при хранении [333, 366, 414].

Для успешной лиофилизации белковых препаратов подбор эффективных лиопротекторов (криопротекторов, стабилизаторов) является необходимым условием. Лиопротекторы – вещества, защищающие лиофилизируемые препараты как в процессе замораживания, так и при проведении сублимации и десорбции [10, 195, 266, 364]. В процессе лиофилизации стабилизаторы образуют аморфный стеклообразный матрикс, связывающийся посредством водородных связей с третичной структурой белка, заменяя молекулы воды, удаленные в процессе высушивания. Лиопротекторы помогают поддерживать конформационную структуру молекул белка во время лиофильного высушивания, сводя к минимуму деградацию белка, формируют таблетку при лиофилизации, кроме того, они сохраняют белок при длительном хранении. В качестве лиопротекторов обычно используют гидрофильные соединения углеводной (глюкоза, сахароза, лактоза, трегалоза) или полимерной (ПЭГ, декстран) природы, аминокислоты (глицин, серин, аргинин), поверхностно-активные вещества [125, 157, 256, 300, 313, 379, 511, 534, 538]. Ученые из Томского НИИ ВС в первых опытах по получению лиофилизированного АИГ описывали положительные результаты применения таких протектантов, как тиосульфат натрия, глюкоза, сахароза, сахароза с желатозой, гликокол, сорбит, маннит [180].

Механизм защиты белков состоит в том, что стабилизирующие растворы создают вокруг молекул белка упруговязкую пленку, «обволакивая» их и предохраняя от образующихся при замораживании кристаллов льда и воздействий мигрирующего по капиллярам пара [170]. Есть мнение, что попадая в среду, предназначенную для замораживания, молекулы сахаров препятствуют образованию эвтектических смесей солей, оказывая тем самым защитное стабилизирующее действие [89].

Первые сообщения о протективных свойствах сахаров в процессе дегидратации и регидратации протеинов появились в 30-х годах прошлого века [297]. Последующее за этим детальное изучение защитных свойств сахаров показало, что самую высокую степень защиты белков по сравнению с другими сахарами обеспечивают дисахариды [273, 368, 369]. Свою эффективность при лиофилизации белков продемонстрировали как редуцирующие (мальтоза, лактоза), так и нередуцирующие (сахароза, трегалоза) дисахариды [399].

В России применение дисахарида мальтозы в качестве лиопротектора в производстве ИЛП началось в 2000 г., когда в состав нормального иммуноглобулина для внутривенного применения для повышения стабильности свойств был впервые введен этот но-

вый для отечественных производителей стабилизатор [82]. В литературе тем не менее описаны и негативные свойства редуцирующих сахаров. М. Hageman et al. и К. Izutsu et al. отмечают, что мальтоза и лактоза могут вызвать потемнение продукта [356, 369]. М. Enohibori et al. сообщают о случае развития анафилактоидной реакции у пациента после введения лекарственного средства, содержащего мальтозу [323].

В отличие от редуцирующих сахаров, трегалоза и сахароза не вступают во взаимодействие с белками и не вызывают потемнения препаратов в процессе лиофилизации и при хранении. Трегалоза, чье применение в качестве лиопротектора для парентеральных препаратов в 1998 г. одобрило FDA (США), обладает высокими защитными свойствами в отношении латентных белков в процессе лиофилизации и не вызывает побочных реакций при парентеральном введении препаратов, содержащих данный стабилизатор [390, 482, 502].

При производстве лиофилизированных лекарственных средств к лиопротекторам предъявляется ряд требований. Так, лиопротектор после удаления свободной воды должен обеспечивать мелкопористую и достаточно плотную структуру. Если высушенный материал имеет рыхлую структуру или состоит из отдельных, не связанных между собой частиц в виде порошка, часть продукта будет унесена из ампул во время лиофилизации в потоке водяного пара и газов. Эффективный стабилизатор должен способствовать тому, что целевой продукт после удаления свободной воды останется в ампуле или флаконе в виде пористой массы.

Лиопротекторам должны быть присущи гидрофильные свойства, что улучшает их стабилизирующее действие. От гидрофильности лиопротектора в значительной степени зависит показатель ПМВ в лиофилизированном препарате. Тем не менее, гидрофильность не должна быть чрезмерной, поскольку это влияет на продолжительность процесса лиофилизации, повышая риск увеличения ПМВ и, как следствие, снижения растворимости сухого препарата [180].

Наполнители, вносимые в препарат, сами не должны обладать антигенными свойствами, как, например, желатин; быть нетоксичными; не должны проявлять дополнительную активность, что случается при использовании в качестве лиопротектора альбумина или трансферрина; наконец, быть доступными по стоимости [6]. Так, описанная выше трегалоза при всех ее достоинствах является весьма дорогим стабилизатором, что существенно влияет на себестоимость лекарственного средства.

Согласно литературным данным, глюкоза в высоких концентрациях нежелательна для применения в составе лекарственных препаратов для больных диабетом [62], альбумин обладает собственным фармакологическим действием [398], маннитол является диуретиком [357], сорбит и фруктоза нарушают кислотно-основной баланс крови [383], ПЭГ может вызвать побочные реакции из-за блокады ретикулоэндотелиальной системы [62]. Использование в качестве стабилизатора глицина, по данным S. Hansen-Schmidt et al. не приводило к серьезным побочным эффектам у пациентов [358].

По данным А.С. Нечаевой с соавт., введение в состав иммуноглобулиновых препаратов глюкозы и сахарозы в количестве 1–3 % обеспечивало растворение таблетки в течение 3–5 мин; добавление 7,5 % сахарозы и 5 % желатозы обеспечивало хорошую растворимость при соотношении наполнителя и иммуноглобулина 1:10, однако препарат с предложенными наполнителями не является абсолютно безопасным для людей, страдающих диабетом [161]. Сорбит при добавлении его к иммуноглобулину в количестве 0,3 % оказался оптимальным из исследованных наполнителей [161]. В литературе описано применение мальтозы при получении экспериментального гетерологичного антирабического иммуноглобулина для внутривенного введения [215].

Из приведенных данных следует, что для лиофилизации лекарственных препаратов иммуноглобулиновой природы необходимо подобрать такие стабилизаторы, которые наряду с эффективностью действия будут характеризоваться максимальной безопасностью для пациентов.

Таким образом, применение метода лиофилизации в технологии производства иммуноглобулиновых препаратов оправдано высокой стабильностью в процессе их хранения. Научное обоснование режима лиофилизации, включающее подбор оптимальных параметров, крайне важно для сохранности биологических свойств препаратов и экономичности их получения. Следует отметить, что не существует универсальных режимов лиофилизации, для разработки оптимальной технологии лиофильного высушивания препарата необходимы исследования, связанные с выявлением значений эвтектических температур в процессе замораживания, определением температурных зон сублимации, обоснованием температурно-временных режимов досушивания, подбором стабилизирующей среды, изучением свойств препарата в лиофилизированной форме в процессе хранения. Решение перечисленных задач приведено в соответствующей главе настоящего исследования.

Заключение по обзору литературы

Бешенство является актуальным инфекционным заболеванием для общественного здравоохранения многих стран, в том числе России, для эффективной постэкспозиционной профилактики которого используются различные антирабические препараты.

Потребность в антирабическом иммуноглобулине – иммунобиологическом препарате для постэкспозиционной профилактики бешенства не имеет тенденции к снижению, что обусловлено неблагоприятной эпизоотологической обстановкой по бешенству в Российской Федерации и мире. Указанный препарат производства РосНИПЧИ «Микроб» является самым востребованным иммунобиологическим лекарственным препаратом в России из всех зарегистрированных отечественных гетерологичных иммуноглобулинов и сывороток против различных бактериальных и вирусных инфекций.

Применение гетерологичного иммуноглобулина при оказании антирабической помощи сопряжено с риском возникновения анафилактических реакций, в связи с чем, вопрос дальнейшего усовершенствования гетерологичного АИГ весьма актуален в силу необходимости оказания антирабической помощи достаточно большому количеству людей с различным иммунологическим статусом.

Наиболее актуальными направлениями повышения качества гетерологичного АИГ является переход к применению для иммунизации продуцентов культурального рабического антигена и совершенствование методов очистки препарата с применением современных технологий. Для концентрирования и очистки культурального вируса бешенства перспективен и экономически оправдан метод тангенциальной ультрафильтрации на плоскорамных фильтрах.

Для количественного определения вируса бешенства и антител к нему в последние годы наиболее востребованы методы *in vitro*, применение которых рекомендовано ВОЗ. В числе таких методов – молекулярно-генетические, в частности, ПЦР-РВ, позволяющая количественно оценивать содержание вирусов в вирусном материале различного происхождения. Для определения антител к вирусу бешенства с помощью безынструментальных тест-систем предпочтительнее использование очищенного гликопротеида.

Для получения стабильной лекарственной формы иммуноглобулиновых препаратов оправдано применение метода сублимационного высушивания. Подбор оптимальных режимов лиофилизации и эффективных лиопротекторов является эмпирическим

процессом, который необходимо осуществлять для каждого препарата индивидуально, в том числе и для гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

С целью повышения безопасности препарата целесообразно расширение перечня контролируемых показателей качества антирабического иммуноглобулина, изложенных в фармакопейной статье предприятия.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При выполнении исследований и постановке экспериментов с патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности были соблюдены требования санитарных правил СП 1.3.2322-2008 «Безопасность работы с микроорганизмами III и IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» [221], методических указаний МУ 3.3.1.1099-2002 «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства» [143] и МУ 1.3.2569-2009 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» [142].

При разработке биотехнологических приемов по оптимизации производства антирабического иммуноглобулина руководствовались Федеральным законом «Об обращении лекарственных средств» [167], ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств» [46], приказом Минпромторга РФ № 916 от 14.07.2013 «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств» [192], требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации, 12 изд. [47], Европейской фармакопеи 8.0. [325], фармакопейных статей ФС.3.3.1.0038.15 «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади» [245], ФС 42-3874-99 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов» [246], ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» [175], фармакопейной статьи предприятия ФСР Р N002639/01-250210 «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций», промышленного регламента ПР № 01898109-47-15 на производство «Имуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций», методических указаний МУК 4.1/4.2.588-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям» [145], санитарно-эпидемиологических правил СП 3.3.2.3332-16 «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов» [222].

3.1 Материалы

3.1.1 Вирусные и бактериальные штаммы

При получении рабического антигена использовали *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253». Для определения специфической активности антирабических сывороток, иммуноглобулина и F(ab')₂-фрагментов использовали контрольный штамм фиксированного вируса бешенства CVS. Штаммы *virus fixe* получены из коллекции Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздрава России), г. Москва.

Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* KM 229 получали методом кальциевой трансформации из штамма *E. coli* TG1 и использовали для разработки количественных стандартов в ПЦР-РВ. Штамм *E. coli* KM 229 депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

3.1.2 Сыворотки и препараты

В работе использовали антирабические сыворотки мышей, кроликов и лошадей (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»); антитела диагностические против Ig лошади, меченные пероксидазой, сухие («Медгамал», НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи); антитела кролика аффинно-очищенные к иммуноглобулинам лошади («ИМТЕК», г. Москва); антитела диагностические против IgG белой мыши, меченные пероксидазой («Медгамал», НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи); белок A *Staphylococcus aureus* («Sigma»); овалбумин (45 кДа, «Sigma»); бычий сывороточный альбумин (БСА) (67 кДа, «Sigma»). Для постановки ДИА в качестве отрицательного контроля использовали сыворотки нормальные из крови кролика и лошади.

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

3.1.3 Вирусные антигены

Для проведения исследований использовали: органо-тканевой рабический антиген – инактивированная 10 % суспензия мозговой ткани кроликов, зараженных *virus fixe* «Москва 3253»; культуральный рабический антиген – инактивированная очищенная

концентрированная суспензия *virus fixe* «Москва 3253», репродуцированного *in vitro* на клеточной линии Vero; гликопротеид, выделенный из *virus fixe* «Москва 3253» культурального происхождения.

3.1.4 Клеточная линия

Клетки перевиваемой линии Vero (B) (почка африканской зеленой мартышки, производственный штамм, 178-ой пассаж, отконтролирована на отсутствие микоплазм) использовали для репродукции *virus fixe* «Москва 3253» при изготовлении культурального рабического антигена. Клеточная линия Vero получена из ООО «Биолот» (г. Санкт-Петербург) в виде монослоя.

3.1.5 Реактивы, растворы и питательные среды

Для проведения работы использовали отечественные и импортные реактивы, имеющие квалификации чистоты «осч», «хч», «чда», «Molecular Biology Grade».

Для культивирования *virus fixe* «Москва 3253» и клеток Vero были использованы: диметилсульфоксид (DMSO) квалификации «Для культур клеток»; питательная среда Игла MEM жидкая, с L-глутамином, из полнокомпонентной смеси («Hyclone»); питательная среда 199 жидкая, с L-глутамином, из полнокомпонентной смеси («Hyclone»); смесь сухая пенициллина G (50 000 ЕД/фл) и стрептомицина (50 мг/фл.) для клеточных культур (Германия); раствор Дульбекко (DPBS) без Ca^{2+} и Mg^{2+} ; раствор трипсина 0,25 %; раствор версена 0,02 %; протаминсульфат; сыворотка крови КРС жидкая для культур клеток; сыворотка крови плодов коровы жидкая для культур клеток («Hyclone»); альбумин человеческий сывороточный (ЧСА) квалификации «Для культур клеток», лиофилизированный, чистота 98 %; натрий уксуснокислый трехводный (ГОСТ 199-78); натрий двууглекислый (ГОСТ 2156-76); кислота уксусная ледяная (ГОСТ 61-75); фенол синтетический технический (ГОСТ 23519-93).

Воду очищенную (ФС.2.2.0020.15), воду для инъекций (ФС.2.2.0019.15) использовали для приготовления растворов.

Для оценки уровня накопления *virus fixe* в культуральной жидкости применяли «Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА)» по ТУ-9388-025-00492374-2007 (ФГБНУ «ФЦТРБ ВНИВИ», г. Казань).

Для разработки ПЦР-стандартов использовали: трис-оксиметиламинометан (имп.), двузамещенную соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (имп.), натрий хлористый (ГОСТ 4233-77), магний хлористый 6-водный (ГОСТ 4209-77), кислоту уксусную ледяную (ГОСТ 61-75), кислоту соляную (ГОСТ 3118-77), бромид этидия, бромфеноловый синий (имп.), спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья (ГОСТ 5962-2013), гидроокись натрия (ГОСТ 4328-77), фиккол-400 (имп.), тритон X-100, гуанидинтиоцианат (имп.), масло парафиновое легкое («AppleChem», Германия), агарозу (имп.), зонд формата Taq-Man, Taq-полимеразу (имп.), праймеры, 2-меркаптоэтанол, однозамещенный ортофосфат калия, глицерин (имп.), дезоксинуклеотидтрифосфаты (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ), додецилсульфат натрия (имп.), азид натрия (имп.), аммоний сернокислый (ГОСТ 3769-78), твин-20 (имп.), БСА (имп.), натриевую соль ампициллина.

«Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» по ТУ 9398-004-01897593-2008 (ФСР 2008/03993) («ИнтерЛабСервис», г. Москва) применяли для выделения РНК.

«Комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК «Реверта-L» («ИнтерЛабСервис», г. Москва) был использован при проведении реакции обратной транскрипции. Набор «QIAprep Spin Miniprep Kit» («Qiagen», Нидерланды) был использован при выделении плазмидной ДНК рекомбинантного штамма *E. coli* КМ 229.

Для конструирования конъюгата на основе ГП и наночастиц КЗ и постановки ДИА использовали: 1 % раствор кислоты золотохлористоводородной («Fluka AG, CH-9470 Buchs»); 1 % раствор цитрата натрия («Analar», Англия); 0,2 % раствор серебра азотно-кислого (ГОСТ 1277-75); 0,2 % раствор метола (сернокислая соль п-метиламинофенола, ГОСТ 25664); 0,5 % раствор кислоты лимонной (ГОСТ 908-2004); 0,2 М раствор карбоната калия; 10 % раствор натрия хлористого (ГОСТ 4233-77); блокирующий буфер pH 8,2 (20 мМ раствор Трис-HCl, 150 мМ натрия хлористого, 0,1 % ПЭГ-20М, 0,02 % Tween 20); 0,5 % раствор ПЭГ-20000 или 1–3 % раствор БСА; 10 мМ фосфатного буфера (0,43 г дигидрофосфата калия, 1,68 г гидрофосфата натрия, 7,2 г натрия хлористого), 1 % ПЭГ-20М, 1М азид натрия; воду деионизованную.

Для выделения ГП из *virus fixe* применяли: тритон X-100 (ПЭГ-(9–10)-p-t-октилфенол) («Serva»); 0,01 М фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH (7,3±0,2) – 0,137

моль/л натрия хлористого и 0,0027 моль/л калия хлористого; раствор 0,01 М бикарбоната аммония рН (7,8±0,1); этанол (ГОСТ Р 5962-2013).

Для измерения содержания белка в антирабическом иммуноглобулине были использованы: «Набор реагентов для определения содержания общего белка в сыворотке (плазме) крови человека биуретовым методом (Общий белок-Витал)» по ТУ 9398-002-52145831-2004 (ФСР 2011/10587 (ООО «Витал Диагностикс СПб»); стандартный образец предприятия (СОП) содержания белка в иммуноглобулине СОП 05-07-15 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора); отраслевой стандартный образец (ОСО) содержания белка в иммуноглобулине ОСО 42-28-340-2014 (ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздрава России, г. Москва).

Стандартный образец предприятия (СОП) содержания спирта в иммуноглобулине СОП 32-01-13 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора) – для определения остаточного этанола в антирабическом иммуноглобулине.

Подлинность антирабического иммуноглобулина подтверждали в реакции преципитации, используя «Сыворотки, преципитирующие белки крови человека и животных» по ТУ 9389-017-01895016-07 (ФСР 2007/00346) (ФЕМИДАСЕРА[®], СПб).

Биологическую реакцию нейтрализации вируса бешенства на белых мышах проводили с применением 20 % вирусосодержащей суспензии ткани мозга белых мышей, зараженных *virus fixe* CVS; Первого Международного стандартного образца антирабического иммуноглобулина (*1-st International Standart for rabies immunoglobulin*) с активностью 59 МЕ, Второго Международного стандартного образца иммуноглобулина человеческого против бешенства (*2-nd International Standart for anti-rabies immunoglobulin, human*) с активностью 30 МЕ (NIBSC, Великобритания); СОП специфической активности иммуноглобулина 32-02-14 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора); «Сыворотки крови лошади нормальной для культивирования микоплазм на питательных средах жидкая» по ТУ 9385-009-13175637-2008 (ФСР 2008/03322) (ООО «Биолот»).

Для конструирования защитных сред при лиофилизации АИГ использовали сахарозу (ГОСТ 58-33-75), мальтозу (ТУ 6-09-210-77); глицин (имп.).

Молекулярные параметры антирабического иммуноглобулина определяли с применением ультрагеля трисакрила GF 2000М («IBF», Франция).

ДИА проводили на НЦМ 0,45 мкм («Millipore», США), исследуемые препараты титровали на 96-луночных планшетах («Costar», США).

3.1.6 Экспериментальные животные

Лошади рысистой породы (*Equus ferus caballus*) массой не менее 400 кг и кролики (*Oryctolagus cuniculus*) породы «Шиншилла» массой 2,5–3,0 кг – 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 РН вируса бешенства при определении активности антирабических препаратов.

Белые мыши (*Mus musculus*) линии BALB/c массой 18–20 г – для характеристики антигенной активности ГП 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.

Белые мыши, морские свинки и кролики получены из питомника ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Манипуляции с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [67], «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях» [88], приказом МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» [191].

Содержание экспериментальных животных соответствовало «Положению о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев)» [189].

3.1.7 Оборудование и приборы

Бокс абактериальной воздушной среды (класс биологической безопасности II A) БАВп-01-«Ламинар-С»-1,5 (210.150.01) («Ламинарные системы», Россия); биореактор «BioG-M Plus» («Biotron», Южная Корея); инкубатор с углекислой средой (CO₂-инкубатор) MCO-15AC («Sanyo», Япония); пилотная роллерная установка; центрифуга настольная CM-6 («Elmi», Латвия); вортекс персональный «V-1 plus» («Biosan», Лат-

вия); микроскоп люминесцентный инвертированный «Nikon TS100» (Япония); морозильник горизонтальный низкотемпературный MDF-193 («Sanyo», Япония); вакуумный отсасыватель медицинский OM-1 (Россия); холодильник бытовой «Саратов-1614М» КШ-160 (Россия); микроскоп инвертированный «Биомед-3И» (Россия); термостат TW-2.02 (Латвия); шкаф сушильно-стерилизационный ШСС-80п (Россия); стерилизатор паровой ВК-75 (Россия); сосуд криогенный СК-16 (Россия); электронный дозатор (пипеттор) «Biohit Midi Pro» (Германия) – для культивирования клеток и вируса.

Для очистки и концентрирования культурального *virus fixe* использовали установку «Vivaflow 200» («Sartorius», Германия) с мембранными модулями с НОММ 30, 100, 300, 500, 1000 кДа.

Миниэлектрофорезная камера «НОEFER» (Германия) – для выявления фракционного состава культуральной вирусной суспензии.

Бокс микробиологической безопасности (класс биологической безопасности III) БМБ-III-«Ламинар-С»-1,8 (320.180.03) («Ламинарные системы», Россия); центрифуга настольная СМ-6 «Elmi» (Латвия); термостат TW-2.02 (Латвия); холодильник комбинированный лабораторный ХЛ-340 «POZIS» (Россия); механические пипетки с переменным объемом 1–5 мл, 100–1000 мкл, 20–200 мкл («Biohit», Финляндия) – для постановки РН *virus fixe* на белых мышах.

Фильтрационная насадка с фильтром НЦ 0,20 мкм Minisart («Sartorius», Германия) – для стерилизующей фильтрации рабочих растворов.

Аквадистиллятор электрический ДЭ-25, модель 784 (Россия); дистиллятор GFL 2002 (Россия); установка комбинированная мембранная для получения очищенной воды УВОИ-«М-Ф» 1812 F-6 (Россия); установка получения воды для инъекций УВИ-0,15 (Россия); деионизатор ELGASTAT UNQ (Великобритания) – для приготовления воды очищенной, воды для инъекций, воды деионизованной.

Сепаратор моделей АС-2Ж и АСГ-3-М (Россия); шкаф холодильный ШХ-0,7 «POLAIR» (Россия); гомогенизатор GSB 18-2 RE («Bosch», Германия); парогенератор электрический электродный ПЭЭ-250 (Россия); емкость-реактор моделей РВД150.080-00.000 и РВД700.081-00.000 («АРТ-ТЕХНО», Россия); емкость-реактор РЗРЯ рн-6/0,63-1нж (Россия); емкость-дозатор С Эрн-0,160-1-02, модель ХР21-05 (Украина); центрифуги высокоскоростные проточные ОТР-101К (СГО-100) (Украина) и SEPA Z81 (Германия); танк напорный SM 17533 («Sartorius», Германия); фильтрационная

установка ФС-7, модель 757 (Россия); установки холодильные ВС 630 (Россия), LH 64/4 EC-4/2Y («Bitzer», Германия), LH 53/2 DC-2/2Y («Bitzer», Германия), UJ 9238 E («Aspera», Италия); насос циркуляционный USP-50 (Германия); насос вакуумный ВВН-1-075 (Россия); компрессор DK50 2x2V/110S, ЕКОМ (Словения); морозильник компрессионный ММ-164-50 «Атлант» (Беларусь) – для фракционирования антирабической сыворотки и выделения гамма-глобулина.

Насос перистальтический, модель № 7523-60 10-600RPM 0,1HP MasterFlex L/S («Cole-Parmer», США); нагреватель для металлических емкостей с контроллером температурным («BriskHeat», США); компрессор мембранный МК 1,5X2 (Россия); танк напорный SM 17533 («Sartorius», Германия); стерилизатор паровой электрический ВК-75-01 (Россия); шкаф холодильный SM107-S (ШХ-0,7) «POLAIR» (Россия), фильтродержатель для дисковых фильтров, 142 мм («Millipore», США); фильтродержатель патронный модификации ДС-1М («Технофильтр», Россия) для элементов фильтрующих патронных мембранных ЭПМ.К-080/045-Д-250М, ЭПМ.К-045/020-Д-250М, ЭПМ.К+-0,20/0,20-Д-250М («Технофильтр», Россия); диализатор высокопоточный («Fresenius», Германия); фильтр воздушный Sartofluor («Sartorius», Германия); фильтры глубинные дисковые Zeta Plus, Zeta Carbon («CUNO», Франция); фильтры капсульные мембранные КФМ.ПС-045/020-К-125, КФМ.К-045/020-К-125, КФМ.К-020/020-К-125, КФМ.К+-045/020-К-125, КФМ.К+-020/020-К-125 («Технофильтр», Россия); Sartobran P 0,45/0,20 («Sartorius», Германия); система асептическая одноразовая «Flexboy» (полимерный стерильный апиrogenный контейнер с подключениями), 10 дм³ («Sartorius», Германия) – для проведения баромембранных процессов очистки и стерилизации иммуноглобулина.

Для выделения РНК и проведения реакции обратной транскрипции использовали ПЦР-бокс («ДНК-технология», Россия); твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур от 18 до 99 °С типа «Гном» «ДНК-технология» (Россия); настольную центрифугу до 10000 г для микропробирок объемом 1,5–2 мл; вортекс персональный V-1 plus «Biosan» (Латвия); холодильник бытовой («Саратов-1614М» КШ-160, Россия); отсасыватель медицинский вакуумный ОМ-1 (Россия).

Для постановки ПЦР использовали ПЦР-УФ бокс «Биокот» (Россия); термоциклер «Терцик МС 2» («ДНК-технология», Россия); спектрофотометр «Biowave II» (Швейцария); детектирующий амплификатор «RotorGene 6000» («Corbett Research», Австралия).

Система «GelDoc 2000» («BioRad, США») была использована для документирования полученных результатов.

Дифференциальный сканирующий калориметр DSC 204 F1 («Phoenix», Германия) – для термического анализа раствора антирабического иммуноглобулина.

Для отработки технологических параметров лиофильного высушивания АИГ и его F(ab')₂-фрагментов использовали сублимационные установки Heto Power Dry PL9000/-50/HSC (Дания), Frigera LZ-9 (Чехия), Epsilon 2-6 D («Christ», Германия); рефрижератор сверхнизких температур MDF-U7386S («Sanyo», Япония); низкотемпературный холодильник HC 700/50 («Frigera», Чехия); датчик и точечный самописец «Zeracord» (Чехия).

Центрифуга высокоскоростная для микрообъемов Eppendorf 5415 R (Германия), система для лиофилизации «ALPHA1-5» (Германия) – для осаждения и лиофилизации ГП вируса бешенства.

Шкаф сушильный лабораторный вакуумный ШСЛВ (Россия) – для определения ПМВ.

Испытания на стерильность проводили с использованием бокса абактериальной воздушной среды (класс биологической безопасности II тип В2) БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2 (01) («Ламинарные системы», Россия); термостата электрического суховоздушного ТС-1/80 СПУ (Россия).

pH-метр-милливольтметр pH-150M (Беларусь) – для определения pH препарата.

Колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2МП (Россия) использовали для определения концентрации белка, прозрачности и цветности раствора антирабического иммуноглобулина.

Хроматограф газовый портативный ПГФ-1 (Россия) – для определения остаточного этилового спирта в АИГ.

Устройство электрофореза сыворотки крови на пленках из ацетата целлюлозы УЭФ-01 «Астра» (Россия) – для определения фракционного состава сывороток и электрофоретической однородности иммуноглобулина методом электрофореза на АЦ пленках в течение 35 мин при напряжении 8 В/см. По окончании электрофореза пленку окрашивали Red Ponsee «КлиниТест-ЭФ». Программное средство «Анализ фракций сыворотки крови», предоставленное ООО «НЦП «Астра» (Россия), применяли для обра-

ботки результатов электрофореза путем сканирования и количественной оценки содержания белковых фракций в препарате.

Облучатель ультрафиолетовый кварцевый ОУФК-1 (Россия) – для определения остаточного риванола.

Очистку инактивированной концентрированной суспензии культурального *virus fixe* «Москва 3253» и выделенного из него ГП, определение молекулярных параметров АИГ осуществляли методом гель-хроматографии с использованием хроматографической системы «ЛКВ» (Швеция).

Проточный спектрофотометр «Увикорд СИ» («ЛКВ», Швеция) – для измерения оптической плотности фракций АИГ.

Самописец двухканальный модели 2210 («ЛКВ», Швеция) – для регистрации профилей элюции фракций АИГ.

Термостат ТС-80М-2 (Россия) – для исследования стабильности АИГ методом «ускоренного старения».

Термостат ELMi ST-3L (Латвия) – для инкубации НЦМ при постановке ДИА.

Магнитная мешалка с электроподогревом ММ 2А (Россия) – для приготовления коллоидных растворов.

Вытяжной шкаф ШВ-202 («Фреска Лаб», Россия) – для хранения химических реактивов и работы с ними.

Весы лабораторные электронные РА-214С («Pioneer», США), VALOR V11P6 («ОНАУС», США) – для взвешивания реактивов.

3.2 Методы

3.2.1 Биотехнологические методы

Репродукцию *virus fixe* «Москва 3253» на перевиваемых клетках Vero осуществляли с применением следующих способов: стационарного в монослое на культуральных флаконах с площадью 150 см², 75 см², 25 см²; суспензионного и псевдосуспензионного на микроносителях «Cytodex-3» («Pharmacia») в биореакторе «BioG-M Plus» объемом 5 дм³; роллерного с использованием роллерной установки и роллерных бутылей для культивирования клеточных культур, 850 см² или 1700 см² («Corning», Великобритания).

Риванол-спиртовой метод применяли для выделения антирабического гамма-глобулина из иммунной сыворотки продуцентов [26, 90, 108].

3.2.2 Вирусологические методы

Определение титра вируса бешенства с вычислением ЛД₅₀ проводили методом титрования на белых мышах по 6 животных на каждое разведение *virus fixe*. Наблюдение осуществляли в течение 14 сут; учитывали мышей, павших от бешенства с 5 по 14 сут. Расчет титра вируса проводили по Reed и Munch [128].

Определение специфической активности АИГ и его F(ab')₂-фрагментов *in vivo* проводили в РН вируса бешенства на белых мышах по методике, изложенной в руководстве ВОЗ [128]. Специфическую активность иммуноглобулина определяли одновременно с определением активности Международных стандартных образцов специфической активности иммуноглобулина человека против бешенства или СОП специфической активности АИГ. Расчет титра иммуноглобулина проводили согласно методике Reed и Muench, изложенной в руководстве ВОЗ «Методы лабораторных исследований по бешенству» [128].

3.2.3 Микробиологические методы

Определение стерильности иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади проводили методом прямого посева согласно нормативного документа Р N002639/01-250210 на указанное лекарственное средство.

Культивирование рекомбинантного штамма *E. coli* TG1 осуществляли при температуре (37±1) °С на агаре LB с добавлением ампициллина (50 ед/мл).

3.2.4 Биологические методы

Токсичность иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади определяли биологическим методом на морских свинках и белых мышах согласно нормативного документа Р N002639/01-250210 на указанное лекарственное средство.

Испытания на пирогенность иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади проводили биологическим методом согласно нормативного документа Р N002639/01-250210 на указанное лекарственное средство.

3.2.5 Иммунохимические методы

Прямой и непрямой ДИА с неферментным диагностикумом с наночастицами КЗ проводили для определения специфической активности иммунных сывороток и антира-

бического иммуноглобулина, используя общепринятую методику [234] с модификациями Л.А. Дыкмана с соавт. [64]. Для проведения прямого ДИА исследуемые образцы титровали в микротитровальных планшетах путем последовательных двукратных разведений в забуференном физиологическом растворе pH 9,0. Пробы наносили на НЦМ по 2 мкл, начиная с большего разведения. Мембрану с нанесенными образцами подсушивали при температуре (37 ± 2) °С, затем погружали в 1–3 % раствор БСА для блокирования свободных сайтов связывания и инкубировали при температуре (20 ± 2) °С в течение 15 мин. Далее мембрану трижды промывали в воде деионизованной в течение 1 мин, после чего наносили конъюгат. После выдерживания НЦ мембраны с диагностикумом в течение 1–3 ч и трехкратной промывки водой деионизованной в течение 1 мин учитывали результаты анализа. Для осуществления непрямого варианта ДИА на НЦ мембрану наносили в качестве антигена гликопротеид, изолированный из *virus fixe*, в количестве 2 мкл. Мембрану с ГП выдерживали до полного высушивания. Далее на мембрану наносили БСА и промывали ее, как описано выше. Исследуемые образцы наносили на мембрану по 2 мкл в виде последовательного ряда точек и инкубировали в течение 1 ч при температуре (37 ± 2) °С. После инкубации и промывки мембраны добавляли диагностикум на основе белка А и наночастиц КЗ. По истечении 1–3 ч учитывали результаты ДИА.

По окончании анализа титром специфических антител в исследуемом препарате считали наибольшее разведение образца, при котором в результате реакции с конъюгатом регистрировали четко различимое красное пятно. Для усиления цветового сигнала НЦ мембрану после окончания теста обрабатывали физическим проявителем. Раствор проявителя включал 0,2 % раствора нитрата серебра (40 мкл), 0,5 % раствора лимонной кислоты (400 мкл), 0,2 % раствор метола (1000 мкл). После обработки НЦ мембрану промывали водой деионизованной и подсушивали при температуре (20 ± 2) °С.

Постановку ИФА для оценки свойств культурального *virus fixe* и выделенного из него ГП осуществляли по общепринятой методике [68] с инструментальным учетом результатов с помощью автоматических многоканальных фотометров S/N 11153 iMark™ или BioRad Model 680 при длине волны 490 нм, производя расчет коэффициента специфичности (КС), равного отношению значения оптической плотности (ОП) продукта реакции в лунках с контрольным положительным антигеном или исследуемым материалом к ОП продукта реакции в лунках с контрольным отрицательным антигеном

(ОПср(К–). Реакцию считали положительной, если $КС \geq 2,1$ и отрицательной, если $КС < 2,1$.

Реакцию диффузной преципитации проводили для подтверждения видоспецифичности АИГ согласно нормативного документа Р N002639/01-250210 на указанное лекарственное средство с использованием сывороток, преципитирующих иммуноглобулины КРС, лошади, свиньи и человека.

3.2.6 Молекулярно-генетические методы

РНК *virus fixe* «Москва 3253» мозгового и культурального происхождения выделяли методом нуклеосорбции на силикагеле в присутствии гуанидинтиоцианата.

Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием метода получения кДНК на матрице РНК с применением обратной транскриптазы М-MLV, которая является РНК-зависимой ДНК полимеразой, обладающей РНК- и ДНК-полимеразной активностью [299].

ПЦР проводили с использованием следующих ингредиентов: стерильной деионизованной воды; минерального масла; раствора хлорида магния (50 или 25 мМоль); водного раствора дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) в концентрации 25 мМоль; 10-кратного буферного раствора; фермента Taq-полимеразы (термостабильной ДНК-полимеразы из штамма *Thermus aquaticus* УТ-1 в буферном растворе в концентрации 5 ед/мкл); праймеров (водного раствора олигонуклеотидов); контрольной кДНК (водного раствора кДНК); зонда формата TaqMan (водного раствора олигонуклеотида с флуоресцентными метками).

Фосфоамидитный метод использовали для синтеза праймеров и зонда на автоматическом синтезаторе ДНК «ASM-800» (ТОО «Биоссет», Россия).

Концентрацию праймеров и температуру отжига рассчитывали с использованием следующих формул:

$$K_{\text{нмоль / мкл}} = \frac{100 \times A_{260}}{1,54 \times nA + 0,75 \times nC + 1,17 \times nG + 0,92 \times nT}, \quad (1)$$

$$T_{\text{отжига}} = 2 \times (T+A) + 3 \times (C+G) - 5 \text{ (}^\circ\text{C)}, \quad (2)$$

где n – число соответствующих оснований;

A_{260} – коэффициент поглощения при длине волны, равной 260 нм;

A, C, T, G – дезоксирибонуклеотиды.

ПЦР осуществляли в микропробирках объемом 0,2 и 0,6 мл на программируемых термоциклерах «RotorGene 6000» и «Терцик МС 2»; амплификацию с праймерами Besh G и Besh L проводили с использованием состава реакционной смеси, включающего 17 пМоль каждого праймера; 0,2 мМоль дНТФ; 1 ед. фермента; 2,5 мМоль ионов Mg^{2+} . Программа термоциклирования включала предварительную денатурацию в течение 3 мин при температуре 94 °С; 35 циклов в режиме каждого из них: 30 с при температуре 94 °С, 30 с при температуре 58 °С, 30 с при температуре 72 °С; заключительную достройку комплементарной цепи в течение 3 мин при температуре 72 °С. Для анализа продуктов ПЦР применяли метод электрофореза в 1,5–2 % агарозном геле по рекомендациям Т. Маниатиса [122] и Л.А. Остермана [174], для чего по окончании программы реакционные смеси помещали в лунки агарозного геля и проводили электрофорез с использованием 1×ТАЕ–буфера (0,002 М ЭДТА; 0,04 М Трис-ацетат) в присутствии этидия бромида в концентрации 0,5 мкг/мл в течение 15–20 мин при градиенте напряжения 8 В/см. Учет результатов проводили визуально путем просмотра геля в ультрафиолетовом свете. Результаты электрофореза документировали с применением системы «GelDoc 2000».

Для очистки ампликонов использовали колонки «Centry-sep columns» («Pirceton separations», США) согласно инструкции производителя. Для этого по окончании ПЦР амплификационную смесь в объеме 20 мкл наносили на поверхность колонок, которые затем помещали в микропробирки (1,5 мл) и центрифугировали при 750 g в течение 2 мин. Очищенные ампликоны помещали в микропробирки.

Набор «pGEM-T Vector Systems» («Promega», США) использовали при клонировании ПЦР-продуктов в вектор pGEM-T. Полученные ампликоны лигировали с линейной ДНК вектора pGEM-T. Выделение плазмиды из полученной биомассы проводили с использованием набора PureYield Plasmid Miniprep Systems («Promega», США). Наличие клонированного фрагмента подтверждали в ПЦР с праймерами BeshG и BeshL. Специфичность наработанного фрагмента оценивали по результатам секвенирования с помощью генетического анализатора «SEQ-8000» («Beckman Coulter», США), для чего использовали стандартные протоколы пробоподготовки и программное обеспечение к прибору.

Кальциевый метод применяли для трансформации компетентных клеток *E. coli* TG1 лигазной смесью [43, 122]. Далее осуществляли селекцию рекомбинантных клонов,

для чего трансформанты выращивали на агаре LB с ампициллином (50 ед/мл) и ферментом X-Gal (50 мг/мл) при температуре 37 °С в течение 16 ч. Колонии клеток со вставкой рекомбинантной плазмиды pGEM-T с встроенным фрагментом ДНК характеризовались белым цветом, колонии не получивших плазмиду бактерий были голубыми. Далее с помощью петли отбирали с поверхности агара единичную изолированную колонию белого цвета и суспендировали ее в 0,5 мл воды очищенной, после чего суспензию прогревали в течение 10 мин при температуре 100 °С. Охлажденную до комнатной температуры суспензию подвергали центрифугированию в течение 1 мин при 12000 об/мин для осаждения дебриса. Супернатант в объеме 1 мкл использовали в ПЦР для дальнейшего отбора трансформантных клеток, применяя праймеры, специфичные к последовательности функциональной вставки. Выявление по окончании ПЦР на электрофореграмме фрагмента, совпадающего по размеру с длиной клонируемого ПЦР-продукта, служило критерием отбора.

Далее с поверхности агара отбирали изолированную колонию клеток рекомбинантного штамма *E. coli* TG1 pRV_{Moscow3253}G-L и пересеивали ее в жидкую среду LB с ампициллином объемом 5 мл с дальнейшим инкубированием в течение 16 ч с аэрацией при температуре 37 °С. Клетки осаждали центрифугированием, после чего лизировали и очищали, используя набор DNA Purification System («Promega», США). В результате было получено 100 мкл плазмидной ДНК в воде деионизованной. Спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Biowave II определяли количество ДНК, оценивая поглощение раствора при длинах волн 280 и 260 нм, с помощью программного обеспечения к прибору рассчитывали концентрацию ДНК.

Расчет количества геном-эквивалентов плазмиды pRV_{Moscow3253}G-L проводили по формуле:

$$K_{pRV_{Moscow\ 3253}G-L} = A \times 0,234 \times 10^{12} \text{ [ГЭ/мл]}, \quad (3)$$

где А – концентрация ДНК pRV_{Moscow3253}G-L, мкг/мл.

Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали генетическую базу данных GenBank NCBI. При подборе праймеров применяли программу PrimerExpress и алгоритм BLAST. Для выравнивания последовательностей использовали программу Mega 3.1. и алгоритм AlignX. Подбор зондов TaqMan проводили на интернет-сайте www.genscript.com в режиме онлайн.

3.2.7 Биохимические, физико-химические и биофизические методы

Для выделения ГП *virus fixe* из концентрированной и очищенной культуральной вирусной суспензии методом В. Dietzschold [318] использовали тритон X-100 в концентрации 2 %. Последующую хроматографическую очистку осуществляли гель-фильтрацией на TSK-геле HW-65. Методом электрофореза в 12 % ПААГ по Laemmli (1970) в присутствии додецилсульфата натрия в миниэлектрофорезной камере «НОEFER» (Германия) определяли молекулярную массу выделенного ГП относительно маркеров молекулярной массы – овальбумина (45 кДа) и БСА (67 кДа). Для выявления белков гели окрашивали Кумасси синим R-250 (Германия), углеводов – азотнокислым серебром с использованием набора «BioRad Silver Stain» (США).

Для конструирования диагностикума на основе ГП и наночастиц КЗ использовали метод нековалентной (адсорбционной) конъюгации Л.А. Дыкмана с соавт. [65], включающий следующие этапы: получение наночастиц золота с заданным размером; выявление «золотого числа», за которое принимали минимальное количество белка, предохраняющего золь от солевой агрегации; адсорбция наночастиц КЗ на иммунореагенте; вторичная стабилизация полученного конъюгата; концентрирование конъюгата; оптимизация конечного продукта для хранения.

Методом электропроводности (ЭП) [469] исследовали *Тэвт* раствора АИГ, используя в качестве контрольного раствора 0,9 % раствор хлорида натрия, *Тэвт* которого составляет минус 21 °С. Для определения *Тэвт* в стакан из плексигласа помещали 100 мл раствора АИГ, устанавливали в нем датчики удельного сопротивления и температуры, после чего замораживали образцы до температуры минус 70 °С с помощью холодильной установки HZ 280/175 А. В процессе оттаивания ледяного образца определяли удельное сопротивление, величина которого с повышением температуры уменьшалась. *Тэвт* исследуемого раствора соответствовала точке перехода от линейной зависимости сопротивления от температуры к криволинейной.

Методом ДСК проводили определение тепловых параметров иммуноглобулина с использованием ДСК-калориметра в диапазоне от температуры 20 °С до температуры минус 70 °С, при этом кристаллизации при замораживании АИГ соответствовали экзотермические пики, процессу плавлению при нагревании АИГ соответствовали эндотермические пики; при проведении анализа учитывали количество всех пиков. Предварительно ДСК-калориметр был откалиброван по шести стандартам высокой чистоты –

висмут (99,9995 %), олово (99,999 %), индий (99,999 %), ртуть (99,99 %), ц-гексан (99,96 %), бифенил (99,5 %) для соответствия определяемой с помощью калориметра температуры международной шкале. Для проведения опытов применяли алюминиевые контейнеры объемом 40 мкл с крышкой (25 мкл). По составленной температурной программе проводили сканирование, при этом на места «образец» и «образец сравнения» в калориметре помещали пустые алюминиевые тигли. В дальнейшем на место «образец» в измерительную ячейку помещали предварительно загруженные и запечатанные алюминиевые тигли с исследуемыми образцами АИГ; на месте «образец сравнения» в измерительной ячейке оставался пустой алюминиевый тигель. Образцы раствора АИГ взвешивали на весах с погрешностью $\pm 0,01$ мг; масса образцов для ДСК-анализа составила от 0,63 до 1,43 мг. Сканирование исследуемых образцов проводили в атмосфере аргона в автоматическом режиме. Для охлаждения образцов использовали жидкий азот. ДСК-кривые обрабатывали в соответствии с программами, входящими в комплект технического обеспечения ДСК-калориметра.

Методом колоночной гель-хроматографии согласно ФС 42-3874-99 [246] определяли содержание агрегатов, мономеров и фрагментов в антирабическом иммуноглобулине. С помощью проточного спектрофотометра «Увикорд СП» при длине волны 280 нм определяли величину оптической плотности каждой фракции, для записи профилей элюции использовали двухканальный самописец модели 2210. Количественный анализ хроматограмм проводили с применением метода нормирования [80].

Определение прозрачности и цветности АИГ осуществляли спектрофотометрическим методом согласно ФС 42-3874-99 [246] с помощью колориметра фотоэлектрического концентрационного при длине волны соответственно 540 нм (максимум поглощения для мутных растворов) и 400 нм (максимум поглощения гемоглобина).

Содержание остаточного этанола определяли методом газовой хроматографии в соответствии ГФ РФ 12 изд., вып. I [47] с использованием портативного газового хроматографа ПГФ-1.

Определение остаточного риванола в иммуноглобулине проводили по методике, изложенной в МУК 4.1/4.2.588-96 [145].

Методом с биуретовым реактивом в соответствии с ФС 42-3874-99 [246] определяли содержание белка.

Определение ПМВ осуществляли согласно МУК 4.1/4.2.588-96 [145].

Время растворения лиофилизированного АИГ определяли в соответствии с ГФ РФ 12 изд., вып. I [47].

Метод электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы согласно ФС 42-3874-99 [246] использовали для определения однородности иммуноглобулина.

Потенциометрическим методом согласно ГФ РФ 12 изд., вып. I [47] определяли концентрацию водородных ионов (рН).

3.2.8 Статистические методы обработки результатов исследований

Для статистической обработки результатов исследований применяли стандартные методики [14] с вычислением средней арифметической (M); средней ошибки средней арифметической (m). Вычисления проводили с использованием программ Statistica 6 (Statsoft Inc.), Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation).

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 4 НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ МАСШТАБНОГО ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА ФИКСИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА «МОСКВА 3253» НА КЛЕТКАХ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ VERO

4.1 Отработка условий адаптации вируса бешенства «Москва 3253» к клеткам перевиваемой линии Vero

На сегодняшний день производители гетерологичного АИГ в ряде стран, в том числе России, для иммунизации животных-продуцентов используют органо-тканевой рабический антиген на основе ткани мозга зараженных животных, что сопряжено с риском образования в организме продуцентов антимозговых цитотоксических антител [224]. Присутствие таких балластных антител крайне нежелательно в иммунной сыворотке, используемой для производства антирабического иммуноглобулина. В связи с этим важнейшим направлением совершенствования качества антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади является переход к использованию на этапе иммунизации животных культурального рабического антигена на основе *virus fixe*, репродуцированного *in vitro*.

Возбудитель бешенства, являясь облигатным нейротропным вирусом, практически не накапливается при его первичном внесении в культуру клеток внутренних органов и для размножения *virus fixe* в клетках экстраневрального происхождения необходима его предварительная адаптация. По экспериментальным данным М.А. Селимова, адаптация штаммов высоконеуротропного фиксированного вируса, каким является «Москва 3253», требует больших усилий по сравнению с адаптацией уличных штаммов [208].

В наших исследованиях в качестве системы для культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» используется перевиваемая клеточная линия Vero. Выбор данной линии обусловлен рядом существенных преимуществ, описанных выше в главе 2, п. 2.1. Гетероплоидная перевиваемая линия клеток зеленой мартышки Vero, аттестованная в Российской Федерации согласно требованиям ВОЗ для производства иммунобиологических препаратов [237, 257] – одна из самых распространенных в мире для производства профилактических антирабических средств и применяется для этих целей уже более трех десятков лет [283, 391, 447, 475, 526, 545, 559].

Для адаптации *virus fixe* штамма «Москва 3253» к данной линии использовали прием чередующихся пассажей *in vivo*, *in vitro*. Клетки Vero выращивали стационарным методом в культуральных матрасах Т-25, Т-75 при температуре (37 ± 1) °С в атмосфере с содержанием углекислого газа 5 % в течение 72 ч. Состояние клеточного монослоя оценивали методом фазово-контрастной микроскопии с помощью инвертированного микроскопа. Клетки первоначально заражали вирусом, полученным из мозга инфицированных кроликов. Вирус инокулировали на монослой, занимающий не менее 80 % от нижней поверхности культурального матраса, из которого предварительно забирали среду культивирования и с помощью раствора DPBS промывали клеточный монослой. За 10 мин до внесения *virus fixe* для улучшения адсорбции вируса поверхность монослоя клеток обрабатывали протамина сульфатом (0,1 мг/мл). После удаления среды с протамином сульфата клетки инфицировали *virus fixe* в заражающей дозе 0,01–1,0 ЛД₅₀/кл. После внесения вирусосодержащей жидкости и ее равномерного распределения по внутренней поверхности флакон помещали в СО₂-инкубатор при температуре (37 ± 1) °С на 30–40 мин для адсорбции вируса. По окончании адсорбции во флакон вносили среду 199 (поддерживающую) с добавлением человеческого сывороточного альбумина в концентрации 0,1 % и антибиотиков пенициллина и стрептомицина по 100 ед/мл и культивировали вирус в течение 96 ч при температуре (37 ± 1) °С и рН $(7,0\pm 0,2)$. В ходе опыта был испытан способ заражения клеток в суспензию, для чего после открепления клеток с поверхности флакона их суспендировали в поддерживающей среде 199 с добавлением ЧСА и антибиотиков в указанных выше концентрациях, при этом концентрация клеток от $0,5\times 10^6$ до $1,0\times 10^6$ кл/мл явилась оптимальной. При заражении клеточной суспензии ее также предварительно обрабатывали протамина сульфатом (конечная концентрация 0,1 мг/мл) для усиления адсорбции вируса к поверхности клеток, выдерживая суспензию в условиях СО₂-инкубатора с 5 % содержанием СО₂ при температуре (37 ± 1) °С в течение 15–30 мин. Далее к клеточной суспензии добавляли вирусосодержащую жидкость в заражающей дозе 0,1–1,0 ЛД₅₀ на 1 клетку, при этом объем добавляемой вирусосодержащей жидкости составлял не более 2 мл при использовании флаконов Т-25 и не более 6 мл при использовании флаконов Т-75. При необходимости добавляли среду 199 до конечного объема. После пяти последовательных пассажей исследовали активность *virus fixe* титрованием вируса на белых мышах с выражением в lg ЛД₅₀/мл [128]. В ходе опыта выявлено, что при первых 20 пассажах вирус практически не накапливался, до 30-го

пассажа инфекционный титр вируса составлял менее 2 lg ЛД₅₀/мл и только к 37-му пассажу повысился до уровня (3,57±0,21) lg ЛД₅₀/мл, что позволило говорить об активации процесса адаптации *virus fixe* «Москва 3253» к перевиваемым клеткам Vero. С целью повышения титра инфекционности 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±0,32) lg ЛД₅₀/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 ЛД₅₀/мл. Результаты опыта отражены в Таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Инфекционный титр *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» в процессе адаптации к клеткам перевиваемой линии Vero (n=3)

Номер пассажа вируса на клетках Vero	Инфекционный титр, lg ЛД ₅₀ /мл
1–19	Менее 1
20	1,26±0,19
25	1,55±0,27
30	2,29±0,34
37	3,57±0,21
47	4,34±0,32
62	4,33±0,05

Для выявления оптимальных условий репродукции фиксированного вируса бешенства производственного штамма «Москва 3253» при стационарном способе культивирования оценивали влияние дозы и способов заражения, значения температуры на инфекционный титр вируса. Как описано выше, заражение осуществляли двумя способами – в монослой и суспензию различными дозами вируса – 0,01; 0,1; 1,0 ЛД₅₀/кл; вирус культивировали на клетках при значениях температуры (33±1) и (37±1) °С. В результате эксперимента была выявлена оптимальная заражающая доза вируса, которая составила 0,1 ЛД₅₀/кл, титр инфекционности вируса имел значения (4,34±0,32) lg ЛД₅₀/мл в случае заражения клеточной суспензии и (4,14±0,09) lg ЛД₅₀/мл в случае заражения вирусом клеточного монослоя. Отметим, что для культивирования вируса *virus fixe* стационарным методом приемлемы оба температурных режима (Таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Влияние дозы и способа заражения клеток Vero, температуры культивирования на инфекционный титр культурального *virus fixe* «Москва 3253» (n=3)

Способ заражения клеток вирусом	Температура культивирования, °С	Заражающая доза, ЛД ₅₀ /кл	Инфекционная активность <i>virus fixe</i> , lg ЛД ₅₀ /мл
В суспензию	33±1	0,01	2,14±0,24
	33±1	0,1	4,34±0,32
	33±1	1,0	3,52±0,20
	37±1	0,01	2,21±0,17
	37±1	0,1	4,15±0,34
	37±1	1,0	3,38±0,19
В монослой	33±1	0,01	1,62±0,28
	33±1	0,1	4,14±0,09
	33±1	1,0	3,24±0,15
	37±1	0,01	1,41±0,32
	37±1	0,1	3,86±0,22
	37±1	1,0	3,08±0,13

Инфекционную активность *virus fixe* «Москва 3253» подтверждали выявлением цитопатического действия (ЦПД) вируса на клеточный монослой, оцениваемого визуально при фазово-контрастной микроскопии. Цитопатический эффект, вызываемый вирусом бешенства при культивировании *in vitro*, описан в ряде исследований [307, 327]. Цитопатическим действием вируса бешенства «Москва 3253» на клетки линии Vero считали визуально регистрируемые изменения морфологии клеток, выражающиеся в их фрагментации, отторжении от стекла, симпластообразовании. Характерная деструкция монослоя клеток была зафиксирована после 25 пассажа (Рисунок 4.1).

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 4.2).

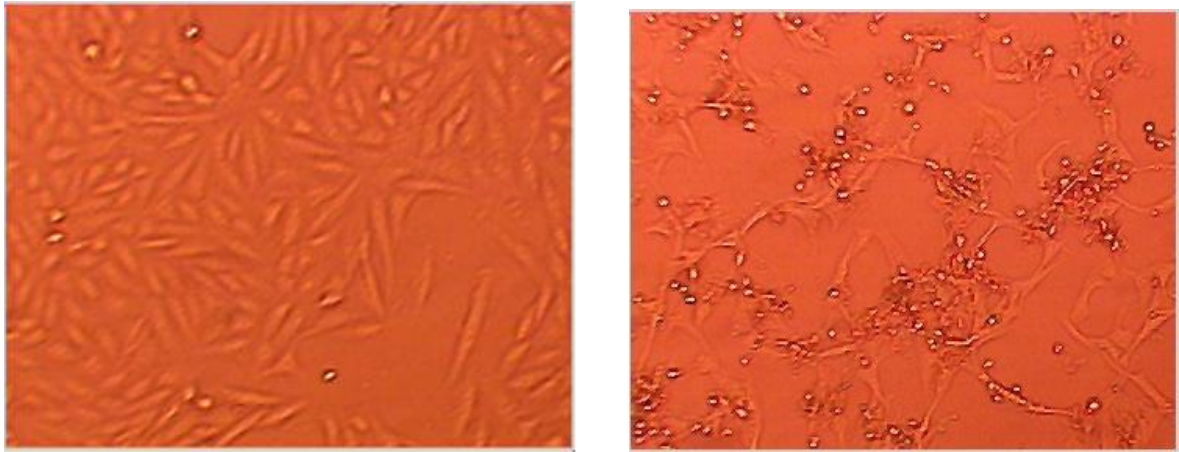
*a**б*

Рисунок 4.1 – Фазово-контрастная микроскопия интактного (*a*) и инфицированного вирусом бешенства «Москва 3253» (*б*) монослоя клеточной культуры Vero (увеличение 1×200), 96 ч культивирования

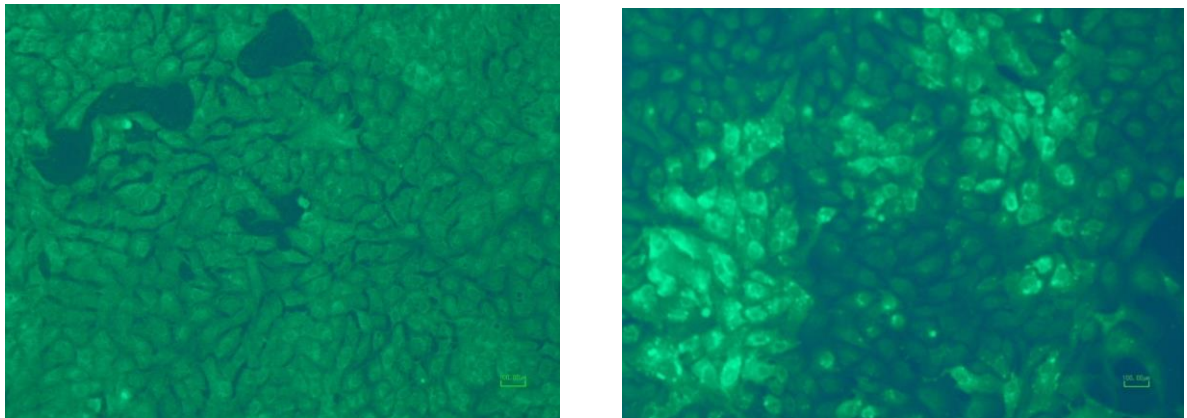
*a**б*

Рисунок 4.2 – Люминесцентная микроскопия интактного (*a*) и инфицированного вирусом бешенства «Москва 3253» (*б*) монослоя клеточной культуры Vero после 48 ч культивирования (увеличение 1×200 ; окрашивание специфической сывороткой, меченой ФИТЦ)

Таким образом, в результате поочередных пассажей проведена адаптация *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» к клеткам перевиваемой линии Vero и экспериментально обоснованы оптимальные условия репродукции вируса стационарным методом. Наиболее эффективна инокуляция вируса в клеточную суспензию в заражающей дозе $0,1 \text{ ЛД}_{50}/\text{мл}$. Репродукцию вируса на клетках Vero целесообразно проводить при температуре (33 ± 1) или $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 96 ч в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 .

4.2 Экспериментальное обоснование оптимальных технологических параметров масштабного культивирования вируса бешенства производственного штамма «Москва 3253» на клетках Vero суспензионным и псевдосуспензионным способами в биореакторе

Репродукция *virus fixe* стационарным методом в монослойных клеточных культурах не позволяет получать вирусосодержащий материал в больших объемах и для увеличения выхода вирусного материала необходимы более эффективные методы. В биотехнологической практике для крупномасштабного производства ИПП достаточно широко используют метод выращивания суспензионных клеточных культур, впервые описанный в 1953 г. О. Owens [446]. Метод основан на способности клеток к размножению в свободно суспендированном состоянии при выращивании в жидкой среде. При таких условиях клетки размножаются, не прикрепляясь к стенкам культурального сосуда благодаря постоянному перемешиванию среды.

С целью усовершенствования процесса репродукции *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» *in vitro* на клетках линии Vero, подразумевающего получение больших объемов вирусного урожая, дальнейшие наши исследования были направлены на отработку оптимальных параметров масштабного выращивания клеток и вируса суспензионным и псевдосуспензионным методами. Решение данной задачи было реализовано с применением биореактора BioG-M Plus объемом 5 дм³ с лопастной мешалкой типа «морской винт», которая обеспечивает достаточно интенсивное перемешивание, не травмируя клетки. Неоспоримым преимуществом применения биореактора является автоматизация контроля параметров культивирования, что способствует стандартизации технологических этапов репродукции вируса *in vitro*.

При выращивании клеток линии Vero суспензионным методом посевную культуру готовили из клеточного монослоя, полученного стационарным методом на культуральных матрасах с площадью поверхности 150 см². По окончании процедуры открепления клеток проводили их центрифугирование в течение 15 мин при 1500 об/мин и ресуспендирование полученного осадка в питательной среде. Полученную суспензию в количестве 200 мл помещали в биореактор с 2 дм³ ростовой среды, при этом значение конечной посевной концентрации клеток имело величину $0,5 \times 10^5$ кл/мл. Для стимуляции роста клеток к ростовой среде добавляли нормальную или фетальную сыворотку КРС в конечной концентрации 10 % или, для подавления роста посторонней микрофлоры – по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина. Во избежание агрегации

клеток во время культивирования к ростовой среде Игла MEM был добавлен трипсин (2 мкг/мл). Температура культивирования клеток составляла (37 ± 1) °С; значение pH – $(7,2\pm 0,2)$. Температуру в биореакторе поддерживали путем подачи в рубашку биореактора воды, предварительно нагретой на водяной бане. Коррекция pH в процессе культивирования осуществлялась автоматически с помощью добавления раствора бикарбоната натрия в концентрации 1 моль/л или ацетатного буферного раствора в концентрации 0,2 моль/л.

В ходе экспериментов выявили оптимальную скорость перемешивания, которая составила 80–100 об/мин. Скорость вращения мешалки оказывает существенное влияние на эффективность роста: при снижении ее скорости возможно оседание клеток, а также частичная адсорбция к внутренней поверхности сосуда. Излишне высокая скорость перемешивания – 200 об/мин и более может привести к деформированию и гибели клеток. В процессе культивирования осуществляли периодическую аэрацию: в течение 30 мин в среду через стерильный фильтр насосом подавали воздух, содержащий 5 % CO₂, затем подачу воздуха отключали на 2 ч. Оптимальный срок культивирования клеток составил 60 ч.

Исследования показали, что при использовании в качестве ростовой добавки 10 % фетальной сыворотки КРС выход клеток после 60 ч культивирования суспензионным методом составил $2,0 \times 10^5$ кл/мл (Рисунок 4.3).

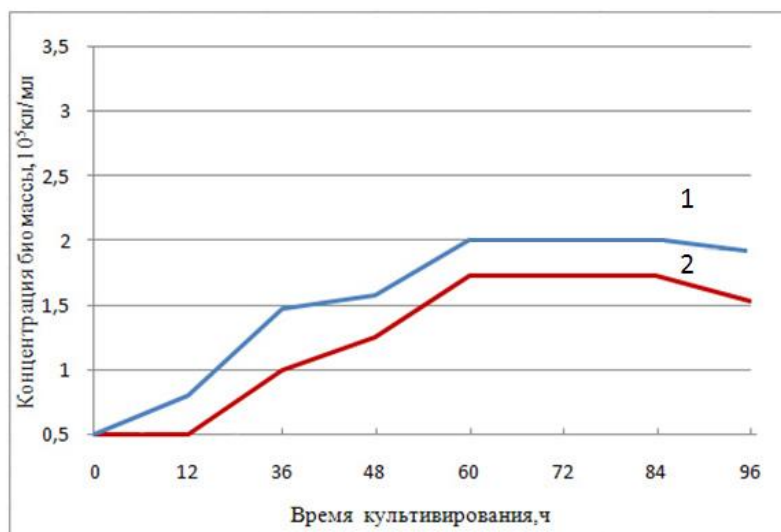


Рисунок 4.3 – Динамика накопления клеток Vero в суспензии при использовании различных ростовых добавок

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

Добавление в ростовую среду 10 % нормальной сыворотки КРС при тех же параметрах выращивания позволило получить урожай клеток $1,7 \times 10^5$ кл/мл (Рисунок 4.3), что вполне приемлемо для дальнейшего накопления вируса в суспензии.

После накопления клеток производили их заражение вирусом бешенства в дозе 0,05–0,2 ЛД₅₀/кл инокуляцией вирусосодержащей суспензии в биореактор с культивируемыми клетками. Поддерживающую среду 199 доливали в сосуд через 30 мин после заражения, конечный объем был равен 5 дм³. Для поддержания роста клеток добавляли нормальную сыворотку КРС в конечной концентрации 1, 2, 5 % либо ЧСА в конечной концентрации 0,1 %; антибиотики по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина ингибировали рост нежелательной микрофлоры. Культивирование вируса на клетках осуществляли в течение 96 ч при температуре (33±1) °С, скорости перемешивания 100 об/мин, рН (7,2±0,2). Как свидетельствовали результаты эксперимента, при использовании в качестве стимулирующей добавки к поддерживающей среде ЧСА в конечной концентрации 0,1 % активность вируса при множественности заражения 0,1 ЛД₅₀/кл составила (4,41±0,28) lg ЛД₅₀/мл. Титр инфекционности *virus fixe* при культивировании зараженных клеток на среде 199 с сывороткой КРС в конечной концентрации 5, 2, 1 % при аналогичной множественности заражения имел значение (4,38±0,33), (4,27±0,26), (3,83±0,32) lg ЛД₅₀/мл соответственно (Таблица 4.3).

Таблица 4.3 – 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 ₅₀ /кл	Инфекционный титр <i>virus fixe</i> , lg ЛД ₅₀ /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

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.

При выращивании клеток Vero и *virus fixe* псевдосуспензионным методом использовали аналогичное аппаратное оформление, применяемое для суспензионного культивирования. Особенностью данного способа является выращивание клеток не в объеме среды, а на поверхности микроносителей. Создание van Wezel в 1967 г. микроносителей на основе гранул декстрана (сефадекса А-50) явилось прорывом в технологии культивирования клеток в монослое [533]. Микроносители – мелкие сферические гранулы, на поверхности которых происходит рост и деление клеток. Когда клетки растут на мелких носителях, они могут рассматриваться как клеточные суспензии и для их выращивания могут применяться те же процессы и аппаратура, разработанные для суспензионных культур. Преимущества культивирования вируса бешенства на микроносителях описаны многими зарубежными авторами [336, 380, 439, 442, 475, 559].

В настоящее время коммерчески доступно множество типов микроносителей. Практические исследования связаны преимущественно с микроносителями Cytodex. Выбор микроносителей этого типа обусловлен предпочтением к сухому продукту, который может быть аккуратно взвешен и затем подготовлен *in situ*, а также низкой плотностью этого продукта ($1,03 \text{ г/см}^3$), что важно для поддержания микроносителей во взвешенном состоянии и позволяющей использовать их в концентрации до 15 г/л ($90000 \text{ см}^2/\text{л}$). Однако наше расположение к Cytodex не снижает ценности других микроносителей, многие из которых могут быть использованы с равным успехом. В нашей стране создано несколько видов микроносителей, наиболее изученными из которых в практике вирусологических исследований оказались Цитолар-1 и Цитолар-2. Уфимскими биотехнологами ГУП «Иммунопрепарат» показана возможность крупномасштабного культивирования вакцинного вируса бешенства Внуково-32 в культуре перевиваемых клеток Vero на микроносителях Цитолар-2 [244].

Для псевдосуспензионного культивирования вируса бешенства «Москва 3253» использовали микроносители Cytodex-3. Для приготовления посевной клеточной суспензии использовали однослойную культуру, выращенную стационарным методом на культуральных матрасах с площадью ростовой поверхности 150 см^2 . После процедуры открепления клеток осуществляли их центрифугирование в течение 15 мин при 1500 об/мин, по окончании которого проводили ресуспендирование полученного осадка в ростовой среде. Полученную суспензию клеток (200 мл) с посевной дозой $0,5 \times 10^5$ кл/мл добавляли к 2 дм^3 ростовой среды с предварительно внесенными микро-

носителями, концентрация которых имела значение $(2,5 \pm 0,5)$ г/л. При культивировании в первые 8 ч для стимулирования адсорбции клеток к поверхности микроносителей среду в реакторе перемешивали в следующем режиме: 1 мин со скоростью вращения мешалки 50 об/мин, затем остановка мешалки на 30 мин. По окончании процесса адсорбции в биореактор добавляли ростовую среду с фетальной сывороткой КРС в концентрации 10 % до конечного объема 5 дм^3 и продолжали культивирование клеток при постоянной скорости вращения мешалки 80 об/мин.

Культивирование клеток линии Vero на микроносителях псевдосуспензионным методом осуществляли при условиях, аналогичных таковым при использовании суспензионного способа: температура – (37 ± 1) °С; pH – $(7,2 \pm 0,2)$; подача CO_2 – в первые 2 ч культивирования.

Изображения, полученные с помощью фазово-контрастной микроскопии, иллюстрируют процесс прикрепления клеток Vero к микроносителям в процессе культивирования псевдосуспензионным способом (Рисунок 4.4).

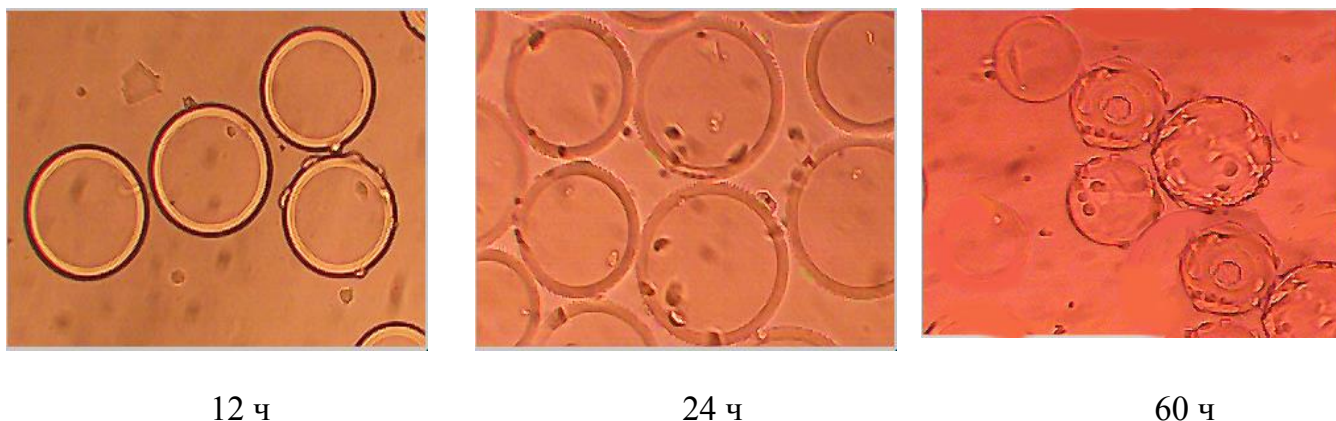


Рисунок 4.4 – Микроносители Cytodex-3 с клетками Vero через 12, 24 и 60 ч культивирования (фазово-контрастная микроскопия, увеличение 1×100)

Как и при суспензионном способе культивирования, оптимальное время культивирования клеток на микроносителях составило 60 ч. При выращивании клеток линии Vero в ростовой среде с добавлением фетальной сыворотки КРС в конечной концентрации 10 % 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 4.5).



Рисунок 4.5 – 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 %).

После накопления клеток Vero останавливали процесс культивирования и после оседания на дно биореактора микроносителей из сосуда удаляли ростовую среду Игла MEM. Далее для культивирования зараженных клеток использовали поддерживающую среду 199 с добавлением стимулирующих добавок, аналогичных таковым при суспензионном способе культивирования. Сначала в объеме среды 1 дм^3 осуществляли заражение клеток вирусом, множественность заражения соответствовала 0,05; 0,1; 0,2 ЛД₅₀/кл. Адсорбция вируса к клеткам протекала при температуре $(33 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, скорость вращения мешалки биореактора составляла 50 об/мин. По окончании процесса адсорбции добавляли питательную среду 199 до конечного объема 5 дм^3 и при скорости вращения мешалки 75 об/мин продолжали культивирование зараженных клеток. Температура культивирования соответствовала $(33 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$; значение pH – $(7,2 \pm 0,2)$. После 96 ч культивирования проводили определение титра инфекционной активности вируса *in vivo* на белых мышах.

В Таблице 4.4 приведены результаты эксперимента по определению титра вируса, культивированного псевдосуспензионным способом при различных дозах заражения клеток и составе поддерживающей среды.

Таблица 4.4 – 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 ₅₀ /кл	Инфекционный титр <i>virus fixe</i> , lg ЛД ₅₀ /мл			
	ЧСА, 0,1 %	сыворотка КРС, 5 %	сыворотка КРС, 2 %	сыворотка КРС, 1 %
0,05	4,32±0,36	4,45±0,35	4,42±0,08	3,82±0,32
0,1	4,62±0,28	4,51±0,17	4,68±0,13	4,19±0,27
0,2	4,54±0,31	4,40±0,34	4,51±0,33	4,17±0,34

Как видно из Таблицы 4.4, заражающая доза 0,1 ЛД₅₀/кл явилась оптимальной при псевдосуспензионном культивировании зараженных клеток на поддерживающей среде со стимулирующими добавками ЧСА в концентрации 0,1 % или сыворотки КРС в концентрациях 5, 2, 1 %, инфекционный титр *virus fixe* имел значение (4,62±0,28); (4,51±0,17); (4,68±0,13); (4,19±0,27) lg ЛД₅₀/мл соответственно.

Таким образом, в результате исследований отработаны условия масштабного культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero в биореакторе. При использовании биореактора возможна реализация как суспензионного, так и псевдосуспензионного способов культивирования. Вирус бешенства при оптимальных условиях культивирования накапливался в титре более 4,0 lg ЛД₅₀/мл, что свидетельствует о возможности применения суспензионного и псевдосуспензионного методов для масштабного выращивания вируса *in vitro* для приготовления рабического антигена.

4.3 Экспериментальное обоснование оптимальных технологических параметров масштабного культивирования вируса бешенства производственного штамма «Москва 3253» на клетках Vero роллерным способом

В промышленной биотехнологии для масштабного выращивания вирусов *in vitro* широкое применение находит роллерный способ культивирования [243, 288]. Для реализации данного способа используют вращающиеся цилиндрические сосуды – роллерные бутылки, установленные на специальные стеллажно-ярусные аппараты. Преимуществами роллерного способа являются экономичный расход питательных сред и высокий выход целевого продукта – клеток или вирусов [265, 365]. При роллерном культивиро-

вании для роста клеток доступна практически вся площадь внутренней поверхности бутылки и, в зависимости от положения сосуда, каждая часть поверхности монослоя поочередно соприкасается с питательной средой.

На первом этапе наших исследований по отработке условий роллерного культивирования клеток Vero и вируса осуществляли подбор оптимальной частоты вращения роллерных сосудов. Данный параметр весьма критичен: при низкой скорости вращения увеличивается период соприкосновения клеток с газовой фазой, что ведет к ухудшению условий их роста и питания. Наоборот, слишком частое вращение может препятствовать прикреплению клеток к внутренней поверхности роллерной бутылки. Для выявления оптимальной частоты вращения роллерных бутылок была проведена серия экспериментов по культивированию клеточной культуры Vero.

При выращивании клеток линии Vero роллерным способом посевную культуру готовили из клеточного монослоя, полученного стационарным методом на культуральных матрасах с площадью поверхности 150 см^2 , как описано выше. В роллерную бутылку с площадью поверхности 850 см^2 вносили ростовую среду в количестве 200 мл с фетальной сывороткой КРС в конечной концентрации 10 % и антибиотиками стрептомицином и пенициллином и добавляли клеточную суспензию в конечной посевной концентрации $0,5 \times 10^5$ кл/мл. Клетки культивировали 72 ч при температуре $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$. Частоту вращения бутылок изменяли в диапазоне от 0,3 до 2,5 об/мин. По окончании культивирования определяли индекс пролиферации как отношение концентрации полученных живых клеток к исходной. Результаты опыта иллюстрирует Рисунок 4.6.

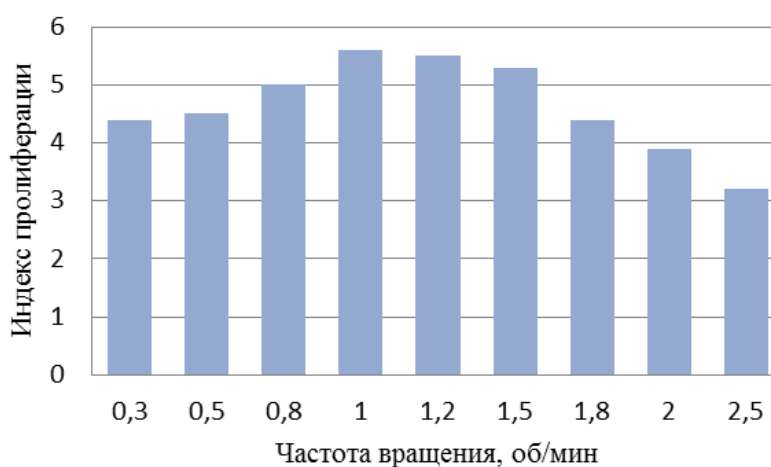


Рисунок 4.6 – Зависимость пролиферативной активности клеток линии Vero от скорости вращения роллерных бутылок

В ходе эксперимента выявлено, что наименее эффективной являлась высокая скорость вращения бутылей, оказавшая негативное влияние на рост популяции клеток. При культивировании 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 бутылки. При частоте вращения 0,3 и 0,5 об/мин на вторые либо третьи сутки культивирования наблюдали гибель клеток. На наш взгляд, 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 культивировании клеток роллерным способом необходимо учитывать и такой фактор, как соотношение поверхности монослоя к объему питательной среды. Для решения данной задачи проведено выращивание клеточной культуры на роллерных бутылках с площадью поверхности 850 см² и 1700 см² с использованием различного объема ростовой среды. Выращивание проводили в течение 72 ч при температуре 37 °С при частоте вращения роллерных бутылей 1,0 об/мин. Опытным путем установлено, что для культивирования клеток Vero на роллерных сосудах с площадью ростовой поверхности 850 см² достаточно от 150 до 200 мл питательной среды; при выращивании на роллерных бутылках с площадью ростовой поверхности 1700 см² необходимо 400 мл ростовой среды.

Для выявления оптимального периода культивирования клеток роллерным способом нами была проведена серия экспериментов с продолжительностью выращивания до 7 сут, отличающихся начальной посевной концентрацией клеток, составляющей от $0,2 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^5$ кл/мл. В опыте были использованы роллерные сосуды с площадью ростовой поверхности 850 и 1700 см².

Полученные результаты свидетельствуют, что культивирование клеток на роллерных бутылках с площадью поверхности 850 см² целесообразно проводить в течение 72 ч при начальной посевной концентрации $0,5 \times 10^5$ кл/мл. В случае использования роллерных сосудов с площадью ростовой поверхности 1700 см² 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 4.7).

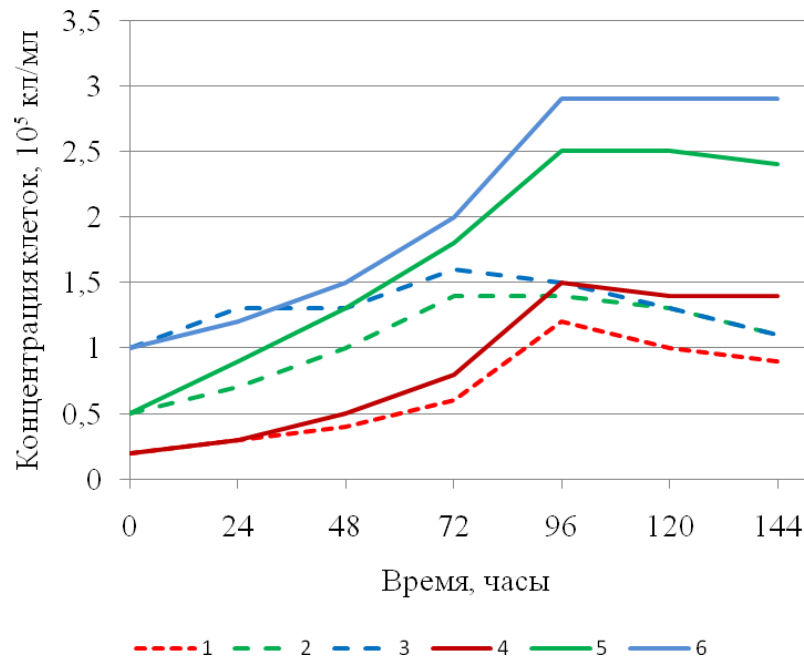


Рисунок 4.7 – Динамика роста клеток Vero при культивировании роллерным способом в зависимости от начальной концентрации клеток и площади ростовой поверхности роллерных бутылей

- 1 – начальная концентрация $0,2 \times 10^5$ кл/мл, роллерные бутыли 850 см^2 ;
- 2 – начальная концентрация $0,5 \times 10^5$ кл/мл, роллерные бутыли 850 см^2 ;
- 3 – начальная концентрация $1,0 \times 10^5$ кл/мл, роллерные бутыли 850 см^2 ;
- 4 – начальная концентрация $0,2 \times 10^5$ кл/мл, роллерные бутыли 1700 см^2 ;
- 5 – начальная концентрация $0,5 \times 10^5$ кл/мл, роллерные бутыли 1700 см^2 ;
- 6 – начальная концентрация $1,0 \times 10^5$ кл/мл, роллерные бутыли 1700 см^2 .

На дальнейшем этапе исследований отработывали условия накопления вируса бешенства роллерным способом. Клетки Vero заражали вирусом бешенства «Москва 3253», адаптированным к данной линии. В эксперименте 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 бутыли. Множественность заражения соответствовала $0,1 \text{ ЛД}_{50}/\text{кл}$. Адсорбцию вируса проводили при температуре $37 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, после чего к зараженным клеткам добавляли поддерживающую питательную среду 199 с $0,1 \%$ содержанием ЧСА или 5% содержанием сыворотки КРС. Указанные добавки, помимо стимулирующей, обладают и функцией защиты вируса от температурной инактивации [311]. Конечный объем культуральной суспензии в роллерной бутыли составлял от 200 до 400 мл.

В первые сутки выращивания устанавливали скорость вращения роллерных бутылей на уровне от 0,3 до 0,5 об/мин, далее частоту вращения сосудов увеличивали до 1,5 об/мин. Процесс репродукции *virus fixe* осуществляли при температуре 32 и 37 °С в течение 96 ч.

Инфекционную активность вируса исследовали *in vivo* на белых мышах. Кроме того, уровень накопления вируса в культуральной жидкости оценивали в ИФА с применением коммерческого набора для лабораторной диагностики вируса бешенства (г. Казань). Выбор метода обоснован возможностью дальнейшего применения полученных результатов для стандартизации количества вируса бешенства в инактивированном материале, предназначенном для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки. Надо отметить, что ИФА успешно применяется в биотехнологической практике для определения активности субстанций, содержащих вирус бешенства, в том числе антирабических вакцин, а результаты данного теста коррелируют с общепринятым методом оценки иммуногенности антирабических вакцин на животных [52, 69, 250, 252]. При определении антигенной активности культуральных вакцин наиболее часто рекомендуемым и применяемым является сэндвич-вариант ИФА [250, 252]. Использование ИФА для оценки репродукции вируса бешенства также обосновано сокращением времени исследования, соответствием рекомендациям ВОЗ [554, 555] и принципам биоэтики, которые рекомендуют замещение методов с использованием животных методами *in vitro* [88]. В Таблице 4.5 представлены результаты эксперимента по оценке уровня накопления вируса бешенства при роллерном культивировании.

Таблица 4.5 – 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, °С	Титр инфекционной активности <i>in vivo</i> , lg ЛД ₅₀ /мл	Титр вируса в ИФА
В монослой	32	3,1±0,5	1:64–1:128
	37	2,9±0,3	1:64
В суспензию	32	4,6±0,3	1:256–1:512
	37	4,1±0,3	1:256

Как видно из Таблицы 4.5, при способе заражения клеток в суспензию и значении температуры культивирования, равной 32 °С, зарегистрирован наибольший уровень накопления *virus fixe* – титр в ИФА составил 1:256–1:512, инфекционная активность вируса, выявленная *in vivo*, соответствовала $(4,6 \pm 0,3) \lg \text{ЛД}_{50}$.

При отработке роллерного способа культивирования вируса в эксперименте оценивали величину инфекционного титра *virus fixe* в зависимости от множественности заражения и времени культивирования. Заражение осуществляли в суспензию клеток с концентрацией 10^6 кл/мл в дозе 0,01; 0,1; 1,0 ЛД₅₀/кл. Культивирование осуществляли при 32 °С в течение 7 сут. Динамику накопления вируса оценивали в ИФА, начиная с 3 сут культивирования. В Таблице 4.6 представлены результаты эксперимента.

Таблица 4.6 – Уровень накопления *virus fixe* «Москва 3253» при роллерном выращивании в зависимости от множественности заражения и времени культивирования (n=3)

Множественность заражения, ЛД ₅₀ /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

Как видно из Таблицы 4.6, заражающая доза 0,01 ЛД₅₀/кл обусловила увеличение времени накопления вируса бешенства на 1–2 сут по сравнению с культивированием при множественности заражения 0,1 и 1,0 ЛД₅₀/кл, при которых оптимальный период культивирования *virus fixe* «Москва 3253» составил 5 сут. Дальнейшее культивирование не способствовало повышению выхода вируса.

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, является основой для изготовления культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов в производстве гетерологичного АИГ.

4.4 Разработка биотехнологических приемов по очистке и концентрированию вирусного материала

Фиксированный вирус бешенства, культивированный *in vitro* реакторным или роллерным способом, как правило, уступает по активности и иммуногенности вирусу, полученному из ткани мозга зараженного животного, что обуславливает увеличение иммунизирующей дозы на этапе получения иммунной крови продуцентов [419]. В наших исследованиях величина инфекционного титра культурального вируса зарегистрирована на уровне 4,6 lg ЛД₅₀/мл и для повышения иммуногенности культурального *virus fixe* был необходим этап концентрирования вирусного урожая.

Одним из перспективных направлений, применяемых в технологиях концентрирования антигенов, является их концентрирование тангенциальной (кросс-флоу) ультрафильтрацией. В настоящее время можно выделить несколько типов фильтрующих элементов для систем кросс-флоу: плоскорамный (кассетный), рулонный, трубчатый, половолоконный, керамический. В биофармацевтической промышленности наиболее распространены установки с плоскорамными фильтрующими элементами. Такие фильтрационные установки имеют минимальный «мертвый» объем жидкой фазы, остающийся в системе, за счет чего их применение экономически выгоднее, поскольку зачастую иммунобиологические профилактические препараты имеют достаточно высокую цену. Преимуществом плоскорамных фильтрационных элементов является возможность их линейного масштабирования: отработав технологию на лабораторной установке, полученные данные можно использовать для расчета экспериментально-производственной и промышленной установок [97]. Подобрав мембранные модули с определенным размером пор, можно концентрировать биологические субстанции с различными молекулярными массами без значительных потерь исходного продукта [97, 262]. Вышеперечисленные преимущества определили перспективность использования способа концентрирования и очистки инактивированной культуральной суспензии *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» с применением установки тангенциальной ультрафильтрации Vivaflow 200, снаряженной полипропиленовыми мембранами. В ходе проведения опытов по концентрированию и очистке инактивированного вирусного материала перед нами стояла задача отработки гидродинамического режима фильтрации и выбора оптимального значения номинальной отсечки по молекулярной массе (НОММ) для используемых мембран. В опыте была использована инактивированная культуральная

суспензия *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» объемом 5,0 дм³. Процедуру инактивации *virus fixe* выполняли согласно МУ 3.3.1.1099-2002 [143] добавлением в суспензию фенола (0,5 %) с последующим выдерживанием суспензии в течение 1 сут при 37 °С. Технологический процесс концентрирования складывается из ряда последовательно выполняющихся операций, представленных на Рисунке 4.8.

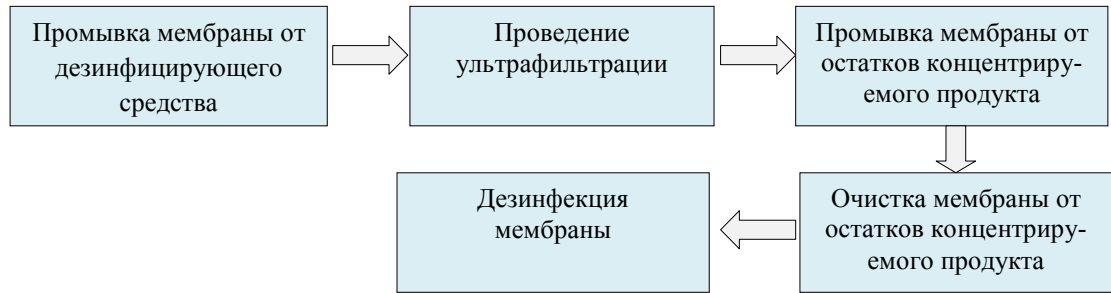


Рисунок 4.8 – Блок-схема технологического процесса концентрирования инактивированного вирусного материала ультрафильтрацией кросс-флоу

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. На Рисунке 4.9 представлены установка для фильтрации кросс-флоу и направления потоков подачи исходного продукта и выхода фильтрата.

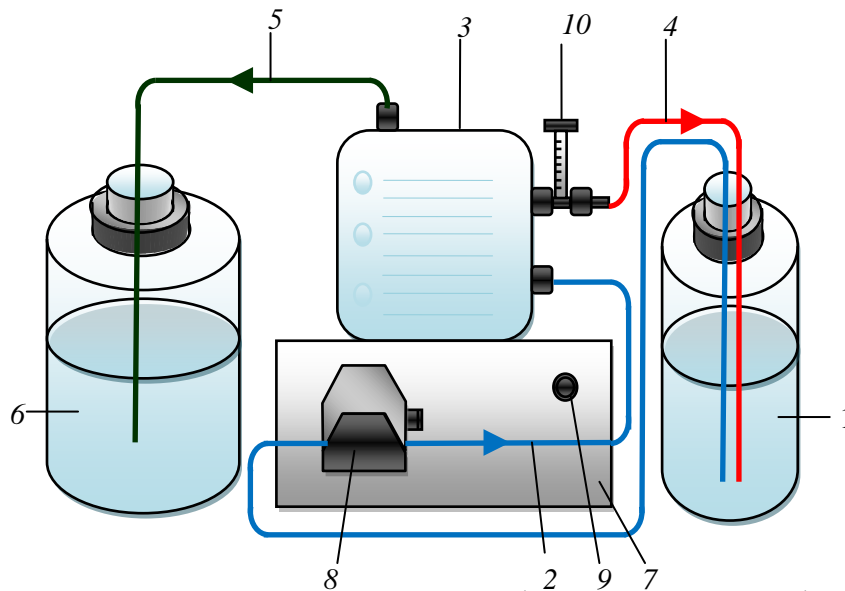


Рисунок 4.9 – Установка для фильтрации кросс-флоу

1 – концентрируемый целевой продукт; 2 – линия подачи исходного продукта на модуль; 3 – фильтрационный модуль; 4 – линия возврата концентрируемой суспензии; 5 – линия выхода фильтрата; 6 – сосуд для сбора отработанного фильтрата; 7 – насос перистальтический; 8 – головка насоса перистальтического; 9 – устройство для регулировки давления; 10 – датчик давления.

Критерием окончания процесса концентрирования являлось уменьшение как минимум в 50 раз объема обрабатываемого продукта. По окончании процесса исследовали удельную скорость фильтрации и свойства концентрируемого продукта: концентрацию вируса бешенства в фильтрате и концентрате, содержание белка, прозрачность. По значениям данных показателей была определена эффективность баромембранного процесса (Таблица 4.7).

Как показывают 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 методом ПЦР-РВ регистрировали концентрацию вируса $7,14 \times 10^7$ ГЭ/мл (до концентрирования – $9,69 \times 10^6$ ГЭ/мл), а средняя удельная скорость фильтрации была наибольшей – $72,4 \text{ дм}^3/\text{м}^2/\text{ч}$. Использование мембраны с величиной НОММ 1000 кДа неэффективно, концентрирование в этом случае не происходит и, как свидетельствовали результаты ПЦР-РВ, вирус бешенства в целевом продукте отсутствовал.

Эффективность процесса фильтрации во многом определяется значением трансмембранного давления. Для установления оптимальной величины давления при концентрировании культуральной жидкости «кросс-флоу» баромембранный процесс проводили с использованием мембраны с НОММ 300 кДа. Результаты эксперимента иллюстрирует Рисунок 4.10.

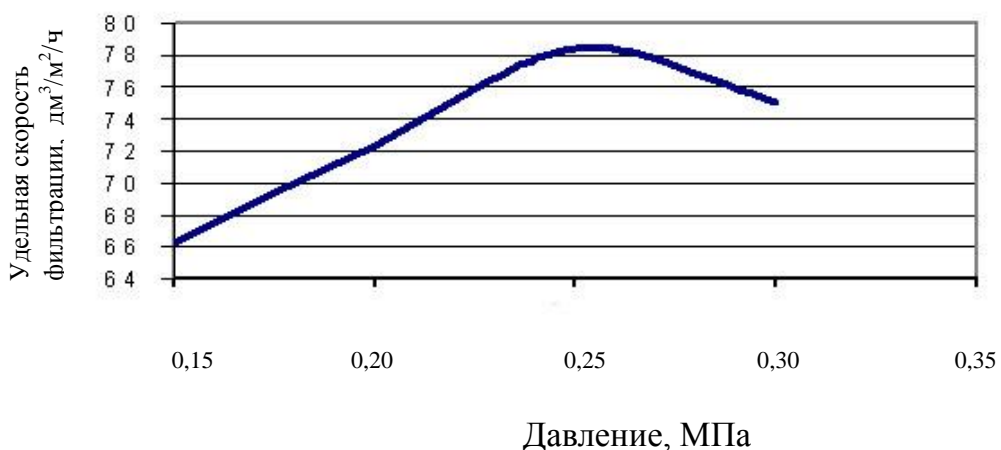


Рисунок 4.10 – Влияние величины давления на удельную скорость ультрафильтрации

Таблица 4.7 – Эффективность концентрирования инактивированной культуральной суспензии *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на установке тангенциальной ультрафильтрации Vivaflow 200 в зависимости от величины номинальной отсечки по молекулярной массе используемых мембран

Наименование показателя	Показатели ультрафильтрации с использованием мембранных модулей с различными значениями НОММ														
	10 кДа			30 кДа			100 кДа			300 кДа			1000 кДа		
	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К
Содержание <i>virus fixe</i> , выявленное в до-иммуноанализе, обратный титр	40	не обнаружено	5000	40	не обнаружено	5000	40	не обнаружено	5000	40	не обнаружено	5000	40	40	не обнаружено
Содержание белка, %	0,72	0,36	9,38	0,72	0,36	9,32	0,72	0,36	9,57	0,72	0,43	9,1	0,72	0,43	2,1
Прозрачность	0,352	0,275	1,384	0,352	0,275	1,384	0,352	0,243	1,342	0,352	0,374	1,143	0,352	0,312	0,223
Концентрация <i>virus fixe</i> по результатам ПЦР-РВ, ГЭ/мл	9,69 × 10 ⁶	не обнаружено	6,84 × 10 ⁷	9,69 × 10 ⁶	не обнаружено	6,72 × 10 ⁷	9,69 × 10 ⁶	не обнаружено	5,79 × 10 ⁷	9,69 × 10 ⁶	не обнаружено	7,14 × 10 ⁷	9,69 × 10 ⁶	9,60 × 10 ⁶	не обнаружено
Средняя удельная скорость фильтрации, дм ³ /м ² /ч	38,2			45,0			58,3			72,4			94,5		

Примечание: Ц – инактивированная исходная суспензия культурального *virus fixe*;
 К – концентрат;
 Ф – фильтрат.

В эксперименте показано, что тангенциальную ультрафильтрацию целесообразно проводить при величине давления, равной $(0,25 \pm 0,01)$ МПа, при этом условии процесс протекает достаточно эффективно – средняя удельная скорость фильтрации составляет $(78,2 \pm 0,2)$ $\text{дм}^3/\text{м}^2/\text{ч}$.

Таким образом, для концентрирования культуральной инактивированной суспензии *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» целесообразно использовать метод ультрафильтрации кросс-флоу с применением мембран с номинальной отсечкой, не превышающей 300 кДа, при давлении $(0,25 \pm 0,01)$ МПа. Критерием окончания процесса концентрирования является уменьшение объема обрабатываемого продукта, как минимум, в 50 раз. Концентрирование вирусной суспензии позволило увеличить концентрацию в ней вируса бешенства до уровня, сопоставимым с таковым в органо-тканевом антигене. На Рисунке 4.11 представлены результаты исследования в ИФА проб вирусной суспензии, отобранных на различных этапах культивирования, а также по окончании концентрирования в сравнении с мозговым антигеном.

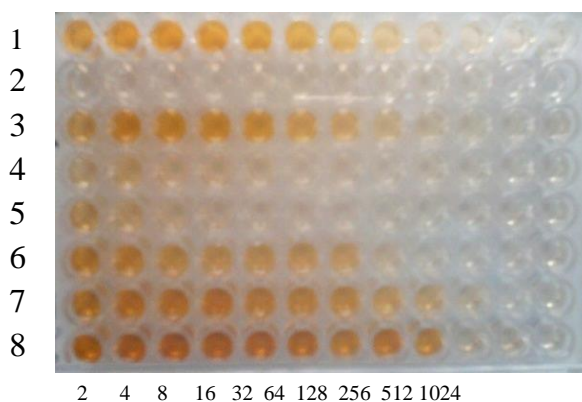


Рисунок 4.11 – Результаты ИФА при исследовании вирусного материала

- 1 – положительный контроль (К+) из ИФА-набора;
- 2 – отрицательный контроль (К-) из ИФА-набора;
- 3 – органо-тканевой антиген, титр 1:512;
- 4, 5 – вирусная суспензия на этапах роллерного культивирования, титр 1:16–1:32;
- 6 – вирусный урожай после роллерного культивирования, титр 1:256;
- 7, 8 – концентрированный вирусный урожай, титр 1:512.

В Таблице 4.8 обобщены данные по определению методом ИФА содержания вируса бешенства в культуральной жидкости в процессе культивирования на клеточной ли-

нии, в вирусном урожае до и после концентрирования в сравнении с органо-тканевым рабическим антигеном. Для исследования были использованы 5 образцов 10 % суспензии ткани мозга кролика после заражения *virus fixe*; вирусный материал, полученный пассированием стационарным методом на культуре клеток Vero – 5 образцов; вирусный материал, полученный при культивировании вируса суспензионным методом на клетках Vero – 9 образцов; вирусный материал, полученный при культивировании роллерным методом на клетках Vero – 9 образцов; вирусный урожай, полученный при культивировании вируса на клетках роллерным методом после концентрирования – 3 образца. Кроме этого, были исследованы 2 образца сбора культуральной жидкости после культивирования незараженных клеток.

Таблица 4.8 – Результаты ИФА по определению содержания вируса бешенства в образцах вирусного материала органо-тканевого и культурального происхождения

Наименование образца	Значение ОП исследуемого образца в наибольшем разведении	Среднее значение ОП отрицательного контрольного образца/ ОП _{ср(К-)} × 2,1	Результат реакции
1	2	3	4
Органо-тканевой антиген кролика, образец № 1	0,202	0,085/0,178	Положительный в титре 1:512
Органо-тканевой антиген кролика, образец № 2	0,270	0,094/0,196	Положительный в титре 1:512
Органо-тканевой антиген кролика, образец № 3	0,303	0,097/0,203	Положительный в титре 1:1000
Органо-тканевой антиген кролика, образец № 4	0,426	0,085/0,178	Положительный в титре 1:1000
Органо-тканевой антиген кролика, образец № 5	0,257 0,253	0,107/0,225 0,113/0,238	Положительный в титре 1:1000
Вирусный материал, полученный пассированием стационарным методом, пассаж № 127	0,192 0,191	0,058/0,121 0,057/0,120	Положительный в титре 1:128
Вирусный материал, полученный пассированием стационарным методом, пассаж № 129	0,275 0,284	0,058/0,121 0,057/0,120	Положительный в титре 1:128
Вирусный материал, полученный пассированием стационарным методом, пассаж № 130	0,379 0,377	0,094/0,196 0,097/0,203	Положительный в титре 1:256
Вирусный материал, полученный пассированием стационарным методом, пассаж № 138	0,257 0,253	0,107/0,225 0,113/0,238	Положительный в титре 1:128

1	2	3	4
Вирусный материал, полученный пассированием стационарным методом, пассаж № 140	0,398 0,396	0,107/0,225 0,113/0,238	Положительный в титре 1:256
Вирусная суспензия, суспензионный метод, образец от 20.05.2012 г.	0,224 0,228	0,058/0,121 0,057/0,120	Положительный в титре 1:32
Вирусная суспензия, суспензионный метод, образец от 22.05.2012 г.	0,198 0,195	0,058/0,121 0,057/0,120	Положительный в титре 1:64
Вирусный урожай, полученный суспензионным методом, образец от 24.05.2012 г.	0,199 0,205	0,058/0,121 0,057/0,120	Положительный в титре 1:64
Вирусная суспензия, суспензионный метод, образец от 15.10.2012 г.	0,223 0,227	0,085/0,178 0,083/0,174	Положительный в титре 1:64
Вирусная суспензия, суспензионный метод, образец от 17.10.2012 г.	0,362 0,362	0,085/0,178 0,083/0,174	Положительный в титре 1:128
Вирусный урожай, полученный суспензионным методом, образец от 19.10.2012 г.	0,596 0,588	0,085/0,178 0,083/0,174	Положительный в титре 1:128
Вирусная суспензия, суспензионный метод, образец от 10.12.2012 г.	0,253 0,257	0,085/0,178 0,083/0,174	Положительный в титре 1:32
Вирусная суспензия, суспензионный метод, образец от 12.12.2012 г.	0,462 0,460	0,085/0,178 0,083/0,174	Положительный в титре 1:64
Вирусный урожай, полученный суспензионным методом, образец от 14.12.2012 г.	0,196 0,199	0,085/0,178 0,083/0,174	Положительный в титре 1:128
Культуральная вирусодержащая суспензия через 24 ч после заражения (роллерное культивирование) от 28.05.2013 г.	0,324 0,321	0,097/0,203 0,099/0,208	Положительный в титре 1:32
Культуральная вирусодержащая суспензия через 48 ч после заражения (роллерное культивирование) от 29.05.2013 г.	0,454 0,459	0,097/0,203 0,099/0,208	Положительный в титре 1:64
Вирусный урожай, полученный методом роллерного культивирования от 31.05.2013	0,391 0,388	0,097/0,203 0,099/0,208	Положительный в титре 1:256
Культуральная вирусодержащая суспензия через 24 ч после заражения (роллерное культивирование) от 01.10.2013 г.	0,362 0,366	0,094/0,196 0,097/0,203	Положительный в титре 1:64
Культуральная вирусодержащая суспензия через 48 ч после заражения (роллерное культивирование) от 02.10.2013 г.	0,426 0,428	0,094/0,196 0,097/0,203	Положительный в титре 1:128
Вирусный урожай, полученный методом роллерного культивирования от 04.10.2013	0,248 0,250	0,094/0,196 0,097/0,203	Положительный в титре 1:256

1	2	3	4
Культуральная вирусосодержащая суспензия через 24 ч после заражения (роллерное культивирование) от 08.10.2013	0,291 0,293	0,107/0,225 0,113/0,238	Положительный в титре 1:32
Культуральная вирусосодержащая суспензия через 72 ч после заражения (роллерное культивирование) от 10.10.2013	0,303 0,304	0,107/0,225 0,113/0,238	Положительный в титре 1:128
Вирусный урожай, полученный методом роллерного культивирования (96 ч) от 11.10.2013 г.	0,254 0,254	0,107/0,225 0,113/0,238	Положительный в титре 1:256
Вирусный урожай после концентрирования, образец № 6	0,192 0,191	0,058/0,121	Положительный в титре 1:512
Вирусный урожай после концентрирования, образец № 7	0,271 0,265	0,107/0,225 0,113/0,238	Положительный в титре 1:1000
Вирусный урожай после концентрирования, образец № 8	0,400 0,396	0,107/0,225 0,113/0,238	Положительный в титре 1:512
Сбор культуральной жидкости с незараженных клеток, образец № 9	0,075 0,084	0,058/0,121	Отрицательный
Сбор культуральной жидкости с незараженных клеток, образец № 10	0,100 0,096	0,058/0,121	Отрицательный

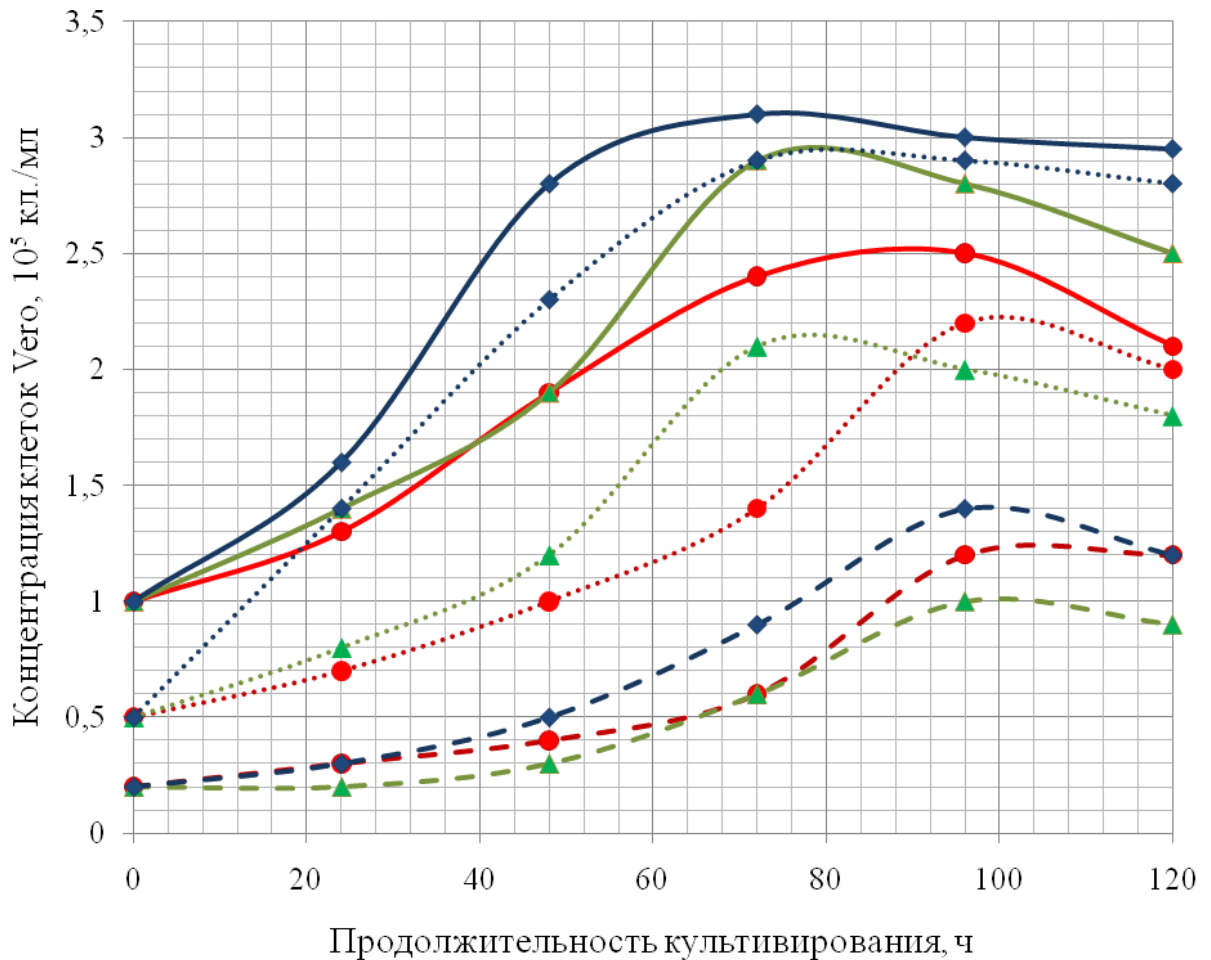
По результатам ИФА, содержание вируса бешенства в органо-тканевом антигене кролика соответствовало титрам 1:512–1:1000; 1:128–1:256 – в вирусном материале, полученном пассированием стационарным методом на культуре клеток Vero; 1:32–1:128 – в вирусной суспензии при суспензионном методе культивирования на клетках Vero; 1:32–1:256 – в вирусном урожае, полученном при роллерном культивировании вируса на культуре клеток Vero; 1:512–1:1000 – в вирусном урожае после концентрирования.

Таким образом, результаты исследования содержания *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» в мозговом и культуральном вирусном материале позволяют сделать вывод об эффективности способа тангенциальной фильтрации для концентрирования вирусной суспензии.

4.5 Сравнительный анализ эффективности накопления клеток Vero и вируса бешенства «Москва 3253» при масштабном культивировании *in vitro*

При сравнении эффективности суспензионного, псевдосуспензионного и роллерного методов масштабного культивирования клеток Vero и вируса бешенства «Москва 3253» исследовали накопление клеточной биомассы в зависимости от начальной посевной концентрации, значения которой составили $(0,2 \pm 0,05) \times 10^5$, $(0,5 \pm 0,05) \times 10^5$ и

$(1,0 \pm 0,05) \times 10^5$ кл./мл. Культивирование осуществляли в течение 120 ч. Сравнительная динамика накопления клеток показана на Рисунке 4.12.



- Роллерное культивирование, начальная концентрация клеток $0,2 \times 10^5$ кл./мл
- Роллерное культивирование, начальная концентрация клеток $0,5 \times 10^5$ кл./мл
- Роллерное культивирование, начальная концентрация клеток $1,0 \times 10^5$ кл./мл
- ▲— Суспензионное культивирование, начальная концентрация клеток $0,2 \times 10^5$ кл./мл
- ▲·· Суспензионное культивирование, начальная концентрация клеток $0,5 \times 10^5$ кл./мл
- ▲— Суспензионное культивирование, начальная концентрация клеток $1,0 \times 10^5$ кл./мл
- ◆— Псевдосуспензионное культивирование, начальная концентрация клеток $0,2 \times 10^5$ кл./мл
- ◆·· Псевдосуспензионное культивирование, начальная концентрация клеток $0,5 \times 10^5$ кл./мл
- ◆— Псевдосуспензионное культивирование, начальная концентрация клеток $1,0 \times 10^5$ кл./мл

Рисунок 4.12 – Сравнение эффективности методов культивирования клеток Vero при различных посевных концентрациях

Анализируя представленные результаты, можно говорить о том, что псевдосуспензионный способ культивирования дает максимальный выход клеточной биомассы в сравнении с анализируемыми методами при равных значениях посевной концентрации.

Полученные данные можно объяснить высокой общей площадью ростовой поверхности микроносителей.

При сравнении суспензионного и роллерного методов культивирования было выявлено преимущество последнего при начальной концентрации клеток, равной $(0,2 \pm 0,05) \times 10^5$ кл/мл. При увеличении начальной концентрации до $(0,5 \pm 0,05) \times 10^5$ кл/мл существенных отличий в отношении величины максимального выхода клеточной биомассы не регистрировали. Дальнейшее увеличение посевной концентрации до $(1,0 \pm 0,05) \times 10^5$ кл/мл приводило к более эффективным результатам при использовании суспензионного метода. Следует отметить, что при культивировании клеток псевдосуспензионным и суспензионным способами при посевных концентрациях $(0,5 \pm 0,05) \times 10^5$ и $(1,0 \pm 0,05) \times 10^5$ кл/мл накопление клеточной биомассы до максимальных значений происходило быстрее, чем при роллерном культивировании.

При анализе полученных данных нами было сделано заключение, что при культивировании клеток Vero любым из предложенных способов оптимальной посевной концентрацией клеток является $(0,5 \pm 0,05) \times 10^5$ кл/мл, увеличение начальной концентрации до $(1,0 \pm 0,05) \times 10^5$ кл/мл для всех исследуемых методов ведет к снижению индекса пролиферации, а при роллерном и суспензионном способах нами отмечено увеличение скорости отмирания клеток к концу наблюдаемого срока культивирования.

В экспериментах по исследованию эффективности рассматриваемых методов выращивания *virus fixe* «Москва 3253» на клетках Vero множественность заражения соответствовала 0,1 ЛД₅₀/кл. Культивирование вируса на клетках осуществляли на питательной среде 199 с 5 % содержанием сыворотки КРС или 0,1 % содержанием ЧСА. Длительность процесса культивирования составила 7 сут, для оценки динамики накопления *virus fixe* использовали сэндвич-вариант ИФА.

Результаты эксперимента представлены в Таблице 4.9.

Таблица 4.9 – Сравнение эффективности методов культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero

Метод культивирования	Среда культивирования	Накопление вируса* в зависимости от длительности культивирования, сут				
		3	4	5	6	7
Суспензионный	199 с 0,1 % содержанием ЧСА	3,7±1,4	4,3±1,4	5,0±0,0	5,7±1,4	6,0±0,0
	199 с 5 % содержанием сыворотки КРС	3,7±1,4	4,3±1,4	4,3±1,4	4,7±1,4	5,0±0,0
Псевдосуспензионный	199 с 0,1 % содержанием ЧСА	4,0±0,0	4,7±1,4	5,3±1,4	5,7±1,4	6,7±1,4
	199 с 5 % содержанием сыворотки КРС	3,7±1,4	4,3±1,4	4,7±1,4	5,7±1,4	6,7±1,4
Роллерный	199 с 0,1 % содержанием ЧСА	3,7±1,4	4,3±1,4	5,0±0,0	5,7±1,4	6,7±1,4
	199 с 5 % содержанием сыворотки КРС	3,7±1,4	4,7±1,4	5,7±1,4	6,7±1,4	7,0±0,0

Примечание: * уровень накопления *virus fixe* выражен в Ig_2 реципрокных титров ИФА; уровень вероятности доверительного интервала средней величины $p = 95 \%$.

Согласно полученным результатам, уровни накопления вируса бешенства в культуральной жидкости к концу срока культивирования при псевдосуспензионном и роллерном способах существенно не различались. Суспензионный способ культивирования несколько уступает псевдосуспензионному и роллерному способам в отношении накопления вируса бешенства, что может являться следствием снижения жизнеспособности клеток, находящихся в суспензии. Следует отметить, что использование в качестве фактора роста нормальной сыворотки КРС взамен дорогостоящего ЧСА не оказывает заметного влияния на титр вируса в культуральной жидкости в условиях псевдосуспензионного и роллерного культивирования.

При равнозначном выходе целевой биомассы использование роллерного способа представляется менее затратным по сравнению с псевдосуспензионным способом, поскольку отсутствует необходимость использования микроносителей, стоимость которых достаточно высока. Кроме того, работа с роллерной установкой не требует круглосуточного наблюдения за процессом культивирования вируса, что предусмотрено при использовании биореактора в силу требований биологической безопасности при работе с ПБА.

Тем не менее, освоенный нами псевдосуспензионный метод культивирования вируса бешенства на культуре клеток Vero также может быть применим при масштабном получении культурального рабического антигена.

Таким образом, полученные результаты позволяют оценить роллерный способ культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» *in vitro* на клетках Vero как наиболее практически реализуемый в сравнении с суспензионным и псевдосуспензионным способами культивирования в биореакторе при производстве препарата АИГ с применением культуральных технологий.

4.6 Разработка системы мероприятий по предупреждению контаминации микоплазмами клеточной культуры и готового продукта, полученного с применением культуральных технологий

При работе с культурой клеток всегда присутствует риск спонтанного заражения клеток микоплазмами, источником которых могут быть как сами сотрудники лабораторий, так и используемые в работе питательные среды и различные стимулирующие добавки. При микоплазменной контаминации существует тенденция распространения ее на другие клеточные культуры, с которыми проводят работу в лаборатории. Микоплазменная инфекция в латентной форме не сопровождается видимыми изменениями клеток и без проведения специальных исследований по выявлению микоплазм, как правило, остается незаметной [219, 282]. При острой инфекции наблюдаются пикноз и деструкция клеток, изменения клеточного метаболизма и митотической активности [133]. По некоторым данным, первичные клеточные культуры оказываются пораженными микоплазмами примерно в 1 % случаев, а средняя зараженность длительно пассируемых клеточных линий достигает 15–30 % [241]. Присутствие в клетках микоплазм снижает чувствительность к репродукции в них вирусов, что имеет важное значение не только при проведении научных исследований, но и при получении антигенов, используемых для приготовления ИЛП [185]. Из-за высокой контагиозности и серьезного воздействия на функции клетки-хозяина Европейская Коллекция клеточных культур животных рекомендует проведение систематического контроля за состоянием клеточных линий и немедленное уничтожение пораженных микоплазмами клеток [241].

В связи с вышеизложенным мы считаем, что 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 ми-

коплазм, а также соблюдение комплекса правил по предупреждению контаминации микоплазмами указанных объектов.

Обнаружить микоплазмы в биологических объектах позволяют культуральный и альтернативные методы. Первый основан на культивировании образцов биологического материала на селективных жидких или плотных питательных средах в аэробных и анаэробных условиях. К альтернативным методам относится ПЦР, а также гибридизация РНК микоплазм с флуоресцентно-мечеными зондами и определение активности ферментов метаболизма микоплазм [241]. Данные методы могут применяться в сочетании с люминесцентной микроскопией после окраски по Ноеchst. Для экспресс контроля микоплазм в лабораториях в основном используют ПЦР [243]. Данный метод является более чувствительным и специфичным для прямого определения микоплазм в культуре клеток при низких затратах труда, времени и средств, его достоинствами являются объективность интерпретации, воспроизводимость и документальная обоснованность результатов. Мы также сочли вполне обоснованным выбор метода ПЦР в качестве контрольного при тестировании нижеперечисленных образцов на микоплазменную контаминацию.

В исследование были взяты образцы клеток перевиваемой линии Vero, ростовых сред и стимулирующих добавок, используемых при культивировании клеток и вируса, культуральная вирусосодержащая жидкость, а также образцы экспериментальных серий АИГ из сывороток крови кролика, иммунизированного культуральным рабическим антигеном.

Тестирование осуществляли с использованием ПЦР-набора «PCR Mycoplasma Test Kit» (AppliChem GmbH, Германия). Особенностью набора является наличие универсальных праймеров на гены 23S и 16S рРНК микоплазм, имеющих высокую степень гомологии с микоплазмами различных видов, наиболее часто поражающих культуры клеток. Выделение микоплазм осуществляли согласно инструкции производителя из 1 мл исследуемого образца. Исследуемые пробы подвергали термолизису путем прогрева при 95 °С в течение 3 мин. Реакцию амплификации проводили в микропробирках объемом 0,6 мл. Общий объем исследуемой пробы в реакции составлял 50 мкл, состоящий из 35 мкл деионизированной воды, 10 мкл реакционной смеси из ПЦР-набора, 5 мкл исследуемого образца или контрольных образцов (К+, К-). Реакцию амплификации проводили на термоциклере «Терцик» по следующим параметрам:

94 °С – 30 с	}	35 циклов
94 °С – 30 с		
60 °С – 120 с		
72 °С – 60 с		
94 °С – 30 с		
60 °С – 120 с		
72 °С – 5 мин		

Продукты амплификации анализировали методом гель-электрофореза в 2 % агарозном геле при напряжении 180 В в течение 40 мин с использованием маркеров «FastRuler» Low Range с размером фрагментов 50 п.н., 200 п.н., 400 п.н., 850 п.н. и 1500 п.н. Размер фрагмента исследуемых на наличие микоплазм проб и К+ (из ПЦР-набора) составил 270 п.н.

На Рисунке 4.13 представлены результаты ПЦР-анализа образцов питательных сред Игла MEM и 199 и стимулирующих добавок, используемых при культивировании клеток и вируса бешенства. Как показали результаты ПЦР-тестирования, все исследованные образцы ростовых сред и стимулирующих добавок свободны от микоплазм.

Однако наибольший интерес представлял ПЦР-контроль клеток линии Vero, используемых при культивировании вируса бешенства. Для исследования были отобраны 12 образцов клеток различных пассажей. Результаты ПЦР-анализа представлены на Рисунке 4.14.

Как видно на Рисунке 4.14, три из двенадцати исследованных образцов клеток перевиваемой линии Vero оказались контаминированы микоплазмами. Данные пассажи клеток были немедленно уничтожены с последующим проведением деконтаминационных мероприятий.

На следующем этапе наших исследований проанализированы образцы вирусного материала для иммунизации продуцентов и конечный целевой продукт. Результаты анализа представлены на Рисунке 4.15.

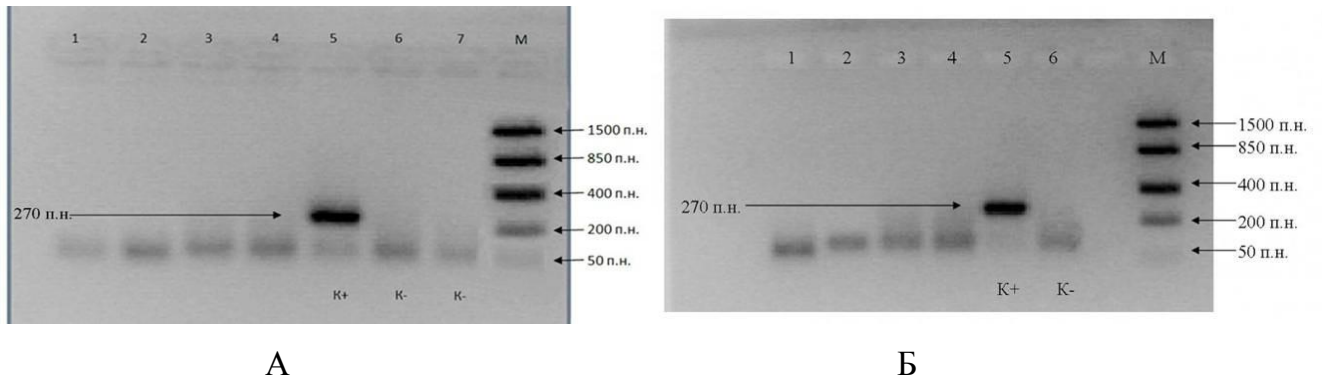


Рисунок 4.13 – Результаты ПЦР-анализа образцов питательных сред и ростовых добавок на наличие микоплазм

А. 1 – среда питательная Игла MEM (серия М-12-04 от 22.05.2012); 2 – среда питательная Игла MEM (серия М-13-01 от 12.02.2013); 3 – среда поддерживающая 199 (серия 9-12-05 от 27.04.2012); 4 – среда поддерживающая 199 (серия 9-13-06 от 14.05.2013); 5 – К(+) – из ПЦР-набора; 6, 7 – К(-) вода деионизованная; М – маркер молекулярных весов.

Б. 1 – фетальная сыворотка серии SV30160.03 (лот № 1395 от 05.03.2013); 2 – сыворотка крови КРС (серия Б-12-02 от 07.04.2012); 3 – сыворотка крови КРС (серия Б-12-25 от 07.11.2012); 4 – ЧСА (серия 12-01 от 12.02.2013); 5 – К(+) – из ПЦР-набора; 6 – К(-) вода деионизованная; М – маркер молекулярных весов.

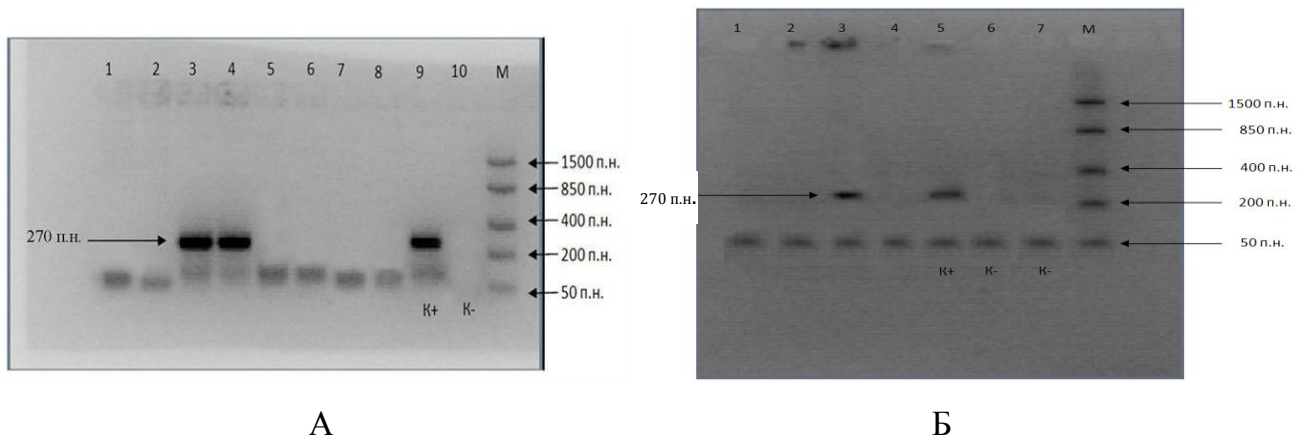


Рисунок 4.14 – Результаты ПЦР-анализа клеток перевиваемой линии Vero на наличие микоплазм

А. 1 – пассаж от 22.11.2012; 2 – пассаж от 29.05.2012; 3 – пассаж от 19.06.2012; 4 – пассаж от 05.09.2012; 5 – пассаж от 12.11.2012; 6 – пассаж от 03.12.2012; 7 – пассаж от 04.02.2013; 8 – пассаж от 11.03.2013; 9 – К(+) – из ПЦР-набора; 10 – К(-) вода деионизованная; М – маркер молекулярных весов.

Б. 1 – пассаж от 25.03.2013; 2 – пассаж от 04.04.2013; 3 – пассаж от 22.05.2013; 4 – пассаж от 16.06.2013; 5 – К(+) – из ПЦР-набора; 6, 7 – К(-) вода деионизованная; М – маркер молекулярных весов.

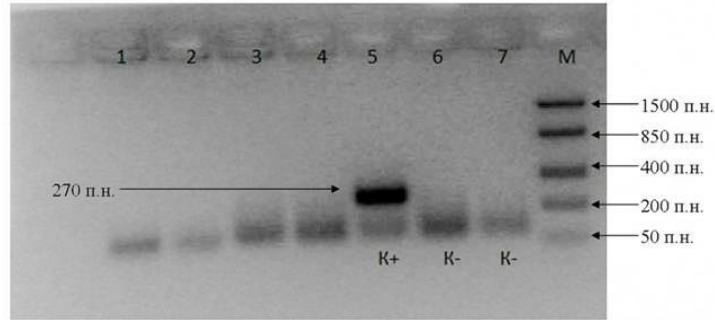


Рисунок 4.15 – Результаты ПЦР-анализа на наличие микоплазм образца вирусного материала и образцов экспериментальных серий антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови кролика

1 – вирусный урожай после роллерного культивирования от 24.05.2013; 2 – образец антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови кролика (серия 01); 3 – образец антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови кролика (серия 02), 4 – образец антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови кролика (серия 03); 5 – K(+) – из ПЦР-набора; 6, 7 – K(-) вода деионизованная; М – маркер молекулярных весов.

Как свидетельствовали результаты ПЦР-тестирования, в образцах № 1–3 АИГ, полученного с использованием антигена культурального происхождения, и в образце культуральной вирусной суспензии при роллерном культивировании микоплазмы не обнаружены.

На основании полученных результатов, собственного практического опыта работы с перевиваемой линией клеток, а также учитывая опыт лабораторий, работающих с клеточными линиями, для предотвращения заражения микоплазмами клеточной культуры перевиваемой линии Vero сформулированы для обязательного соблюдения следующие правила:

- приобретать для работы клеточную линию, гарантированно отконтролированную на отсутствие микоплазм;
- обеспечивать криосохранение достаточного количества клеток первого пассажа;
- осуществлять работы по ведению клеточных культур согласно СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»;
- проводить работы с культурой клеток в боксе абактериальной воздушной среды в потоке стерильного воздуха с соблюдением правил асептики и антисептики;

- ограничивать передвижение персонала во время работы с клеточными культурами;
- максимально использовать в работе одноразовые расходные материалы;
- проводить мероприятия, направленные на предотвращение аэрогенной контаминации клеточных культур;
- регулярно проводить тестирование клеток на присутствие микоплазм с последующим уничтожением зараженных клеток;
- осуществлять смену клеточной культуры после завершения каждого цикла из 15 пассажей;
- культивировать контролируемые на присутствие микоплазм клетки на средах без антибиотиков до завершения проверки во избежание подавления роста микоплазм;
- регулярно проводить (не реже одного раза в месяц) контроль питательных сред и ростовых добавок;
- аликвотировать питательные среды и стимулирующие добавки небольшими объемами;
- проводить ежедневную уборку помещений, где проводится работа с клеточной линией, с применением хлорсодержащих дезинфектантов. Рабочую поверхность бокса, боковые стенки и предметы, находящиеся в боксе, обрабатывать 70 % этиловым спиртом;
- проводить обработку рабочих камер CO₂-инкубатора и роллерной установки 70 % этиловым спиртом не реже 1 раза в месяц.

Заключение по главе

Проведена успешная адаптация фиксированного вируса бешенства производственного штамма «Москва 3253» к перевиваемой клеточной линии Vero. Разработана технология масштабного культивирования клеток Vero и вируса бешенства в условиях биореактора. Показано, что при использовании биореактора возможна реализация как суспензионного, так и псевдосуспензионного способов культивирования. Экспериментально обоснованы оптимальные условия способа культивирования *virus fixe* «Москва 3253» на клетках Vero с использованием роллерной установки. Полученные данные позволяют оценить роллерный способ культивирования вируса бешенства штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero как наиболее практически реализуемый в сравне-

нии с суспензионным и псевдосуспензионным способами репродукции *virus fixe* «Москва 3253». Показано, что для концентрирования культуральной инактивированной суспензии *virus fixe* «Москва 3253» целесообразно использование метода ультрафильтрации кросс-флоу с применением мембран с номинальной отсечкой, не превышающей 300 кДа, при давлении $(0,25 \pm 0,01)$ МПа. Результаты сравнительного определения уровня накопления *virus fixe* «Москва 3253» в мозговом и культуральном вирусном материале позволяют говорить об эффективности способа тангенциальной фильтрации для концентрирования вирусной суспензии.

Проведен ПЦР-контроль культуры клеток линии Vero, ростовых сред и добавок, культуральной жидкости и образцов экспериментального АИГ, полученного с применением культуральных технологий, на наличие микоплазменной контаминации. Выявлено, что используемые в работе питательные среды и стимулирующие добавки свободны от микоплазм. Обнаружены зараженные микоплазмами клеточные культуры, которые были уничтожены. В образцах вирусного урожая и экспериментальном АИГ 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.

ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО СПОСОБА ОПРЕДЕЛЕНИЯ *IN VITRO* ФИКСИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА «МОСКВА 3253» В АНТИГЕНСОДЕРЖАЮЩЕМ МАТЕРИАЛЕ

При масштабном культивировании *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» возникает необходимость в количественной оценке уровня накопления культурального вируса в процессе репродукции *in vitro* на клетках Vero и его содержания в антигенсодержащем материале для иммунизации продуцентов. Традиционно для этой цели применяют метод титрования вируса на белых мышах для вычисления ЛД₅₀, продолжительность постановки которого занимает не менее 14 сут [128]. В последние десятилетия в связи с рекомендациями ВОЗ имеет место устойчивая тенденция к разработке методов *in vitro*, позволяющих количественно оценить содержание вируса без использования животных [554, 555]. ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов является одним из альтернативных методов, способным заменить тест на животных.

5.1 Подбор ДНК-мишени, праймеров и зонда

Существующие в настоящее время системы ускоренной идентификации *rabies lyssavirus* с помощью ПЦР в материале от людей и животных предполагают в качестве ДНК-мишени использовать высококонсервативную N-область его генома [289, 501, 523, 524, 537]. Описано выявление аллелей локуса, специфичных для определенных генотипов *rabies lyssavirus* [294]. Однако для выявления с помощью амплификационных технологий отдельных штаммов *rabies lyssavirus* предпочтительнее использование G-локуса и G-L области вирусного генома. Для данных участков генома характерны высокий полиморфизм и высокая частота мутаций [523, 556]. G-локус и G-L область генома *rabies lyssavirus* характеризуются вариабельностью у отдельных штаммов, изолированных из разных источников [480]. G. Sato et al. в работе по определению приуроченности штаммов *rabies lyssavirus* к различным видам млекопитающих (собака, лиса, летучая мышь) использовали ПЦР с праймерами на основе указанных локусов вирусного генома [481].

Чтобы оценить эффективность G-L области как матрицы для выявления в ПЦР и количественной оценки *virus fixe* «Москва 3253», первоначально была определена нуклеотидная последовательность данного локуса вирусного генома, имеющая размер 881

н.п. В результате изучения данной последовательности и сравнения ее с геномом других штаммов *rabies lyssavirus*, изолированных от человека и животных, а также вакцинных штаммов, установлено, что нуклеотидная последовательность G-L области штамма «Москва 3253» специфична и отличается от последовательностей данного участка других штаммов на величину от 12 нуклеотидов у штамма RV-97 до 152 нуклеотидов у штамма NNV-RAB-H. При анализе нуклеотидных последовательностей G-L области генома вируса штамма «Москва 3253» и других штаммов использовали генетическую базу данных GenBank NCBI и алгоритм BLAST. В Таблице 5.1 представлены результаты анализа.

Таблица 5.1 – Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей G-L области различных штаммов *rabies lyssavirus*

Нуклеотидная последовательность по GenBank NCBI	Штамм	Характеристика штамма (происхождение)	Кол-во полиморфных нуклеотидов	Кол-во полиморфных нуклеотидов у производных одного штамма
1	2	3	4	5
AB645847	1088	лесной сурок, США, коллекция CDC	119	–
JN234411	4aGV	собака, Китай, 1931	93	–
AB517659	BRdg335	собака, Бразилия	138	–
HQ450386	DRV-Mexico	собака, Мексика	119	–
EU293115	9147Fra	лиса, Франция, 1991	101	–
EF437215	NNV-RAB-H	человек, Индия	152	–
DQ875051	DRV	Китай	99	–
DQ875050	MRV	Китай	139	–
AB044824	Nishigahara	Япония	104	–
	Ni-CE	производный штамма Nishigahara после 100 пассажей на куриных эмбрионах, Япония	105	1
GQ918139	CVS-11	аттенуированный штамм, Париж, Франция	140	–
EU182346	RB/E3-15	вакцинный штамм, адаптирован к клеткам линии Vero	134	–
EF206707	ERA	вакцинный штамм, производный штамма SAD (Evelyn Rokitniki Abelseth, 1978)	135	6

1	2	3	4	5
EU182347	RB/E3-15-5	производный штамма RB/E3-15 после адаптации к клеткам линии Vero	137	2
M31046	SAD-B19	аттенуированный штамм	134	–
EF206717	SAD-1-3670-var 1	вакцинный штамм, производный SAD, Wistar, 1965 (Friedrich Loeffler Institut)	130	7
EF206718	SAD-1-3670-var 2	вакцинный штамм, производный SAD, Wistar, 1965 (Friedrich Loeffler Institut)	130	7
EF206710	SAD-Bern original var 1	аттенуированный вакцинный штамм, производный SAD, 1975, Швейцария	136	2
EF206711	SAD-Bern original var 2	аттенуированный вакцинный штамм, производный SAD, 1975, Швейцария	136	2
FG913470	ERA-VC	аттенуированный штамм, производный SAD (Evelyn Rokitniki Abelseth, 1978) после адаптации к клеткам линии Vero, 2007	133	4
EF542830	RV-97	вакцинный штамм, Россия	12	–
EF206719	SAG-2	вакцинный штамм SAG (Street Alabama Gif), производный SAD, вакцина Rabi-gen (VIRBAC, Франция) от 2004 г.	136	2
AF499686	SRV9	вакцинный штамм после адаптации к клеткам линии ВНК-21	135	–
EF206720	SAD-Bern	вакцинный штамм, производный SAD, вакцина SANAFox (GmbH, Германия) от 2001 г.	134	0
EF206709	SAD-B19	вакцинный штамм, производный SAD, вакцина FUCHSORAL (IDT, Германия) от 2001 г.	134	0
EF206708	SAD-Bern	вакцинный штамм, производный SAD, вакцина BIOVETA (Чехия) от 2006 г.	134	0

При анализе нуклеотидной последовательности G-L области генома *virus fixe* «Москва 3253» была установлена ее стабильность при пассировании вируса на клетках линии Vero. Высокую специфичность указанного фрагмента генома подтверждает анализ гомологии фрагмента G-L области у производных вакцинного штамма SAD-B19, который показал его идентичность с геномом исходного штамма на 99,2 %; после пассажей штаммов на куриных эмбрионах – на 99,8 % и клетках Vero – на 99,7 %.

Полученные результаты позволили вывести консенсусную последовательность фрагмента G-L области *virus fixe* штамма «Москва 3253» (Рисунок 5.1).

3'CAAAGGAGAGTTGAGATTGTAGTCAGAGTTTCTCAAGATGTTGGGGACAGTGGGG
 GCTCCTCTGGGTTTCAGCCTCTGACTCGATTGGATCAATGGGGTCATCATAGACCTCTCCTG
 GATCTAGCATCTTGATGTAGGTCTTAGGATGAGAAGTGTGCCAGTTGCTCTTTTGATCTA
 CAGTTTTTTTCTTGACTGAAAAGCTTAGATGACCCAGCTCTTTATAATTATACACACTTCG
 CTGAGATGCAAGATGATTGTGAGCCATTA CTGCGTCCTTCATGGGAGGCAGATTGCSTTT
 CTCAATCGGCTCATGTGGAGTCCGATATCGTGGGACGTA CTATGACCTCTACCCGTGCCCA
 AGCATGGGATCATCGGAGATACCTCTTGGCCCGTCCACAACCCTTAGTATTAGTTCCTGGA
 GAATGAAAGCACAGTTGGGCACTGAAACTGCTAGAAGATCTCCTGCGTTATGAGAATCTA
 CATGACTTGATTTGATCAACTGAGAGGATTAATGAGAGTCTCATGACTCTTGAATCTACTC
 TGTCGCATGGAGTTCAAGGAGGACTCTTGAACCCGGAGATTCCCCCAATAAAGCAAACCT
 TAAAGGGGAGGTGATCTTCGGAACCTCGAAGTGTGCGAAAGGATGACCAGCCTTCACAGTCT
 AGCTTCATCCCCACTTTTATATGATTCCCATGAAGATATGAATTTCCCGCTTTGGGGGGTG
 ACCGACACCTTCATCTCTGTCCCTCTGAGACTGCGTTGCGTAGATTCTGGTCTATTGACTC
 TTCTACGACATATCATTAGGAAAATTATCAACATCAAGGCAATCAGGGTCCCTGCACTCA
 GTAATACATACTCTCCCAGTTCGGGAGACCCAAGTC- 5'

Рисунок 5.1 – Консенсусная последовательность фрагмента G-L
 области *virus fixe* «Москва 3253»

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.

По данным S. Wacharapluesadee et al., наличие вариабельных нуклеотидов в последовательности зонда и их количество оказывает существенное влияние на специфичность и чувствительность амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов [536]. Учитывая это, подбор олигонуклеотидных праймеров и зонда, специфичных для *virus fixe* штамма «Москва 3253», осуществляли таким образом, чтобы в составе их последовательностей было не менее семи полиморфных нуклеотидов, при этом не менее трех – в последовательности зонда у других штаммов *rabies lyssavirus*, и последовательность 3'-конца зонда значительно отличалась от последовательностей в геномах различных штаммов *rabies lyssavirus*. Специфичность подобранных праймеров и

зонда по отношению к последовательности G-L области генома *virus fixe* «Москва 3253» подтверждена результатами сравнительного анализа с последовательностями геномов других штаммов *rabies lyssavirus* (Таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Количество переменных нуклеотидов в последовательностях подобранных праймеров и зонда по сравнению с геномами различных штаммов *rabies lyssavirus* (данные GenBank NCBI)

Штамм <i>rabies lyssavirus</i>	Количество переменных нуклеотидов в последовательностях подобранных праймеров и зонда			Суммарное количество переменных нуклеотидов
	RV5	RV6	RV7	
EU293115	1	2	4	7
HQ450386	1	4	3	8
AB645847	1	3	4	8
AB128149, AB044824	3	2	3	8
JN234411	2	2	4	8
EF437215, AB517659	2	3	4	9
DQ875050	1	4	4	9
DQ875051	3	2	4	9
GQ918139	1	5	4	10
EF206708, EF206707, EF206717, EF206709, EF206719, EF206718, EF206720, M31046, EU182346, FG913470, EU182347	2	6	3	11
AF499686	2	6	4	12
EF206711, EF206710	3	6	3	12

Таким образом, были подобраны олигонуклеотидные праймеры RV5 – 5'-GTTGGGCACTGAAACTGCTA-3' и RV6 – 5'-GAATCTCCGGGTTC AAGAGT-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-AATCCTCCTTGAAC TCCATGCGACAGA-BHQ2 с флуоресцентными метками ROX и BHQ2 (с 542 по 565 нуклеотид) для проведения ПРЦ-РВ. Чтобы повысить эффективность гидролиза зонда за счет увеличения 5'-экзонуклеазной активности Taq-

полимеразы, к 5'-концу зонда RV7 были добавлены нуклеотиды ААТ, некоплементарные консенсусной последовательности G-L локуса генома *virus fixe* «Москва 3253».

5.2 Получение рекомбинантного штамма и набора ПЦР-стандартов для количественной оценки содержания *virus fixe* «Москва 3253»

Поскольку ПЦР-РВ сама по себе не является количественной, для определения количества матрицы, содержащейся в образце, используют ПЦР-стандарты, содержащие известную концентрацию ДНК [519, 520]. В настоящее время известны ПЦР-стандарты, используемые для количественной оценки содержания вакцинных штаммов различных вирусов: кори, краснухи, эпидемического паротита [7, 76]; геморрагической желтой лихорадки, цитомегаловируса, вируса герпеса человека 6 типа [464]; для определения количества антигена Е вируса КЭ при культивировании *in vitro* в культурах клеток [141]; для определения концентрации РНК вируса диареи КРС [388]; вируса денге [303]; вируса болезни Гамборо [182]. ПЦР-стандарты для количественного определения *virus fixe* «Москва 3253» методом ПЦР-РВ, согласно данным литературного и патентного поиска, до настоящего времени не разработаны.

Количественные стандарты вирусной нагрузки могут быть получены несколькими способами: использованием генно-инженерных конструкций, полученных введением в геном стандартного вируса амплифицируемого фрагмента исследуемого патогена; применением в анализе идентичных исследуемым инфекционных образцов [485]; непосредственным применением ампликона в качестве стандарта [292]; путем клонирования в стандартный плазмидный вектор исследуемого ампликона. Указанные приемы имеют свои достоинства и недостатки. Преимущество использования продукта реакции, клонированного в плазмидный вектор, заключается в простоте получения стандартов [197], что послужило для нас основанием выбора данного метода в качестве основного.

Исходя из вышесказанного, задача следующего этапа исследований заключалась в конструировании штамма *E. coli*, содержащего рекомбинантную плазмиду с клонированной последовательностью участка G-L локуса генома *virus fixe* «Москва 3253» с последующей разработкой ПЦР-стандартов на основе рекомбинантного штамма для количественной оценки содержания *virus fixe* «Москва 3253» в вирусном материале.

Плазмида pGem-T («Promega») была использована в качестве вектора, в качестве мишени для клонирования был выбран участок G-L локуса генома *virus fixe* «Москва 3253» (881 п.н.), фланкированный праймерами Besh G и Besh L. Стандартные процеду-

ры по амплификации локуса, очистке амплифицированного фрагмента, клонированию в вектор pGem-T осуществляли в соответствии с п. 3.2.6 главы 3. Клетки рекомбинантного штамма *E. coli* TG1 pRV_{Moscow3253}G-L при микроскопии имели вид грамотрицательных палочек, при росте на питательной среде LB с ампициллином указанный штамм формировал округлые гладкие колонии диаметром от 1,5 до 2,5 мм. Сконструированный рекомбинантный штамм *E. coli* TG1 pRV_{Moscow3253}G-L депонирован в ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

При разработке ПЦР-стандартов для проведения ПЦР-РВ для определения количества вируса в вируссодержащем материале исходным продуктом являлась рекомбинантная плаزمиды pRV_{Moscow3253}G-L. Для выделения ДНК плазмиды изолированную колонию штамма *E. coli* TG1 pRV_{Moscow3253}G-L отсеивали с поверхности агара в среду LB с добавлением ампициллина и инкубировали с аэрацией. Клетки осаждали центрифугированием, после лизиса проводили очистку с использованием коммерческого набора «DNA Purification System». После проведенных стандартных процедур было получено 100 мкл раствора плазмидной ДНК в воде деионизованной. Концентрацию ДНК в растворе для последующего пересчета количества ГЭ в 1 мл определяли спектрофотометрически. Отношение показателей измерения при длине волны 260 и 280 нм составило 1,8, что свидетельствовало о чистоте препарата. Далее готовили 10× разведения плазмиды pRV_{Moscow3253}G-L до конечного разведения 10^{-10} , что ориентировочно соответствовало $n \times 10^2$ ГЭ/мл.

ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени проводили в соответствии с оптимальными условиями, подобранными экспериментальным путем: концентрация праймеров RV5 и RV6 – по 10 пМоль; концентрация зонда RV7 – 5 пМоль; *Taq*-полимеразы – 1 ед.; дНТФ – 0,2 мМоль; MgCl₂ – 2,5 мМоль. Программа амплификации: предварительная денатурация 95 °С – 5 мин; цикл 1 (10 повторов) – 95 °С – 10 с, 60 °С – 10 с, 72 °С – 10 с; цикл 2 (35 повторов) – 95 °С – 10 с, 56 °С – 10 с, 72 °С – 25 с с учетом флуоресценции по каналу ROX при 56 °С. Проведение ПЦР-РВ в соответствии с указанными условиями обеспечило чувствительность анализа до 10^2 ГЭ/мл.

Специфичность анализа подтверждали проведением исследований с пробами кДНК, выделенной из интактного мозга кроликов. В этом случае специфичная флуоресценция по каналу ROX отсутствовала.

Для разработки ПЦР-стандартов оценивали эффективность количественной ПЦР с использованием каждых трех 10-кратных разведений плазмиды pRV_{Moscow3253}G-L, начиная с 10^{-1} до 10^{-10} . Выявлено, что наиболее эффективным является применение в качестве ПЦР-стандартов разведений 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} . В этом случае эффективность реакции соответствовала 91–97 %, коэффициент корреляции R^2 имел значение 0,980–0,999. Указанные разведения плазмиды были обозначены RV1, RV2, RV3, RV4 (аббревиатура от *Rabies virus*) и использовались в дальнейшем как ПЦР-стандарты при проведении количественной ПЦР. В ходе дальнейших исследований выявлено, что ПЦР-стандарты RV1, RV2, RV3 оптимально использовать при определении концентрации кДНК *virus fixe* «Москва 3253» в мозговом вирусном материале, а RV2, RV3, RV4 – при изучении культурального *virus fixe* «Москва 3253» (Таблица 5.3).

Таблица 5.3 – Использование ПЦР-стандартов RV1, RV2, RV3, RV4 для количественного определения кДНК *virus fixe* «Москва 3253»

ПЦР-стандарт	Концентрация
Стандарт 1 (RV1)	$n \times 10^8$ ГЭ/мл
Стандарт 2 (RV2)	$n \times 10^7$ ГЭ/мл
Стандарт 3 (RV3)	$n \times 10^5$ ГЭ/мл
Стандарт 4 (RV4)	$n \times 10^3$ ГЭ/мл

5.3 Определение содержания вируса бешенства в инактивированном органо-тканевом и культуральном антигенном материале в ПЦР-РВ с использованием разработанных ПЦР-стандартов

Указанные ПЦР-стандарты были апробированы при исследовании вирусосодержащего материала органо-тканевого (Таблица 5.4) и культурального происхождения (Таблица 5.5).

В ходе исследования выявлено, что вирусный материал из ткани мозга зараженных кроликов содержал *virus fixe* «Москва 3253» в концентрации $5,57 \times 10^7$ – $3,07 \times 10^9$ ГЭ/мл. Значение коэффициента корреляции соответствовало 0,99708, эффективности реакции – 0,89667.

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. Значение коэффициента корреляции соответствовало 0,99893, эффективности реакции – 0,96566.

Таблица 5.4 – 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 5.5 – 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 4	стандарт	26,10	$3,00 \times 10^3$	$3,32 \times 10^3$	8,4
RV 3	стандарт	24,83	$3,44 \times 10^5$	$3,36 \times 10^5$	2,4
RV 2	стандарт	15,72	$2,37 \times 10^7$	$2,55 \times 10^7$	7,7
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	

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, значение коэффициента корреляции соответствовало 0,99602, эффективности реакции – 0,91755.

Заключение по главе

Предложен методический подход с использованием ПЦР-РВ, позволяющий количественно оценить содержание *virus fixe* «Москва 3253» в материале для иммунизации продуцентов, а также уровень накопления вируса на этапах культивирования *in vitro*. На основе рекомбинантного штамма *E. coli* TG1 pRV_{Moscow3253}G-L разработаны ПЦР-стандарты для проведения количественной ПЦР. С помощью указанного методического подхода определена концентрация вируса в образцах мозговой и культуральной суспензий, содержащих *virus fixe* «Москва 3253».

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

ГЛАВА 6 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ *IN VITRO* СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНА

Гликопротеид *rabies lyssavirus*, являющийся компонентом наружного белкового слоя липопротеиновой оболочки вируса, обуславливает типовую специфичность рабдовирусов и играет определяющую роль в прикреплении патогена к поверхности клеток макроорганизма [22, 119]. ГП является основным иммуногеном вируса, в ответ на введение которого в крови восприимчивого хозяина образуются защитные ВНА. При конструировании диагностикумов для определения уровня содержания защитных антител в иммунных сыворотках или препаратах антирабического иммуноглобулина указанный компонент может рассматриваться как иммунореагент, достоинство которого заключается в повышении специфичности анализа в силу отсутствия балластных вирусных компонентов [22, 196, 384].

Сконструированная нами ранее тест-система с использованием конъюгата на основе наночастиц КЗ и цельновирального антигена, экстрагированного из суспензии ткани мозга зараженного животного [164, 258], позволяет в короткие сроки с использованием ДИА дать оценку защитной активности антирабических препаратов. Однако при использовании конъюгата на основе цельновирального антигена в иммунохимической реакции выявляется весь спектр антител, образовавшийся в организме продуцента при введении вируса бешенства, в том числе антитела, не обладающие вируснейтрализующей функцией. В связи с этим возникла необходимость в совершенствовании методических подходов для выявления ВНА в антирабических сыворотках и определения специфической активности АИГ *in vitro* в ДИА с использованием конъюгата, изготовленного на основе очищенного ГП вируса бешенства.

6.1 Отработка технологических приемов выделения гликопротеида из *virus fixe* культурального происхождения для конструирования антигенного диагностикума с наночастицами коллоидного золота

Дальнейшим этапом наших исследований явилось выделение и очистка основного структурного компонента вируса бешенства – ГП (белок G), прикладной аспект использования которого в качестве антигенного компонента в составе диагностикумов имеет важное значение.

Технология выделения очищенного гликопротеида вируса бешенства предполагает последовательное решение задач по дезинтеграции вирусных частиц и дальнейшей очистки выделенного ГП. Первая задача решается за счет использования, главным образом, детергентов, с их помощью были извлечены поверхностные ГП различных вирусов: КЭ, венесуэльского энцефаломиелита лошадей, герпеса, гриппа, парагриппа, бешенства [2, 22, 91, 196]. Предпочтение отдается неионным детергентам, среди которых наиболее широко для этих целей используется тритон X-100 или ПЭГ-(9-10)-p-t-октилфенол. Воздействие на вирус тритоном X-100 не вызывает солюбилизацию липидного компонента и препятствует выходу в раствор внутренних белков вируса, что способствует получению высокоочищенных препаратов [22].

В настоящей работе ГП выделяли из *virus fixe* «Москва 3253», культивированного *in vitro* на клетках Vero. Культуральную вирусосодержащую суспензию, инактивированную фенолом и концентрированную ультрафильтрацией кросс-флоу, очищали гель-хроматографией на хроматографической колонке 15 x 250 мм. В качестве носителя использовали TSK-гель HW-65. Колонку уравнивали 3 свободными объемами фосфатного буфера (0,01 M) pH 7,3, с содержанием хлористого натрия 0,137 моль/л и 0,0027 моль/л хлористого кальция (буфер элюции). Объем наносимой пробы составлял 0,5–1 мл; на проточном спектрофотометре при длине волны 280 нм контролировали выход белковых фракций. По окончании гель-фильтрации зафиксировали 3 пика (Рисунок 6.1).

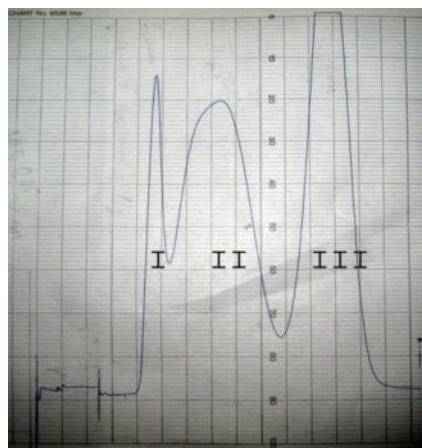


Рисунок 6.1 – Хроматографический профиль образца инактивированной культуральной вирусной суспензии при гель-фильтрации на TSK-геле HW-65

Фракции каждого пика исследовали иммунохимически в непрямом дот-анализе с применением АИГ из сыворотки крови лошади и антивидового пероксидазного конъюгата (коммерческий препарат) (Рисунок 6.2).



Рисунок 6.2 – Дот-анализ образцов фракций I, II, III пиков после очистки культуральной вирусной суспензии гель-фильтрацией

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.

Для выделения ГП из *virus fixe* «Москва 3253» использовали тритон X-100 в концентрации 2 %, которым обрабатывали концентрированный и очищенный вирус (концентрация белка 5,9 мг/мл). После инкубации смеси в течение 20 мин при комнатной температуре ее охлаждали в течение 5 мин на ледяной бане. Далее смесь центрифугировали в течение 2,5–3 ч при 13000 об/мин при $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$, после чего проводили диализ полученного супернатанта, содержащего гликопротеид, против раствора бикарбоната аммония (0,01 М, рН 7,8) со сменой буфера каждые 8 ч. После диализа в течение 48 ч продукт лиофилизировали с целью концентрирования. Лиофилизированный продукт растворяли в 1 мл воды деионизованной и центрифугировали в 15 объемах охлажденного ацетона при $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ при 5000 об/мин в течение 10 мин. Далее преципитат отмывали охлажденным до минус $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ этанолом и центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин при $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$. Затем проводили двукратную отмывку этанолом, нагретым до $(56 \pm 2)^\circ\text{C}$, с центрифугированием в течение 10 мин при 5000 об/мин при $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$. Полученный осадок растворяли в 1 мл раствора бикарбоната аммония (0,01 М, рН 7,8) и снова концентрировали лиофилизацией. Полученный антиген растворяли в 1 мл воды деионизованной и очищали гель-фильтрацией. Пробу в объеме 0,5–1 мл наносили на колонку и контролировали выход белка на проточном спектрофотометре при длине волны 280 нм.

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 (Рисунок 6.3).

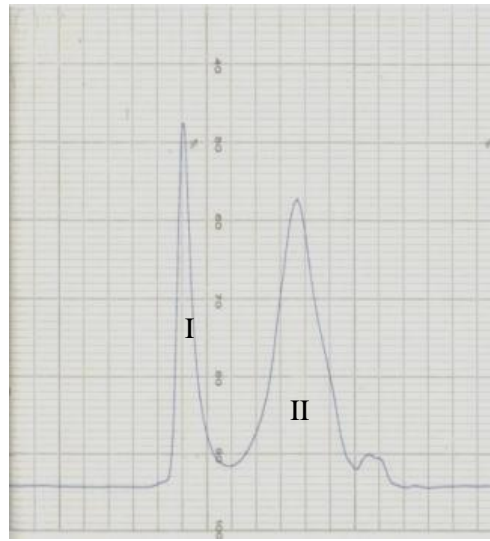


Рисунок 6.3 – Хроматографический профиль образца *virus fixe* «Москва 3253» при гелефильтрации на TSK-геле HW-65

Фракция пика I соответствовала, предположительно, выходу недезинтегрированного вируса, выход гликопротеида соответствовал фракции пика II. По окончании гелефильтрации спектрофотометрически определяли содержание белка во фракциях. Содержание белка в образцах I пика составило 280 мкг/мл, II пика – 650 мкг/мл. Далее исследовали белковую фракцию пика II. Оценивали степень очистки вируса с применением электрофореза в 12 % ПААГ-ДСН с окраской кумасси R-250 и азотнокислым серебром. В результате электрофореза на электрофореграмме была зарегистрирована одна полоса при окраске на углеводы и белок, что подтвердило получение очищенного G-белка *virus fixe* «Москва 3253» (Рисунок 6.4).

Молекулярную массу выделенного продукта определяли относительно стандартов молекулярной массы БСА (67 кДа) и овальбумина (45 кДа).

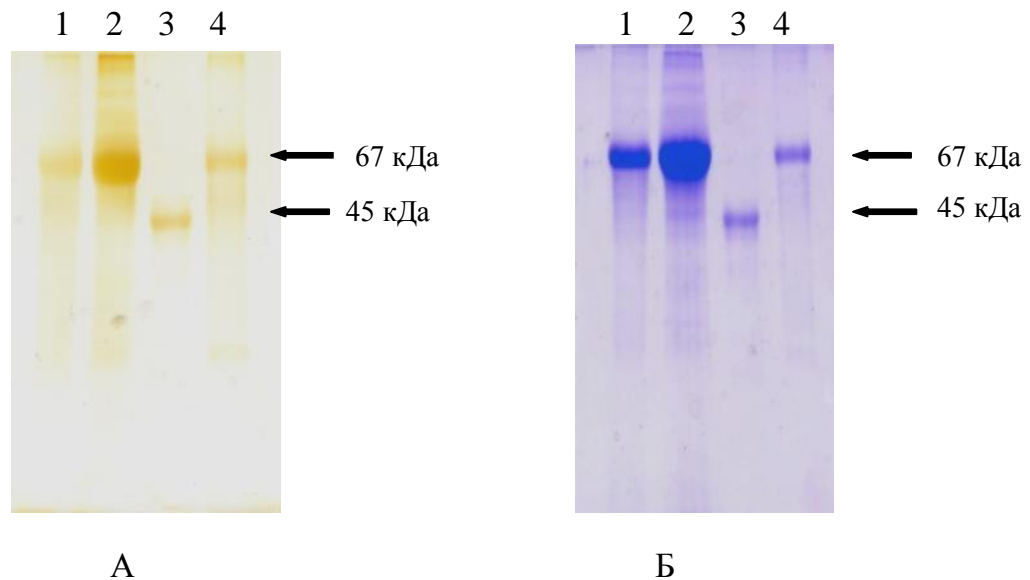


Рисунок 6.4 – Электрофореграмма гликопротеида *virus fixe* «Москва 3253»

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.

Как показали результаты электрофореза в ПААГ-ДНС, основная масса белка соответствовала полипептидам с молекулярной массой 65 кДа. Согласно литературным данным, молекулярная масса ГП *rabies lyssavirus*, в зависимости от исходного материала и способа получения, равна 65–90 кДа [2, 109, 119], что также подтверждало получение гликопротеида из *virus fixe* «Москва 3253».

Иммуногенные свойства изолированного из *virus fixe* «Москва 3253» ГП изучали в эксперименте по иммунизации выделенным антигеном белых мышей инбредной линии BALB/c массой 18–20 г. В эксперименте использовали очищенный ГП и цельный вирус бешенства культурального происхождения, в качестве адьюванта применяли полный адьювант Фрейнда (ПАФ). Доза антигена соответствовала 25 мкг при начальной иммунизации, в последующие четыре иммунизации с двухнедельным интервалом дозу увеличили до 50 мкг. Животным контрольной группы вводили раствор хлористого натрия в концентрации 0,9 %. Первую иммунизацию с ПАФ осуществляли подкожно; при последующих иммунизациях использовали внутрибрюшинный способ введения антигена. После третьей и пятой иммунизации на пятые сутки после инъекции антигена осуществляли пробное кровопускание, забирая кровь из хвостовой вены. Уровень содержания защитных антител в сыворотке иммунной крови исследовали в непрямом ИФА с антивидовым пероксидазным конъюгатом (Таблица 6.1).

Таблица 6.1 – Значения защитного титра антител в сыворотках мышей, иммунизированных гликопротеидом *virus fixe* и цельновирусным антигеном (n=3)

Тип антигена и адьюванта	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

Исследование иммунных сывороток мышей в ИФА показало, что очищенный ГП *virus fixe* «Москва 3253» индуцирует образование защитных антител в большей степени, чем цельновирусный антиген, при этом введение ГП совместно с ПАФ способствовало накоплению антител в большем титре. Как видно из Таблицы 6.1, сыворотки мышей, иммунизированных антигеном на основе цельного вируса, характеризовались защитным титром на уровне 1:80; в иммунных сыворотках животных, которым вводили очищенный ГП с ПАФ, зарегистрированы титры антител 1:640–1:1280.

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

6.2 Разработка методических приемов определения активности антирабических сывороток и иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе с применением диагностикума на основе гликопротеида вируса бешенства и наночастиц коллоидного золота

Уровень содержания ВНА в антирабических препаратах оценивали в прямом ДИА с применением диагностикума, представляющего собой ГП *virus fixe* «Москва 3253», меченный наночастицами КЗ.

Постановку ДИА осуществляли согласно п. 3.2.5, глава 3 настоящего исследования. Учет результатов проводили визуально. Защитным титром иммунных сывороток или специфического иммуноглобулина считали наибольшее разведение препарата, при котором регистрировали результат реакции в виде четко различимого пятна.

Рисунок 6.5 иллюстрирует результаты исследования *in vitro* уровня содержания протективных антител в антирабических сыворотках лошадей-производителей в прямом ДИА с диагностикумом на основе ГП вируса бешенства и наночастиц КЗ. Как показал анализ, содержание защитных антител в иммунных сыворотках животных соответствовало значениям титров 1:640–1:1280.

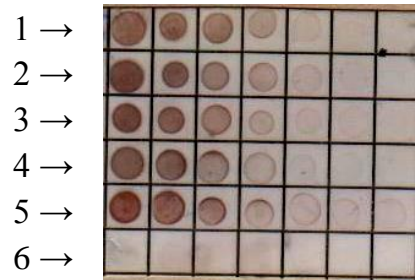


Рисунок 6.5 – Исследование активности иммунных сывороток лошадей-производителей *in vitro* в ДИА с конъюгатом на основе наночастиц коллоидного золота и гликопротеида *virus fixe*

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

Рисунок 6.6 отображает результаты тестирования АИГ коммерческих серий в прямом ДИА с данным диагностикумом. Специфическая активность АИГ, выявленная *in vitro*, соответствовала значениям 1:5000–1:10000.

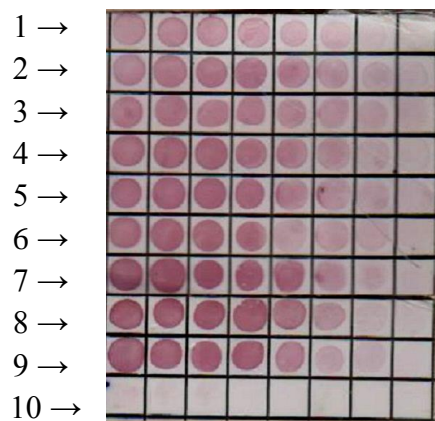


Рисунок 6.6 – Исследование активности АИГ *in vitro* в ДИА с конъюгатом на основе наночастиц коллоидного золота и гликопротеида *virus fixe*

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

Таким образом, использование выделенного ГП *virus fixe* «Москва 3253» для конструирования диагностикума с золотыми наночастицами и применение конъюгата в ДИА позволяет *in vitro* оценивать уровень протективной активности иммунных сывороток продуцентов и выделенного из них специфического иммуноглобулина. Преимущество использования такого диагностикума заключается в повышении специфичности анализа, исключающего выявление антител к другим субвирусным компонентам, не обладающих вируснейтрализующей активностью.

6.3 Разработка методических приемов определения титра специфических антител в антирабических препаратах в непрямом дот-иммуноанализе с применением диагностикума на основе белка А *Staphylococcus aureus* и наночастиц коллоидного золота

В рамках настоящего исследования для экспресс-оценки активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в непрямом ДИА был сконструирован конъюгат на основе белка А *S. aureus* и наночастиц КЗ со средним размером 15–17 нм. Белок А находит широкое распространение в иммуноанализе из-за своей способности специфически взаимодействовать с Fc-фрагментами многих иммуноглобулинов [202]. Немаловажно, что белок А является универсальным компонентом, заменяющим антивидовые иммуноглобулины в непрямом ДИА.

При проведении анализа для повышения специфичности в качестве антигена использовали ГП *virus fixe* «Москва 3253», который сорбировали на твердую фазу. Постановку осуществляли согласно п. 3.2.5, глава 3 данной работы. При тестировании иммунных сывороток лошадей с использованием диагностикума на основе белка А *S. aureus* зарегистрированы значения титров антител от 1:640 до 1:1280 (Рисунок 6.7), эти данные аналогичны полученным ранее результатам исследования сывороток с использованием конъюгата наночастиц КЗ с ГП вируса бешенства.

При тестировании АИГ в непрямом ДИА выявлена специфическая активность на уровне от 1:5000 до 1:20000 (Рисунок 6.8).

Результаты исследований подтверждают, что для оценки специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина *in vitro* возможно использование непрямого ДИА с применением конъюгата наночастиц КЗ и *S. aureus*.

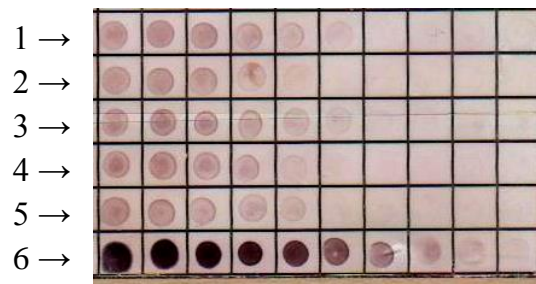


Рисунок 6.7 – Результаты непрямого ДИА при определении активности антирабических гетерологичных препаратов с диагностикумом на основе белка *A. S. aureus*

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

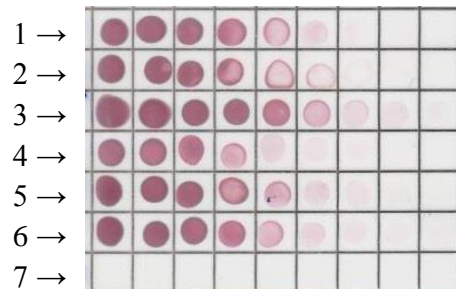


Рисунок 6.8 – Результаты непрямого ДИА при определении активности антирабического гетерологичного иммуноглобулина с диагностикумом на основе белка *A. S. aureus*

1–6 ряды – двукратные разведения с 1:160 антирабического иммуноглобулина; 7 ряд – двукратные разведения с 1:40 НЛС (отрицательный контроль).

Заключение по главе

Таким образом, проведенные исследования позволили оптимизировать разработанную нами ранее тест-систему по выявлению ВНА в антирабических препаратах путем конструирования диагностикумов на основе наночастиц КЗ и двух видов иммунореagenta – ГП *virus fixe* «Москва 3253» для постановки прямого ДИА, и белка *A. S. aureus* для непрямого ДИА. Тест 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 бе-

лых 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», опубл. 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 ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ СЕРИЙ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

7.1 Получение антирабических сывороток и иммуноглобулина от продуцентов, иммунизированных культуральным рабическим антигеном

Необходимым этапом работы при внедрении культуральных технологий в производственный цикл получения АИГ являлась экспериментальная оценка эффективности культурального рабического антигена при получении иммунных специфических сывороток от животных-продуцентов с высоким уровнем протективной активности.

Первоначально в опыте использовали мелких продуцентов – кроликов. Для определения дозы антигена исходили из того, что содержание вируса в культуральном рабическом антигене должен быть близок к таковому в органо-тканевом антигене, традиционно применяемому в производстве гетерологичного АИГ. Количество вирусных частиц в материале для иммунизации оценивали по содержанию вирусной РНК в количественной ПЦР, как описано в главе 5 настоящего исследования. Выбор способа введения антигена и интервалов между инъекциями обусловлен опытом и рекомендациями отечественных и зарубежных исследователей [208, 216, 346, 406]. Для повышения активности иммунных сывороток при иммунизации использовали адьюванты: гидроксид алюминия (ГО) и полиоксидоний (ПО). Оба адьюванта применяют в настоящее время при производстве вакцин, в частности, ПО, являющийся разработкой отечественных ученых, используется в производстве противогриппозной вакцины [124, 156]. Т.С. Пономарева с соавт. приводят данные, что использование ПО существенно повышает иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины [190]. А.М. Ляпиной с соавт. показана эффективность использования ПО при получении специфических антител к бактериальным антигенам [120]. Адьювантный эффект ПО описан в работе сотрудников ФГБУ «НЦ ЭСМП» при иммунизации белых мышей отечественной культуральной антирабической вакциной [1].

В эксперименте по получению антирабической сыворотки животных разделили на 3 группы и иммунизировали на 0, 7, 21, 28, 52, 59 сут. Антиген вводили подкожно по 1 мл, концентрация вирусных частиц соответствовала $n \times 10^7$ – $n \times 10^8$ ГЭ/мл. Кроликам

первой группы антиген вводили без адьюванта, кроликам второй и третьей групп – с адьювантами, в качестве которых применяли гидроокись алюминия в концентрации 3 мг/мл (2 группа) и полиоксидоний в концентрации 1,5 мг/мл (3 группа). На 42-е и 73-и сут осуществляли контрольный забор крови для выявления титра специфических антител. При наличии к 73 сут в иммунной сыворотке животных антирабических антител в титре не менее $-lg\ 2,7$ (1:500) осуществляли забор крови для последующего выделения специфического иммуноглобулина.

Анализ в ДИА активности иммунных кроличьих сывороток, полученных в результате пробного кровопускания на 42 сут, выявил, что каждый из примененных адьювантов обладал стимулирующим эффектом (Рисунок 7.1).

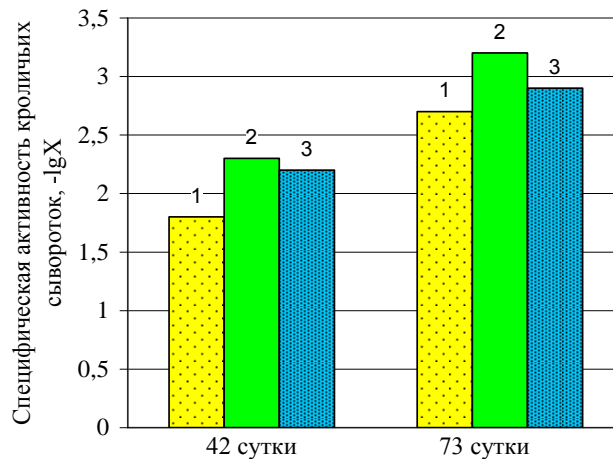


Рисунок 7.1 – Уровень антителообразования в крови кроликов, иммунизированных культуральным рабическим антигеном

1 – иммунизация без адьюванта; 2 – иммунизация с ГО; 3 – иммунизация с ПО.

Так, у второй группы животных, иммунизированных с ГО, в ДИА регистрировали самый высокий уровень антител, соответствующий $-lg$ ($2,3 \pm 0,3$) или 1:160–1:320. Уровень активности сывороток животных 1-ой и 3-ей групп соответствовал $-lg$ ($1,8 \pm 0,3$) (1:40–1:80) и $-lg$ ($2,2 \pm 0,0$) (1:160). 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 ви-

руса, обеспечивая выработку защитных антител в титре не менее, чем 1:500, что соответствует требованиям НД на АИГ.

Далее полученные сыворотки 01, 02, 03 соответственно от трех групп кроликов тестировали на специфическую активность в РН, определяли содержание белка и фракционный состав.

Анализ показал, что содержание белка в образцах 01, 02, 03 соответствовало значениям 6,0; 6,2 и 6,1 %. Фракционный состав исследовали методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы. При количественном анализе фракционного состава иммунных сывороток зарегистрировано увеличение содержания фракции γ -глобулинов по сравнению с фракционным составом нормальной сывороткой кролика, что свидетельствовало об интенсивности процесса антителообразования в крови животных (Таблица 7.1).

Таблица 7.1 – Результаты исследования фракционного состава специфических сывороток кроликов, иммунизированных антигеном на основе культурального *virus fixe* «Москва 3253»

Электрофоретические фракции	Содержание фракции в нормальной сыворотке кролика, %	Содержание фракции в иммунной сыворотке, %		
		образец 01	образец 02	образец 03
Альбумины	64,29	58,84	55,86	57,35
α -1,2- глобулины	16,08	13,57	14,62	14,10
β -глобулины	10,02	12,17	12,68	12,43
γ -глобулины	9,60	15,42	16,84	16,13

При исследовании активности полученных сывороток 01, 02, 03 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 (Таблица 7.2).

Специфические сыворотки крови кроликов, иммунизированных культуральным рабическим антигеном, служили сырьем для выделения из них антирабического иммуноглобулина. Иммуноглобулин получали в лабораторных условиях риванол-спиртовым способом.

Таблица 7.2 – Результаты реакции нейтрализации при исследовании активности иммунных сывороток кроликов, иммунизированных антигеном на основе культурального *virus fixe* «Москва 3253»

Образец сыворотки	Разведение	Количество мышей в группе		Кумулятивные данные		Летальность, %	Титр защиты
		Абсолютные данные		живые	павшие		
		живые	павшие				
Антирабическая сыворотка кролика, образец 01	1:40	6	0	25	0	0	1:640 (13 МЕ/мл)
	1:80	6	0	19	0	0	
	1:160	4	2	13	2	13	
	1:320	4	2	9	4	31	
	1:640	5	1	5	5	50	
Антирабическая сыворотка кролика, образец 02	1:40	6	0	25	0	0	1:513 (10 МЕ/мл)
	1:80	6	0	19	0	0	
	1:160	5	1	13	1	7	
	1:320	5	1	8	2	20	
	1:640	3	3	3	5	63	
Антирабическая сыворотка кролика, образец 03	1:40	6	0	25	0	0	1:548 (11 МЕ/мл)
	1:80	6	0	19	0	0	
	1:160	5	1	13	1	7	
	1:320	4	2	8	3	27	
	1:640	4	2	4	5	56	

Примечание – кумулятивные данные: в каждой графе «живые» суммируется количество мышей, выживших при данном и предыдущем разведении с учетом того, что каждая мышь, выжившая при меньшем разведении вируса, вероятно, выжила бы и при его большем разведении; в каждой графе «павшие» суммируется количество мышей, павших при данном разведении и при всех разведениях, больших, чем данное.

Всего были получены 3 лабораторные серии экспериментального антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови кролика, специфическая активность которого в реакции нейтрализации 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 7.3).

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 исполь-

зовать для иммунизации крупных продуцентов иммунной сыворотки – лошадей, традиционно используемых для масштабного производства АИГ в РосНИПЧИ «Микроб».

Таблица 7.3 – 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	γ-глобулин – не менее 80 %; наличие примесей α, β-глобулинов – не более 20 %. Альбумин должен отсутствовать	γ-глобулин – 97,9 %; α-глобулины – 0,9 %; β-глобулины – 1,2 %. Альбумин отсутствует	γ-глобулин – 99,86 %; α-глобулины – 0,00 %; β-глобулины – 0,14 %. Альбумин отсутствует	γ-глобулин – 98,76 %; α-глобулины – 0,11 %; β-глобулины – 1,13 %. Альбумин отсутствует
pH	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

В эксперименте использовали животных, ранее не иммунизированных другими антигенами. График иммунизации и взятия крови представлен в Таблице 7.4.

Схема иммунизации была аналогичной схеме иммунизации лошадей культуральной антирабической вакциной, используемой зарубежными коллегами при получении гетерологичного АИГ [346, 447].

Интервал между первой и второй инъекциями составил три недели. Дальнейшую иммунизацию до начала кровопусканий осуществляли еженедельно. В качестве адъюванта использовали ПО в конечной концентрации 1 мг/мл.

Таблица 7.4 – График иммунизации лошадей культуральным рабическим антигеном и забора иммунной крови

Время, сут	Операционная процедура	Использование адъюванта
1	Иммунизация	+
21	Иммунизация; пробное взятие крови и анализ сывороток на содержание специфических антител	+
28	Иммунизация	+
35	Иммунизация	+
42	Иммунизация; пробное взятие крови и анализ сывороток на содержание специфических антител	–
49	Иммунизация	–
56	Иммунизация	–
63	Иммунизация; пробное взятие крови и анализ сывороток на содержание специфических антител	–
70	Иммунизация	–
77	Иммунизация; пробное взятие крови и анализ сывороток на содержание специфических антител	+
84	Иммунизация	–
91	Иммунизация	–
97	Взятие крови для выделения гамма-глобулина	
100	Взятие крови для выделения гамма-глобулина	
119	Иммунизация	–
125	Взятие крови для выделения гамма-глобулина	
127	Взятие крови для выделения гамма-глобулина	
147	Иммунизация	–
153	Взятие крови для выделения гамма-глобулина	
156	Взятие крови для выделения гамма-глобулина	
175	Иммунизация	–
181	Взятие крови для выделения гамма-глобулина	
183	Взятие крови для выделения гамма-глобулина	

Объем иммунизирующей дозы был равен 5 мл. Антиген представлял собой инактивированную, концентрированную и очищенную суспензию культурального вируса бешенства с содержанием вируса от $n \times 10^7$ до $n \times 10^8$ ГЭ/мл, по данным ПЦР-РВ. При исследовании антигенсодержащего материала в ИФА титр вируса соответствовал значению не менее 1:512. Введение антигена осуществляли внутримышечно в область шеи или спины лошади.

В течение срока иммунизации проводили наблюдение за динамикой титра специфических антител. После пробного кровопускания сыворотки анализировали в ДИА.

Результаты исследования сывороток, полученных на 63 сут от начала иммунизации, представлены на Рисунке 7.2. Анализ показал наличие в сыворотках специфических антител в титре 1:640–1:1280, что позволило говорить об имевшей место антигенной активности полученного культурального вируса бешенства.

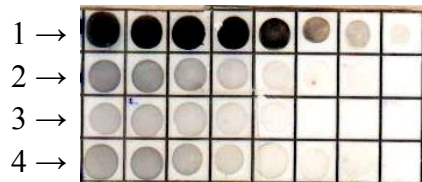


Рисунок 7.2 – Исследование в ДИА активности иммунных сывороток лошади, полученных с применением антигена на основе культурального *virus fixe* «Москва 3253»

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.

Методом электрофореза на ацетатных пленках исследовали зависимость между нарастанием титра специфических антител и содержанием различных фракций белка в иммунных сыворотках лошади. Количественный анализ электрофореграмм образцов сывороток лошади показал нарастание фракций γ -глобулинов на 25 % относительно исходного их содержания (Таблица 7.5). Полученные данные свидетельствовали о процессе антителообразования в крови животных в ответ на введение культурального антигена.

Таблица 7.5 – Результаты исследования фракционного состава специфических сывороток лошадей, иммунизированных антигеном на основе культурального *virus fixe* «Москва 3253»

Электрофоретические фракции	Содержание фракции в иммунной сыворотке, %			Содержание фракции в нормальной сыворотке лошади, %
	сыворотка 01	сыворотка 02	сыворотка 03	
Альбумин	48,7	46,26	47,48	35,72
α -1,2- глобулины	13,85	12,98	13,42	23,65
β -глобулин	7,95	10,31	9,13	16,66
γ -глобулин	29,5	30,45	29,98	23,97

Далее лошадям были сделаны еще две инъекции культурального антигена, одна из которых сопровождалась введением ПО для стимулирования иммунного ответа. Сыворотки, полученные от продуцентов через 77 дней после начала иммунизации, были изучены фармакопейным методом в РН с *virus fixe* CVS. В ходе исследования сывороток № 01–03 зарегистрированы титры специфических антител на уровне 1:987; 1:1024 и 1:898 соответственно (Таблица 7.6).

Таблица 7.6 – Результаты реакции нейтрализации при исследовании активности иммунных сывороток лошадей, иммунизированных антигеном на основе культурального и мозгового *virus fixe* «Москва 3253»

Название препарата	Разведение препаратов	Абсолютные данные по количеству мышей в каждой группе		Кумулятивные данные		Летальность, %	Титр защитных антител
		павшие	живые	павшие	живые		
Сыворотки от лошадей, иммунизированных культуральным рабическим антигеном							
Антирабическая сыворотка лошади «Нерест», образец 01	1:200	1	5	1	16	6	1:987
	1:400	1	5	2	11	15	
	1:800	1	5	3	6	33	
	1:1600	5	1	8	1	89	
	1:3200	6	0	14	0	100	
Антирабическая сыворотка лошади «Ревель», образец 02	1:100	0	6	0	23	0	1:1024
	1:200	0	6	0	17	0	
	1:400	0	6	0	11	0	
	1:800	2	4	2	5	29	
	1:1600	5	1	7	1	88	
Антирабическая сыворотка лошади «Мавр», образец 03	1:100	0	6	0	22	0	1:898
	1:200	0	6	0	16	0	
	1:400	1	5	1	10	9	
	1:800	3	3	4	5	44	
	1:1600	4	2	8	2	80	
Сыворотки от лошадей, иммунизированных органо-тканевым рабическим антигеном							
Антирабическая сыворотка лошади «Пегас»	1:200	0	6	0	13	0	1:605
	1:400	1	5	1	7	13	
	1:800	5	1	6	2	75	
	1:1600	6	0	12	1	92	
	1:3200	5	1	17	1	94	
Антирабическая сыворотка лошади «Тест»	1:200	1	5	1	13	7	1:596
	1:400	2	4	3	8	27	
	1:800	5	1	8	4	67	
	1:1600	3	3	11	3	79	
	1:3200	6	0	17	0	100	
Антирабическая сыворотка лошади «Пеликан»	1:200	0	6	0	19	0	1:778
	1:400	0	6	0	13	0	
	1:800	1	5	1	7	13	
	1:1600	4	2	5	2	71	
	1:3200	6	1	11	0	100	

Согласно требованиям НД, при производстве АИГ в качестве сырья для выделения гамма-глобулина может быть использована иммунная сыворотка с титром ВНА, выявленным в реакции нейтрализации на белых мышах, соответствующим значению не менее 1:500.

Полученные при исследовании активности иммунных сывороток результаты свидетельствовали о том, что антирабические сыворотки от лошадей, иммунизированных антигеном на основе культурального *virus fixe* «Москва 3253», по значению специфической активности не уступали иммунным сывороткам от лошадей, иммунизированных мозговым вирусом (Таблица 7.6).

Учитывая величину защитного титра, полученные иммунные сыворотки в дальнейшем были использованы в качестве сырья для выделения АИГ.

Начиная с 97 дня от начала иммунизации, осуществляли взятие крови с целью накопления достаточного количества сыворотки для фракционирования в производственных условиях. Кровопускание проводили через интервал времени от 6 до 10 дней после предшествующей иммунизации. Повторную иммунизацию лошадей осуществляли через три недели после взятия крови по так называемой «щадящей» схеме эксплуатации лошадей-продуцентов, используемой нами при промышленном выпуске иммуноглобулина [204].

Полученную иммунную кровь использовали для получения осадка гамма-глобулина. Жидкий иммуноглобулин с конечным содержанием белка 10,0 % получали путем разведения осадка иммуноглобулина в растворе хлористого натрия (0,9 %), приготовленном на апиригенной воде. Для очистки раствора иммуноглобулина от механических частиц и коллоидных взвесей осуществляли последовательную осветляющую фильтрацию раствора иммуноглобулина через патронные фильтры с двуслойной капроновой мембраной с микронным рейтингом 0,80/0,45 и 0,45/0,20 мкм. Удаление остаточного спирта и низкомолекулярных полипептидов из раствора иммуноглобулина проводили на диализной колонке FX100 против циркуляционного 0,9 % раствора хлористого натрия, приготовленного на апиригенной воде. Объем раствора хлористого натрия, используемого для диализа, вдвое превышал объем жидкого иммуноглобулина. По окончании ультрафильтрации к раствору иммуноглобулина добавляли стабилизатор гликокол до конечной концентрации $(2,25 \pm 0,25)$ %. Для улучшения показателей прозрачности и цветности, а также с целью депиригенизации осуществляли фильтрацию иммуногло-

булина через глубинные фильтры Zeta Carbon и Zeta Plus. Далее проводили стерилизующую фильтрацию с использованием капсульных фильтров на основе полиамида с мембраной 0,20 мкм. Фильтрат собирали в стерильные апиrogenные полимерные контейнеры и передавали на участок розлива и запайки ампул. Иммуноглобулин разливали по 5 мл в ампулы и запаивали автоматически в условиях «чистых помещений».

Таким образом, с применением культурального рабического антигена в условиях, аналогичных промышленным, были произведены три экспериментально-производственные серии 001, 002, 003 гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

7.2 Исследование биологических и физико-химических показателей гетерологичного антирабического иммуноглобулина, полученного с применением культурального антигена, в сравнении с фармакопейными показателями

Необходимым и важнейшим этапом наших дальнейших исследований являлась оценка качества усовершенствованного АИГ, полученного с применением культуральных технологий, а именно, соответствие его основных свойств спецификационным требованиям ФСП Р N002639/01-250210. Настоящая НД предусматривает контроль следующих физико-химических и биологических показателей: внешнего вида (описание), видоспецифичности, специфической активности *in vivo*, содержания белка, значений водородного показателя, прозрачности, цветности, электрофоретической однородности, содержания остаточного этанола и риванола, токсичности, пирогенности, стерильности. Кроме этого, исследовали специфическую активность усовершенствованного препарата *in vitro* в ДИА, а также осуществляли ПЦР-тестирование на присутствие микоплазм. Испытания проводили комиссионно методами, описанными в главе 3 настоящего исследования.

Внешний вид препарата антирабического иммуноглобулина соответствовал требованиям НД и представлял собой бесцветную жидкость со слабой опалесценцией.

В Таблице 7.7 представлены результаты тестирования образцов АИГ экспериментально-производственных серий. Все образцы, изученные комиссионно в межлабораторных испытаниях, показали соответствие требованиям ФСП Р N002639/01-250210 на АИГ.

Таблица 7.7 – Результаты испытаний образцов экспериментально-производственных серий АИГ, полученного по усовершенствованной технологии

Показатели	Результаты испытаний АИГ			Норма НД Р N 002639/01-250210
	Серия 001	Серия 002	Серия 003	
1	2			3
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	Иммуноглобулин 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			–

1	2			3
Белок, %	10	9,4	9,3	От 9 до 11
pH	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

При учете результатов РН для расчета показателя в качестве образца сравнения использовали Второй Международный стандартный образец иммуноглобулина человеческого против бешенства ВОЗ (*2-nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human*) с активностью 30 МЕ.

Установлено, что в РН с *virus fixe* контрольного штамма CVS (148 ЛД₅₀) усовершенствованный иммуноглобулин характеризовался активностью 165, 151, 160 МЕ/мл соответственно для трех экспериментально-производственных серий при требовании не менее 150 МЕ/мл.

При исследовании активности усовершенствованного иммуноглобулина в прямом ДИА зарегистрированы титры защитных антител на уровне 1:5000. Результаты теста демонстрирует Рисунок 7.3.

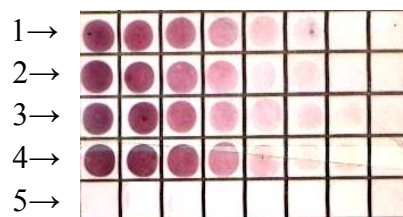


Рисунок 7.3 – Результаты определения активности усовершенствованного антирабического иммуноглобулина в прямом ДИА с применением диагностикума на основе гликопротеида *virus fixe* «Москва 3253» и наночастиц коллоидного золота

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.

Применение клеточных технологий в производстве ИЛП для парентерального введения предусматривает проведение контроля готового препарата на присутствие микоплазм. В связи с этим в программу комиссионных испытаний были включены исследования образцов полученного иммуноглобулина не только на стерильность, но и на при-

сутствие микоплазм. Препарат тестировали в ПЦР-анализе с использованием коммерческого набора PCR Mycoplasma Test Kit. Результаты ПЦР представлены на Рисунке 7.4.

Как свидетельствовали результаты ПЦР-тестирования, в образцах № 1–3 опытно-промышленных серий АИГ, полученного с применением культурального антигена, микоплазмы не обнаружены.

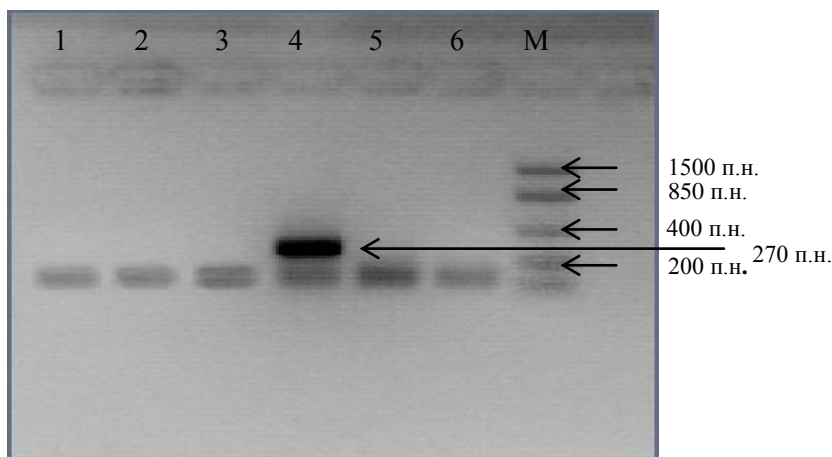


Рисунок 7.4 – Результаты ПЦР-испытаний усовершенствованного иммуноглобулина на присутствие микоплазм

1–3 дорожки – образцы АИГ экспериментально-производственных серий 001–003; 4 – К(+) из ПЦР-набора; 5, 6 – К(–) вода деионизованная; М – маркер молекулярных весов.

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.

7.3 Разработка производственно-технологической документации на получение гетерологичного антирабического иммуноглобулина с применением культуральных технологий

Внедрение культуральных технологий в промышленную схему производства АИГ, помимо проведения экспериментальной работы, потребовало разработки соответствующей производственно-технологической документации. Необходимо отметить, что документация на фармацевтическом производстве является важнейшим элементом системы управления качеством, и в настоящем исследовании коснемся таких документов, как

промышленный регламент производства, фармакопейная статья предприятия и стандартные операционные процедуры [60, 110, 192, 200, 201].

Промышленный регламент устанавливает технологические нормативы, методы производства, технические средства, порядок и условия проведения технологического процесса, обеспечивающие изготовление препарата с соответствующими требованиям НД показателями качества. В рамках настоящего исследования был разработан проект изменений к регламенту, касающихся технологического этапа получения культурального рабического антигена. Изменению и дополнению подлежали следующие разделы регламента:

- Характеристика готовой продукции производства;
- Производственные штаммы микроорганизмов;
- Изложение технологического процесса;
- Информационные материалы.

Внесение изменений в раздел «Характеристика готовой продукции» обосновано использованием культуральных технологий, которое предусматривает контроль готового препарата на присутствие микоплазм. Раздел «Производственные штаммы микроорганизмов» переименован в «Производственные штаммы микроорганизмов и клеточная линия» и дополнен описанием требований к клеткам перевиваемой линии Vero, применяемых в качестве субстрата для культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253». В разделе «Изложение технологического процесса» излагается описание этапов получения рабического антигена на основе культурального *virus fixe*, среди которых: пассирование культуры клеток Vero; подготовка клеток к криоконсервации; восстановления клеток Vero после криоконсервации; культивирование *virus fixe* «Москва 3253» на клетках Vero; концентрирование вирусного урожая тангенциальной ультрафильтрацией. Раздел «Информационные материалы» дополнен описанием метода контроля на присутствие микоплазм.

Проект изменений оформляли в виде «Ведомости изменений» согласно ОСТ 64-02-003-2002 «Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения» [173].

Обязательным этапом работы с производственно-технологической документацией являлась разработка проекта изменений в ФСП на АИГ. Указанный нормативный доку-

мент содержит перечень спецификационных показателей и описание методов контроля качества готового препарата с учетом технологических особенностей производства. Разработку проекта изменений к ФСП осуществляли в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения». В разработанном проекте изменений в действующую ФСП на антирабический иммуноглобулин внесены изменения в разделы «Производственные штаммы» и «Стерильность». Первый раздел дополнен описанием перевиваемой клеточной линии Vero для культивирования *virus fixe* «Москва 3253» и регламентирует следующие требования к данной линии:

- а) происхождение: африканская зеленая мартышка, почка;
- б) морфология: фибробластоподобная; жизнеспособность после криоконсервации: 77 %;
- в) отсутствие бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации;
- г) контроль на видовую идентичность в кариологическом и изоферментном анализе.

В проекте изменений в ФСП раздел «Стерильность» дополнен требованием к готовому препарату, предусматривающим отсутствие микоплазм в готовом препарате. В данном разделе также описание процедуры ПЦР-тестирования препарата на присутствие микоплазм с последующей визуализацией продуктов ПЦР в агарозном геле.

Внедрение новых технологических этапов в производственный процесс по выпуску иммуноглобулина требует их подробного документального описания непосредственно для операторов, задействованных при выполнении новых процедур. Подобный алгоритм действий должен быть регламентирован документом, именуемым стандартной операционной процедурой [38, 198, 201, 261]. Стандартные операционные процедуры представляют собой подробные письменные инструкции, касающиеся стандартных операций, выполняемых на производстве, и составленные по унифицированной форме. Целью стандартных операционных процедур, а их наличие обязательно на предприятии, работающем по правилам GMP [46, 192], является стандартизация деятельности сотрудников, обеспечение качественного выполнения каждой технологической операции, что обуславливает в конечном итоге получение готового продукта надлежащего качества.

В настоящий момент на каждую производственную операцию при промышленном выпуске АИГ составлена соответствующая стандартная операционная процедура. При использовании клеточных технологий при производстве антирабического иммуноглобу-

лина требуется выполнение ряда новых технологических этапов, что повлекло за собой разработку соответствующего комплекта стандартных операционных процедур.

Составлению стандартных операционных процедур предшествовала разработка методических рекомендаций учрежденческого уровня (их названия указаны во введении настоящего исследования), которые использовали для первичного обучения персонала выполнению новых технологических операционных процедур. По итогам проведенного обучения учитывали рекомендации по оптимизации технологических операций или корректировке текста, с учетом которых был разработан конечный вариант стандартных операционных процедур. Разработанные стандартные операционные процедуры содержат следующую информацию: название учреждения и подразделения (лаборатории), для которого предназначается данный документ; название документа, отражающее суть проводимой стандартной операции; подробное описание технологической операции; фамилии специалиста-разработчика и должностных лиц, утверждающих документ; дату утверждения. В разработанных стандартных операционных процедурах отражены цель выполняемых операций и область их применения в соответствии с особенностями деятельности различных производственных участков, для которых они предназначены. Приведен перечень оборудования, материалов и инструментов, используемых для выполнения конкретных стандартных процедур. Инструкции по выполнению стандартных операционных процедур содержат всю необходимую информацию, ссылки на применяемую при их разработке специальную литературу, в том числе нормативные документы. Кроме того, в разработанных стандартных операционных процедурах отражены требования к квалификации и ответственности исполнителей данной технологической процедуры.

В результате проделанной работы разработан комплект стандартных операционных процедур с подробным описанием всех подготовительных и основных процедур, касающихся приготовления рабического антигена на основе культурального *virus fixe* «Москва 3253»: «Пассирование перевиваемой клеточной линии Vero»; «Подсчет клеток перевиваемой линии Vero в камере Горяева»; «Замораживание клеточной культуры Vero»; «Размораживание клеточной культуры Vero»; «Культивирование фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на клеточной линии Vero стационарным способом»; «Подготовка ферментационного оборудования к работе»; «Подготовка культуры клеток Vero масштабированному культивированию»; «Культивирование клеточной культуры

Vero суспензионным методом»; «Культивирование фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на клеточной линии Vero суспензионным методом»; «Подготовка микроносителей Cytodex-3 к псевдосуспензионному культивированию»; «Культивирование клеточной культуры Vero псевдосуспензионным методом»; «Подсчет клеток, выращенных на микроносителях»; «Культивирование фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на клеточной линии Vero псевдосуспензионным методом»; «Культивирование клеточной культуры Vero роллерным методом»; «Культивирование фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на клеточной линии Vero роллерным методом»; «Концентрирование урожая вируса бешенства «Москва 3253» тангенциальной ультрафильтрацией»; «Работа с микродозатором переменного объема»; «Перемешивание образцов на приборе типа «Вортекс»»; «Центрифугирование на лабораторной центрифуге»; «Приготовление деионизованной воды»; «Выделение ДНК микоплазм термоллизисом»; «Проведение ПЦР для проверки проб на наличие микоплазменной инфекции»; «Приготовление буферных растворов для электрофореза»; «Приготовление агарозного геля»; «Проведение электрофореза»; «Визуализация результатов ПЦР в агарозном геле».

Таким образом, нами разработаны следующие документы, регламентирующие технологические процедуры по масштабному культивированию *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero и приготовлению культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов:

– проект изменений в промышленный регламент ПР № 01898109-26-10 на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций;

– проект изменений в фармакопейную статью предприятия на Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций Р N002639/01-250210;

– комплект стандартных операционных процедур на основные технологические операции по приготовлению антигенсодержащего материала на основе культурального *virus fixe* «Москва 3253» для последующей иммунизации лошадей-продуцентов (26 экз.).

Заключение по главе

В главе представлены результаты исследований по изучению эффективности применения рабического антигена на основе культурального *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» для иммунизации лошадей-продуцентов, получению активных иммунных сывороток и выделению из них специфического гамма-глобулина. Положительные результаты экспериментов по получению антирабических сывороток кроликов с высоким титром ВНА и выделению из них иммуноглобулина с активностью не менее 150 МЕ/мл послужили обоснованием для проведения дальнейших опытов с более крупными продуцентами – лошадьми. С применением культурального антигена получены активные иммунные сыворотки лошадей и произведены три экспериментально-производственные серии усовершенствованного гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Результаты комиссионных испытаний показали соответствие спецификационных показателей полученных образцов требованиям НД на коммерческий АИГ, что свидетельствует об эффективности разработанной технологии получения рабического антигена на основе культурального *virus fixe* «Москва 3253».

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* производственного штамма «Москва 3253».

ГЛАВА 8 РАЗРАБОТКА МОДУЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ОЧИСТКИ И СТЕРИЛИЗАЦИИ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ФИЛЬТРАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Качество выпускаемого в РосНИПЧИ «Микроб» антирабического иммуноглобулина во многом определяется эффективностью комплекса применяемых на производстве баромембранных процессов по очистке и стерилизации препарата. Разработанная специалистами института, в том числе автором исследования, уникальная система каскадной фильтрации раствора иммуноглобулина [164] обеспечивает эффективную очистку АИГ от балластных примесей и его стерилизацию, однако уязвимым местом данной схемы является использование на этапах удаления гемпигмента, депирогенизации и стерилизации раствора АИГ фильтрационных материалов зарубежного производства. Несмотря на высокое качество применяемых в производстве иммуноглобулина мембранных и глубинных фильтров таких производителей, как «Sartorius» (Германия) и «CUNO» (Франция), в настоящее время перед нами остро встал вопрос поиска конкурентноспособных отечественных аналогов указанных фильтров. Это объясняется прежде всего экономическими причинами – стоимость импортных фильтров, и без того достаточно высокая, резко возросла за последние годы, увеличив себестоимость препарата. С другой стороны, 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 [11, 229]. 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.

Исходя из вышеизложенного, задачей следующего этапа исследований явилась разработка методических подходов к эффективной и экономически целесообразной очистке и стерилизации раствора АИГ с использованием фильтрационных материалов отечественных производителей.

8.1 Изучение целесообразности применения отечественных фильтров патронного и капсульного типов для осветления, депирогенизации и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина

В данном разделе главы остановимся на весьма ответственном этапе биотехнологической схемы производства иммуноглобулина – баромембранной фильтрации, используемой для осветления, депирогенизации и стерилизации полуфабриката. Рассматриваемые баромембранные процессы можно разделить на предварительные, целью которых является очистка раствора иммуноглобулина от балластных примесей, и финишные, обеспечивающие стерилизацию продукта.

К предварительному этапу относится осветляющая фильтрация раствора антирабического иммуноглобулина, во время которой происходит удаление гемпигмента и достижение показателя цветности, удовлетворяющего требованиям НД на АИГ. Согласно ФСЦ, данный показатель не должен превышать 0,15 опт. ед. Традиционно для коррекции цветности белковых фармацевтических растворов применяются глубинные фильтры на основе активированного угля, в частности, при производстве антирабического иммуноглобулина для этих целей используются 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 было выявлено, что компания «Владисарт» производит предварительные картонные угольные фильтры (ФПК) по ТУ 9471-001-00212038 в виде дисков диаметром 142 мм (Рисунок 8.1). Данные фильтры характеризуются повышенной адсорбционной способностью благодаря наличию в них частиц активированного угля и рекомендованы производителем для проведения предварительной фильтрации с целью коррекции цветности фармацевтических растворов. В эксперимент по изучению эффективности осветляющей фильтрации с использованием отечественных дисков ФПК в сравнении с импортными аналогами был взят раствор антирабического иммуноглобулина 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.

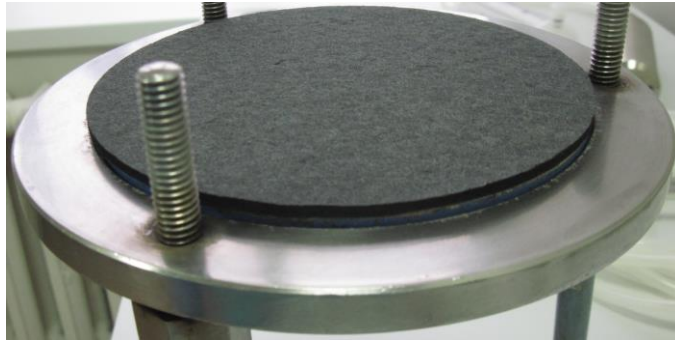


Рисунок 8.1 – Фильтр предварительный картонный дисковый с активированным углем («Владисарт», Россия) на пластине фильтродержателя

Раствор с содержанием белка (10 ± 1) % предварительно подогревали до (37 ± 1) °С и поддерживали температуру раствора на протяжении всего процесса фильтрации. Результаты испытаний представлены в Таблице 8.1.

Таблица 8.1 – 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 ± 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 ± 1) °С под давлением 0,03 МПа	$0,37 \pm 0,001$	$0,026 \pm 0,002$

Как свидетельствуют данные Таблицы 8.1, по окончании фильтрации с использованием глубинных фильтров двух производителей были получены растворы с показателями цветности, соответствующими требованиям ФСП на АИГ. Полученные результаты позволяют говорить о возможности использования угольных картонных фильтров ФПК производства «Владисарт» (Россия) для удаления гемпигмента из раствора антирабического иммуноглобулина на этапе проведения предварительной фильтрации.

Следующим этапом фильтрационного каскада по очистке и стерилизации иммуноглобулина является депирогенизирующая фильтрация, задачей которой является удаление пирогенов (эндотоксинов) из раствора иммуноглобулина. Надо сказать, проблема пирогенности весьма актуальна и подчас труднорешаема для многих производителей инъекционных препаратов, в связи с чем предлагается множество способов удаления пирогенов [83, 104, 193, 267, 492, 562]. В производстве ИЛП, являющихся препаратами крови, а к ним относится АИГ, данная проблема отчасти связана с биологической природой самого сырья, что в значительной степени увеличивает вероятность производственных рисков.

Важно понимать, что очистка раствора иммуноглобулина от пирогенов – проблема комплексная, и конечный успех зависит не только от выбора эффективного фильтра на конкретном этапе. Значение пирогенности, скорее, является показателем асептичности производства препарата в целом, начиная от этапа забора иммунной крови и ее переработки и заканчивая розливом в первичную упаковку. Чем меньше полуфабрикат будет контаминирован микроорганизмами на начальных этапах технологической линии, а это не исключено в силу природы сырья, тем эффективнее будет конечная очистка препарата. В рамках данной работы мы не рассматриваем вопросы водоподготовки и условий первичной упаковки, оговорим лишь, что на этапах фракционирования иммунной сыворотки и разведения осадка иммуноглобулина особое внимание уделяется качеству воды очищенной и воды для инъекций, а розлив иммуноглобулина в ампулы осуществляется в контролируемых условиях «чистых помещений» зоны А в соответствии с требованиями правил надлежащей производственной практики GMP [46, 192, 242].

По химическому составу пирогенные вещества представляют собой липополисахаридные (ЛПС) или липополисахаридно-протеиновые комплексы наружных мембран грамотрицательных бактерий, называемые еще бактериальными эндотоксинами [492]. По сравнению с белками, бактериальные эндотоксины очень стабильны. Их стабильность сохраняется при высоких значениях температур и в широком диапазоне pH. ЛПС устойчивы к физическим воздействиям и выдерживают автоклавирование в течение 3 ч при температуре 121 °С. Сложность удаления пирогенов связана и с их малыми размерами, как правило, это частицы с молекулярной массой 10–20 кДа. ЛПС заряжены отрицательно в щелочной, нейтральной и слабокислой среде благодаря наличию фосфатных групп, входящих в гликозидные остатки. На этом свойстве основано большинство мето-

дов удаления ЛПС. Для очистки от эндотоксинов фармпроизводители используют активированный уголь и ионообменные смолы, хроматографию с гидрофобным взаимодействием, глубинные фильтры с поверхностным положительным зарядом [267]. Помимо глубинной фильтрации, для удаления пирогенов применяют мембранную нанофильтрацию на плоскостных и спиральных фильтроэлементах, хотя в последнем случае действуют ограничения по молекулярной массе и этот метод доступен только при очистке растворов веществ с молекулярной массой менее 20 кДа. Для сравнения – АИГ имеет молекулярную массу 160 кДа, и для эффективной депирогенизации ранее нами была разработана схема с использованием модифицированных глубинных фильтров Zeta Plus (CUNO, Франция) на основе диатомита с двойным сорбционным механизмом – за счет положительного Zeta-потенциала на поверхности фильтра и сорбции в глубине матрикса [164]. При решении проблемы поиска аналога данного фильтра наше внимание привлек относительно новый класс отечественных мембранных материалов – положительно заряженных мембранных микрофильтров, изготовленных из модифицированного полиамида (капрона). Надо отметить, что полиамиды занимают одно из первых мест в производстве мембран для микрофильтрации, что обусловлено такими свойствами этого материала, как термостабильность, инертность, гидрофильность, устойчивость к химической нагрузке, малое содержание экстрагируемых веществ [55, 114, 231]. По данным производителя, модифицированные сорбирующие мембраны, изготовленные из полиамида (nylon₆₆₊₆) с положительно заряженными функциональными группами, обладают положительным Zeta-потенциалом от 4 до 40 mV. Особенность такого микрофильтра заключается в том, что он поверхностно модифицирован с целью придания ему сорбционных свойств и, по сути, может являться депирогенизирующей полимерной мембраной. Основная функциональная нагрузка при фильтрации через мембранный сорбент ложится не на межструктурные пространства – поры, ответственные за эффективность удержания частиц по размерам, а на поверхность структурных элементов. Если в обычных мембранах преобладает ситовый механизм задержания, то в заряженных – электростатический, что позволяет задерживать микрочастицы значительно меньших размеров, чем диаметр пор микрофильтра, например пирогены с размерами 10–20 кДа [228].

Таким образом, при выборе аналогов глубинных фильтров с Zeta-потенциалом мы остановились на фильтрационных элементах на основе сорбирующих мембранных микрофильтров производства ООО НПП «Технофильтр». Надо отметить, что продукция

данного российского производителя, а именно патронные элементы на основе обычных мембран с ситовым механизмом, используются нами для первой ступени предварительной фильтрации уже более 10 лет, но в данном случае научный и практический интерес представляли экспериментальные исследования по эффективности использования модифицированных мембранных сорбентов на этапе депирогенизации раствора антирабического иммуноглобулина.

Решив задачу по выбору депирогенизирующего фильтра, далее необходимо было определиться с типом фильтрационного модуля и размером пор его основы – мембранного сорбента. Оптимальным фильтроэлементом, на наш взгляд, является использование фильтрационных капсул на основе модифицированной мембраны, которые с недавнего времени появились в ассортименте ООО НПП «Технофильтр». В эксперимент были взяты фильтрационные капсулы КФМ.К+ с двуслойным мембранным сорбентом с размером пор 020/020 мкм, высотой 60 и 125 мм, представляющие собой неразъемный фильтр, состоящий из внешнего полипропиленового корпуса с запрессованным в него фильтропатроном. Элемент с двуслойной мембраной в данном случае предпочтительнее, поскольку обеспечивает определенный запас надежности фильтра, что важно, учитывая ценность фильтруемого продукта. Поскольку раствор иммуноглобулина относится к числу вязких труднофильтруемых жидкостей, исследовали пропускную способность каждого типа капсулы. Подготовка к депирогенизирующей фильтрации включала в себя обязательное смачивание капсулы водой для инъекций, проверку целостности фильтра, подключение соединительных шлангов и стерилизацию собранной системы автоклавированием под давлением $(0,11 \pm 0,01)$ МПа при температуре (121 ± 1) °С в течение 30 мин. Фильтруемый раствор иммуноглобулина характеризовался содержанием белка (10 ± 1) %, рН $(7,0 \pm 0,4)$. Давление, подаваемое в систему для проведения фильтрации, составляло 0,02 МПа. Во избежание образования слоя геля на поверхности мембран и закупорки ее пор раствор белка предварительно подогревали до 37 °С и поддерживали температуру раствора на протяжении всего процесса. Результаты эксперимента представлены в Таблице 8.2.

Таблица 8.2 – 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 ²	Объем про-фильтрованного раствора АИГ, дм ³	Потери препарата	
				дм ³	%
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

Полученные результаты послужили нам дальнейшим ориентиром при выборе типа фильтра в зависимости от количества раствора, требующего очистки. Для партий объемом не более 20 дм³ 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) %. Чем обусловлен выбранный нами размер пор мембранного сорбента – 020/020 мкм? Принимая во внимание, 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, его нагрузка, в том числе микробиологическая, сведена к минимуму. Результаты эксперимента подтвердили наш правильный выбор, поскольку капсулы «справились» с предложенным объемом труднофильтруемого белкового раствора. В дальнейших экспериментах по депирогенизации использовали фильтровальные капсулы КФМ.К+-020/020-К-125 (Рисунок 8.2).



Рисунок 8.2 – Фильтровальный капсульный элемент КФМ.К+ на основе двуслойной модифицированной мембраны из полиамида, «Технофильтр», Россия

Для изучения эффективности мембранного сорбента в отношении удержания пирогенов в работу был взят раствор иммуноглобулина с показателем пирогенности $(3,2 \pm 0,1) \text{ } ^\circ\text{C}$, превышающим предельно допустимый по НД уровень $(1,4 \text{ } ^\circ\text{C})$ более чем в 2 раза. Депирогенизацию проводили в соответствии с условиями, описанными выше. 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 $(1,8 \pm 0,2) \text{ } ^\circ\text{C}$ (Рисунок 8.3).

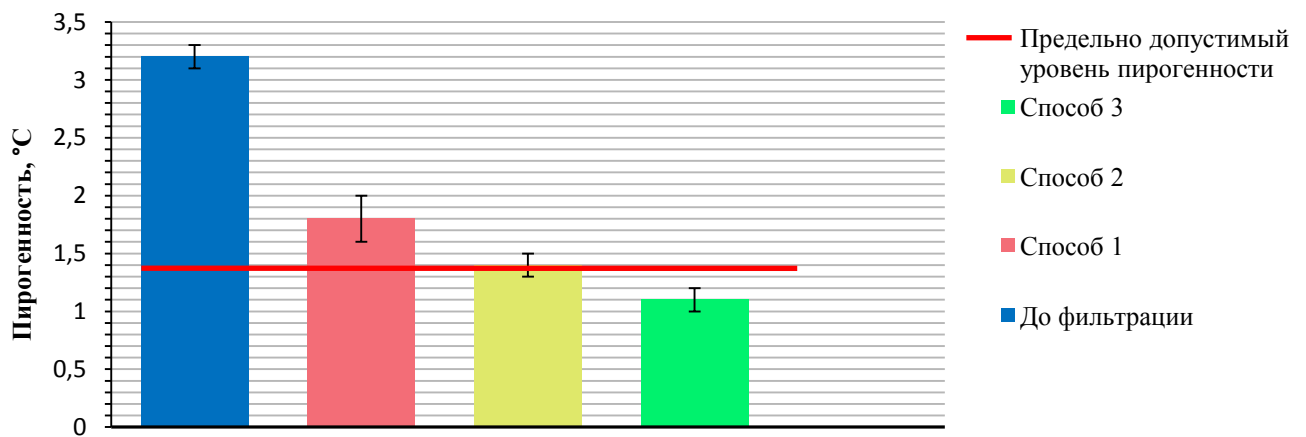


Рисунок 8.3 – Эффективность депирогенизации раствора антирабического иммуноглобулина с использованием отечественных мембранных сорбентов «Технофильтр»

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 $0,45/0,20 \text{ мкм}$ применили такой же 10" патрон, но на основе мембранного сорбента ЭПМ.К+-045/020 (способ 2).

В результате двухэтапной очистки через мембранные сорбенты значение пирогенности снизилось до порогового уровня и составило $(1,4 \pm 0,1) \text{ } ^\circ\text{C}$ (Рисунок 8.3). Учитывая,

что содержание пирогенов в растворе иммуноглобулина после завершения первичного цикла все же имело значение, близкое к пороговому, продукт еще раз подвергали 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 $(1,1 \pm 0,1)$ °С (Рисунок 8.3).

Таким образом, испытание мембранных сорбентов на основе двуслойной модифицированной полиамидной мембраны с размерами пор 045/020 и 020/020 мкм позволило рекомендовать их для депирогенизирующей очистки иммуноглобулина от пирогенов взамен глубинных фильтров фирмы CUNO с Zeta-потенциалом зарубежного производства.

Дальнейшим этапом исследований являлась экспериментальная оценка отечественных фильтров для проведения баромембранного процесса по стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина. Стерилизация – это финишная процедура в схеме очистки продукта, предполагающая практически абсолютное удаление из продукта микроорганизмов, в отличие от стадии депирогенизации, где мы добиваемся снижения концентрации пирогенов до безопасного уровня. Эффективность баромембранного процесса по стерилизации во многом зависит от двух факторов. Во-первых, продукт, а в данном случае это раствор антирабического иммуноглобулина, должен быть максимально очищен от контаминантов на предыдущих стадиях очистки. Этот принцип соблюден нами благодаря применению нескольких фильтров в цепи фильтрационного каскада: патронных и капсульных фильтров с микронным рейтингом от 0,80 до 0,20 мкм. Во-вторых, на данном этапе должны использоваться исключительно стерилизующие фильтры, а к ним можно отнести отнюдь не все фильтры с размером пор 0,20 мкм [233]. Международно-признанная формулировка названия стерилизующего фильтра включает определение, согласно которому стерилизующий фильтр должен гарантировать отсутствие в фильтрате микроорганизмов после нанесения на фильтр как минимум 10^7 клеток бактерий *Brevundimonas diminuta* на 1 см^2 рабочей площади фильтра. До недавнего времени отсутствие именно этого валидационного теста ограничивало использование отечественных фильтров для стерилизации инъекционных растворов.

Ранее для стерилизующей фильтрации раствора антирабического иммуноглобулина использовали дисковые мембранные фильтры отечественного производства («Влади-

сарт») на основе ацетата целлюлозы диаметром 142 мм и микронным рейтингом 0,2 мкм. Чтобы увеличить эффективную площадь фильтрации при проведении производственного цикла по стерилизации раствора АИГ объемом до 30 дм³, использовали комплект из 10 мембран, заправленных между пластинами фильтродержателя. Однако данная нестандартная установка характеризовалась рядом недостатков, и требовалось решение нескольких достаточно существенных проблем:

- использование дисковых стерилизующих мембран сопряжено с потерей времени на сборку и разборку стерилизующей установки;
- вероятность повреждения хрупкой дисковой мембраны в процессе сборки системы и ее стерилизации;
- громоздкость фильтрационной системы в собранном виде и связанное с этим неудобство при автоклавировании;
- контакт продукта с материалом фильтродержателя;
- необходимость замены нестандартного оборудования (фильтродержатель для дисковых фильтров) на аттестованное согласно требованиям GMP.

В результате поиска нового, эффективного и стандартного оборудования для стерилизующей фильтрации иммуноглобулина взамен дисковых фильтров в производство были успешно внедрены стерилизующие капсулы Sartobran P («Sartorius», Германия) на основе ацетатцеллюлозной мембраны, довольно часто используемые в производстве лекарственных иммунобиологических препаратов [98, 164].

Ориентируясь на отечественного производителя фильтрационных материалов, а также с целью максимального исключения зависимости производства иммуноглобулина от зарубежных расходных фильтроматериалов, нами были проведены эксперименты по изучению эффективности стерилизующих капсул «Технофильтр». Кроме того, предприятие-изготовитель проинформировал производителей лекарственных средств, что тест на эффективность удержания тест-культуры *B. diminuta* в концентрации 10⁷ клеток на 1 см² площади фильтра включен в программу квалификационных испытаний стерилизующих фильтров на производстве, согласно Руководству по валидации [229, 230].

В экспериментах по стерилизации антирабического иммуноглобулина были использованы фильтрующие элементы 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. Все названные элементы имеют сертификаты соответствия для медицинской

промышленности, их безопасность подтверждена токсикологическими испытаниями, апиrogenность доказана при исследовании фильтров по показателям «пирогенность» и «бактериальные эндотоксины» [158]. Содержание белка в фильтруемом растворе составляло $(10 \pm 1) \%$, pH $(7,0 \pm 0,4)$. Баромембранный процесс осуществляли при давлении $(0,03 \pm 0,01)$ МПа и температуре раствора $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$. Технологический процесс стерилизующей фильтрации иммуноглобулина состоит из ряда последовательно выполняемых операций, представленных на Рисунке 8.4.

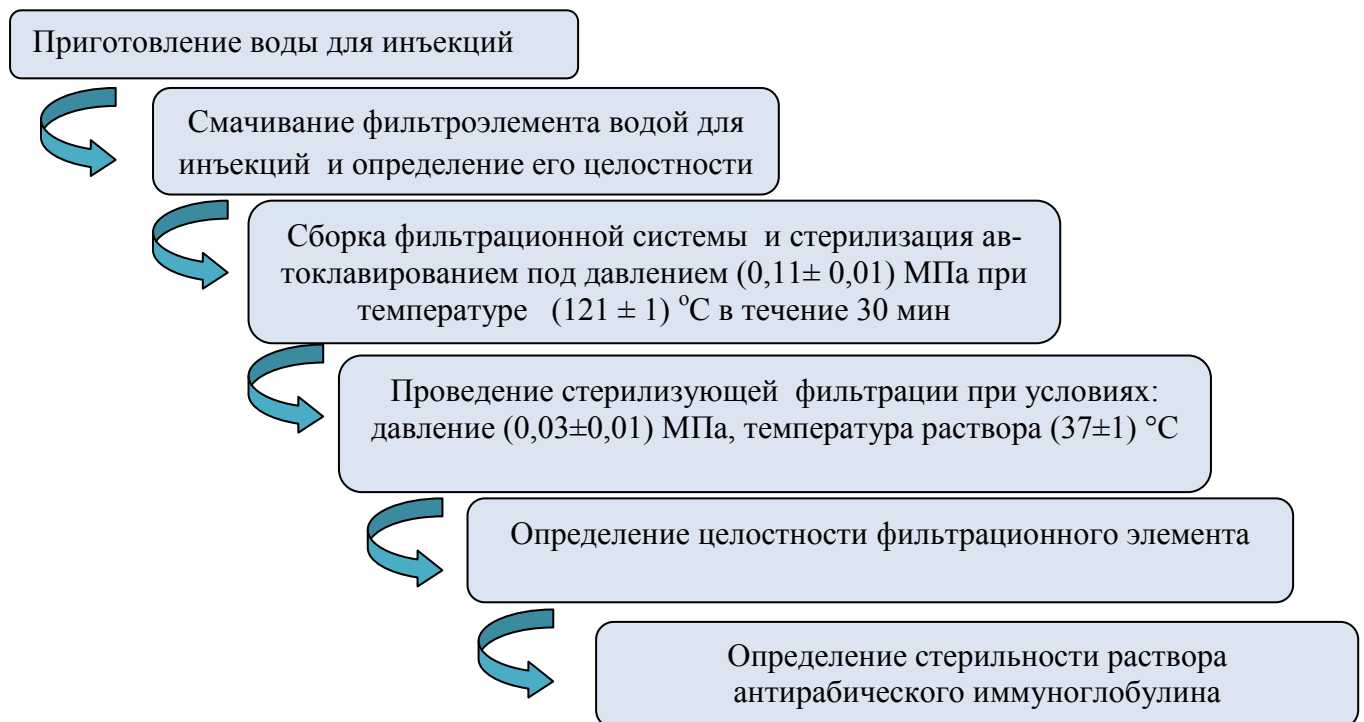


Рисунок 8.4 – Последовательность этапов подготовки и проведения стерилизующей фильтрации раствора антирабического иммуноглобулина

Стерилизующие капсулы проверяли на целостность дважды – до фильтрации и после окончания процесса, как того требуют правила GMP [46, 192].

Эффективность процесса оценивали по критерию стерильность раствора антирабического иммуноглобулина после фильтрации. Образцом для сравнения служила стерилизующая капсула Sartobran P зарубежного производства на основе мембраны из ацетата целлюлозы. Результаты тестирования представлены в Таблице 8.3.

Таблица 8.3 – Результаты испытаний фильтроэлементов капсульного типа отечественного производства при стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина (n=10)

Тип фильтрующего капсульного элемента	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	Модифицированный полиамид (Nylon-6 + Nylon-66) с положительным Zeta-потенциалом	100	10 / 100
КФМ.К		0,20/0,20	Полиамид	100	10 / 100
КФМ.К		0,45/0,20	Полиамид	100	10 / 100
КФМ.К		0,45/0,20	Полиамид	100	10 / 100

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. Использование на финальной стадии очистки иммуноглобулина капсульных элементов на основе модифицированного капрона (полиамида) КФМ.К+-0,20/0,20 позволяет совместить стерилизацию и дополнительную депирогенизацию. На наш взгляд, на завершающем этапе стерилизации иммуноглобулина предпочтительнее использование элементов с минимальным размером пор 0,20/0,20 мкм для обеспечения высокого запаса надежности на столь критичной стадии технологического процесса.

Производитель отечественных стерилизующих капсул указывает на возможность многократного использования фильтроэлементов при их 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 антираби-

ческого иммуноглобулина. Данная позиция отвечает требованиями надлежащей производственной практики [46, 192].

Таким образом, на основании полученных результатов представляется целесообразным использовать для осветления, депирогенизации и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина схему, состоящую из следующих технологических процедур с использованием фильтров отечественного производства: предварительная осветляющая фильтрация через патронные мембранные элементы ЭПМ.К-0,80/0,45 и модифицированные ЭПМ.К+-0,45/0,20, далее после диализа очистка на глубинных угольных фильтрах ФПК диаметром 142 мм, двукратная фильтрация через мембранные сорбенты капсульного типа КФМ.К+-0,20/0,20, совмещающая депирогенизацию и стерилизацию препарата.

8.2 Эффективность внедрения фильтрационной технологии с использованием отечественных фильтров в производство антирабического иммуноглобулина

Качественная очистка и стерилизация антирабического иммуноглобулина, являющегося инъекционным лекарственным препаратом, предусматривает значительные расходы на приобретение современных фильтрационных материалов, отвечающих требованиям надлежащей производственной практики.

Представлялось целесообразным рассчитать экономическую эффективность предложенных биотехнологических решений по очистке и стерилизации антирабического иммуноглобулина с применением отечественных фильтрационных материалов. Расчет производили, ориентируясь на выпуск препарата объемом 400 л в год. Стоимость фильтров зарубежного производства, применяемых при выполнении технологических операций по фильтрации раствора иммуноглобулина, составляет в среднем 692508,5 руб., из которых 75107 руб. приходится на стоимость глубинных фильтров CUNO, а 617401,5 руб. – на капсулы Sartobran. Приобретение мембранных сорбентов отечественного производства для фильтрации этого же количества иммуноглобулина обходится в 476000,25 руб., годовая экономия при этом составляет 216508,25 руб.

Заключение по главе

Предложена оригинальная модульная система очистки, осветления, депирогенизации и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина с использованием оте-

чественных 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 нормативной документации. 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).

ГЛАВА 9 НАУЧНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОЛУЧЕНИЯ НОВОЙ ФОРМЫ ВЫПУСКА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА – ЛИОФИЛИЗАТА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ВНУТРИМЫШЕЧНЫХ ИНЪЕКЦИЙ

Наиболее эффективным способом повышения стабильности свойств иммунобиологических препаратов при хранении и транспортировании считается их выпуск в лиофилизированной форме [82, 99, 102, 162, 194, 409, 517]. Технология лиофильного высушивания препаратов иммуноглобулиновой природы в РосНИПЧИ «Микроб» применяется уже более 40 лет, поскольку институт производит диагностические иммуноглобулины в форме лиофилизатов. Именно поэтому в первых опытах по лиофилизации АИГ в качестве основы мы рассматривали разработанную в РосНИПЧИ «Микроб» промышленную технологию лиофильного высушивания медицинских изделий иммуноглобулиновой природы с использованием сублимационного оборудования Frigera LZ 9. Несмотря на то, что данная установка долгое время надежно используется в институте при производстве медицинских изделий, на сегодняшний день она отработала свой номинальный ресурс и является морально устаревшей. Приобретение нового, современного лиофильного оборудования явилось предпосылкой к проведению исследований по оптимизации технологии лиофильного высушивания антирабического иммуноглобулина с отработкой оптимальных параметров данного процесса.

В данной главе будут рассмотрены вопросы получения и изучения свойств гетерологичного АИГ и его $F(ab')_2$ -фрагментов в лиофилизированной форме.

9.1 Определение эвтектической температуры и исследование тепловых характеристик антирабического иммуноглобулина

Максимальное сохранение биологической активности иммуноглобулинов в процессе лиофильного высушивания зависит от выбора оптимальной температуры замораживания [92, 154, 155, 166]. Лиофилизация белкового раствора при температуре, превышающей предельно допустимую, может вызвать частичное оттаивание и привести к резкому ухудшению свойств препарата. Для выбора оптимальной температуры замораживания АИГ представлялось целесообразным определить его $T_{эвт}$ и провести исследование тепловых свойств, включающее определение температур кристаллизации,

плавления и стеклования с учетом состава стабилизирующих веществ, введенных в состав препарата.

В эксперименте по определению *Тэвт* раствора АИГ методом ЭП [469] использовали образцы № 1, 2, 3, содержащие лиопротекторы в различных комбинациях: образец № 1 содержал глицин ($2,25 \pm 0,25$) %; в образец № 2 был включен двухкомпонентный стабилизатор – сахароза (1 %) и глицин ($2,25 \pm 0,25$) %; образец № 3 содержал в составе глицин ($2,25 \pm 0,25$) % и мальтозу (1 %). Отметим, что мальтоза и сахароза применяются в биотехнологической практике в качестве стабилизаторов при изготовлении лечебных иммуноглобулинов. Контрольным образцом служил 0,9 % раствор хлорида натрия с известной *Тэвт*, составляющей, по литературным данным, минус 21 °С [166]. Измерение *Тэвт* контрольного раствора и опытных образцов АИГ проводили, определяя зависимость удельного сопротивления изучаемых растворов от температуры в диапазоне от минус 50 до 0 °С. Так как сопротивление льда электрическому току бесконечно велико, при полном затвердевании образца, превращающегося в ледяной блок, электрический ток не проходит и сопротивление не удается измерить до начала оттаивания образца. Графики зависимости значения удельного электрического сопротивления от температуры экспериментальных растворов представлены на Рисунке 9.1.

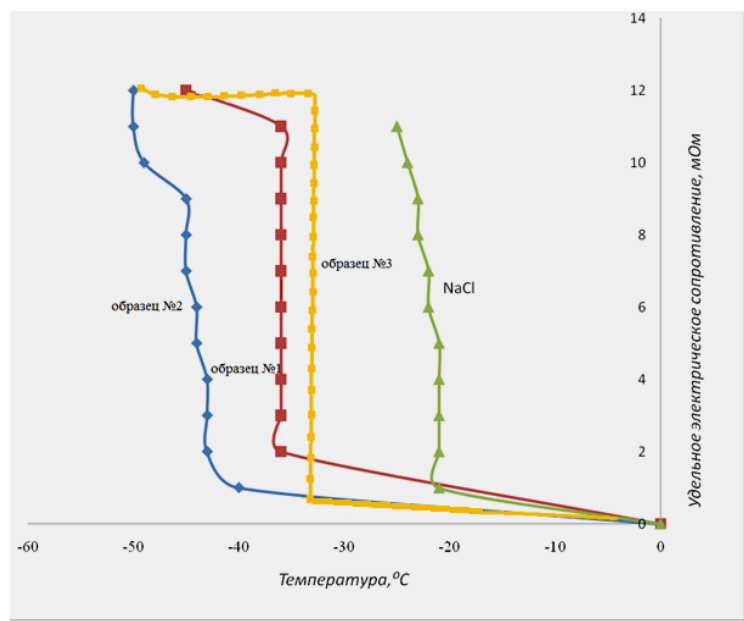


Рисунок 9.1 – Зависимость удельного электрического сопротивления от температуры растворов иммуноглобулина с различными лиопротекторами

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

Как видно на Рисунке 9.1, *Тэвт* раствора хлорида натрия равна минус 21 °С, что совпадает с литературными данными [166].

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.

Для экспериментального обоснования оптимальной температуры замораживания и сублимации препарата были изучены тепловые свойства раствора иммуноглобулина с разным составом стабилизаторов, для этого использовали термический анализ, а именно ДСК. Данный вид термического анализа применим при изучении процессов кристаллизации, плавления и стеклования растворов при их замораживании.

В опыт взяли образцы АИГ № 1 и № 2, описанные выше в данном пункте. В процессе охлаждения иммуноглобулина на термограммах выявляли экзотермические пики, соответствующие кристаллизации; в процессе нагревания – эндотермические пики, проявляющиеся при плавлении образцов.

Анализ данных ДСК-калориметрии выявил, что в температурном диапазоне от минус 70 °С до 25 °С в процессе кристаллизации-плавления для обоих образцов были характерны ярко выраженные первичные фазовые переходы. На термограммах видно, что переход из жидкого состояния в твердое (кристаллическое) сопровождался выделением тепла, что соответствовало экзотермическому пику (Рисунки 9.2, 9.3).

Последующий процесс плавления сопровождался поглощением тепла и на термограмме был зафиксирован эндотермический пик. Вторичной кристаллизации, для которой характерно наличие еще одного экзо-максимума на кривой ДСК не обнаружено ни для образца № 1, ни для образца № 2. В ходе опыта были зарегистрированы практически одинаковые значения энтальпии кристаллизации и плавления образца № 1 (Таблица 9.1).

Как следует из Таблицы 9.1, объект № 1 плавился и кристаллизовался соответственно с поглощением и выделением одного и того же количества тепла при отсутствии сопутствующих фазовых переходов, что подтверждает правильность полученных данных.

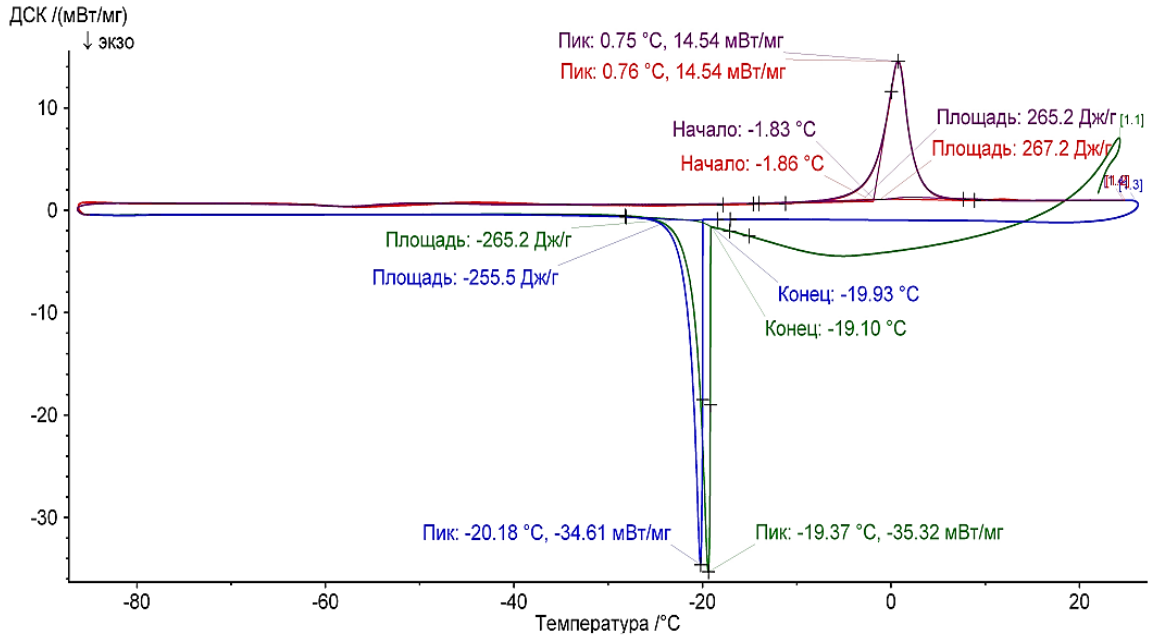


Рисунок 9.2 – Термограмма кристаллизации-плавления образца АИГ № 1 с однокомпонентным стабилизатором

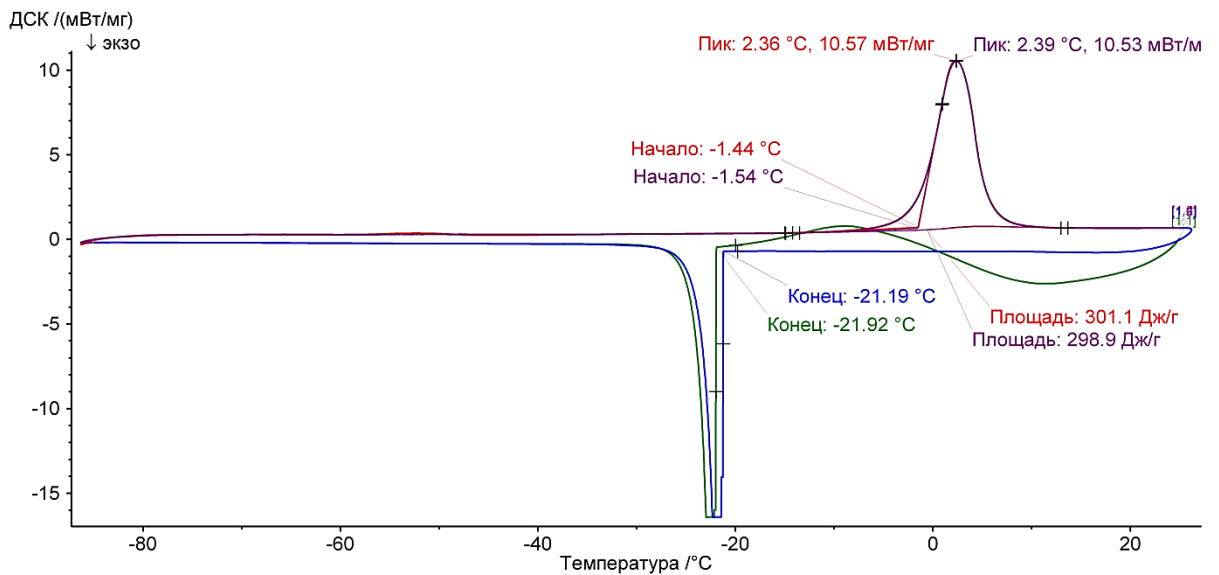


Рисунок 9.3 – Термограмма кристаллизации-плавления образца АИГ № 2 с двухкомпонентным стабилизатором

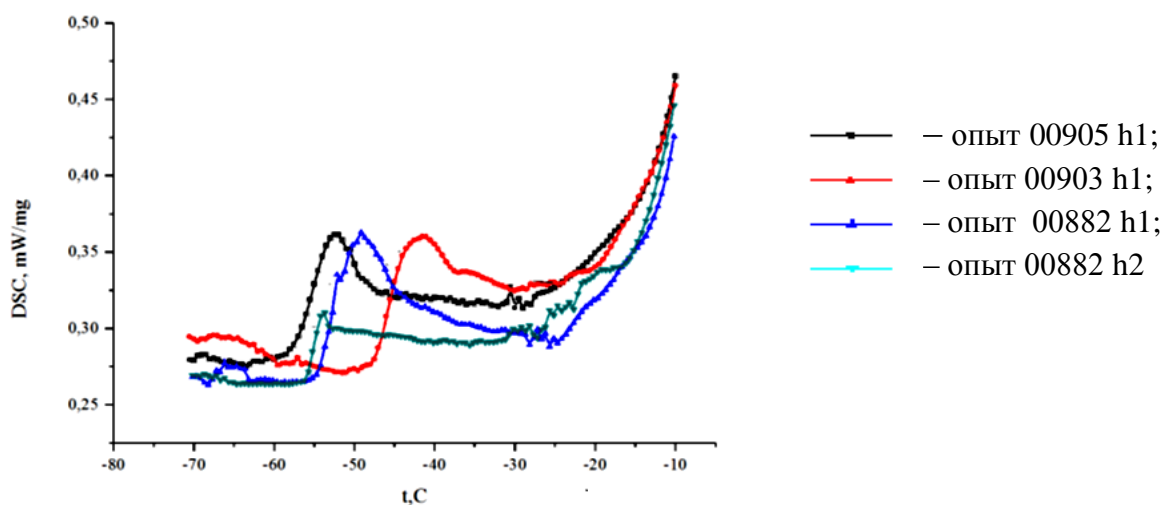
Таблица 9.1 – Энтальпийные характеристики, температура кристаллизации и плавления образцов иммуноглобулина с различными стабилизаторами

Номер опыта	Температура кристаллизации, °С		Температура плавления, °С		Энтальпия плавления, Дж/г
	$t_{\text{нач}}$	$t_{\text{мах}}$	$t_{\text{нач}}$	$t_{\text{мах}}$	
Образец № 1 (стабилизатор глицин)					
00895	минус 19,10	минус 20,18	минус 1,83	0,76	(255,5) [*] /267,2
	минус 19,93	минус 19,37	минус 1,86	0,75	(265,2)/265,2
00904	минус 14,50	– ^{**}	минус 2,39	1,77	–/265,2
	минус 11,80	–	минус 2,28	1,77	–/266,7
Образец № 2 (стабилизатор глицин+сахароза)					
00882	минус 22,11	–	минус 1,66	2,15	–/294,1
	минус 22,71	–	минус 1,66	2,15	–/297,8
00905	минус 21,19	–	минус 1,44	2,36	–/301,1
	минус 21,92	–	минус 1,54	2,39	–/298,9
00903	минус 21,70	–	минус 1,50	2,6	–/296,5

Примечание: * – в скобках указаны энтальпии кристаллизации;

** – температура в точке максимума и энтальпия кристаллизации не определена

Для образца АИГ № 2 с сахарозой не были выявлены температура пика и энтальпия кристаллизации, однако было обнаружено стеклование на ветви нагрева замороженного вещества (опыты 00882, 00903, 00905), что свидетельствовало о переходе некоторого количества воды из-за наличия сахарозы в некристаллическое (аморфное) твердое состояние (Рисунок 9.4).



Температура стеклования

Рисунок 9.4 – Стеклование образца иммуноглобулина № 2 с двухкомпонентным стабилизатором при первом (h1) и повторном нагревах (h2)

Температурный диапазон стеклования образца № 2 с двухкомпонентным стабилизатором находился в пределах от минус 46,21 до минус 56,23 °С (Таблица 9.2).

Таблица 9.2 – Характеристика стеклования образца антирабического иммуноглобулина № 2, содержащего сахарозу (n=4)

Номер опыта	Начальная температура, °С	Конечная температура, °С	Средняя температура, °С	Изменение теплоемкости, Дж/(г·К)
00905 h1	минус 57,65	минус 54,96	минус 56,23	0,319
00903 h1	минус 47,87	минус 44,60	минус 46,21	0,483
00882 h1	минус 53,99	минус 52,28	минус 53,18	0,399
00882_h2	минус 56,05	минус 54,57	минус 55,20	0,226

Следовательно, при температуре выше данного значения образец с сахарозой может иметь частично жидкое или высокоэластичное состояние. Во избежание подобного коллапса в технологии высушивания принято поддерживать температуру замораживаемого объекта ниже критической точки. В данном случае эта температура соответствует значениям от минус 46,21 до минус 56,23 °С.

Отсутствие стеклования у образца № 1 и наличие данного фазового перехода у образца № 2 можно объяснить наличием в их составе стабилизаторов различной природы. Известно, что природа стабилизирующих веществ, входящих в состав препарата, оказывает существенное влияние на кинетику этапа замораживания, о чем описано выше, в главе 2. Результаты, полученные нами при проведении ДСК-измерений, подтвердили эти данные. Входящий в состав препарата глицин, кристаллизующийся при замораживании, обусловил отверждение раствора по механизму эвтектики с выделением смеси кристаллов льда и растворенных веществ. Включение в состав препарата сахарозы, имеющей углеводную природу, вызвало затвердевание раствора по механизму стеклования.

Заметим, что метод ЭП является основным методом при определении эвтектических температур препаратов, в состав которых входят наполнители кристаллической природы, например, глицин. Метод ДСК чувствителен к фазовым переходам второго рода, таких как стеклование, и применяется совместно с методом ЭП для характеристики состава объектов, поступающих на лиофилизацию.

Таким образом, экспериментально определены эвтектические точки образцов АИГ с различными стабилизаторами и исследованы их тепловые параметры. Для образца № 1, содержащего глицин, эвтектическая температура составила минус 36 °С; на ДСК-кривых зарегистрированы только пики кристаллизации и плавления. Для образца № 2, содержащего глицин в комбинации с сахарозой, эвтектическая температура имела значение минус 44 °С, а наличие сахарозы обусловило стеклование образца. Значение эвтектической температуры для образца № 3, содержащего глицин в комбинации с мальтозой, составило минус 34 °С.

9.2 Влияние лиопротекторов различной природы на качество антирабического иммуноглобулина в лиофилизированной форме

Поскольку при лиофилизации иммуноглобулинов неизбежны риски, связанные с нарушениями структуры белковых молекул, для решения проблемы стабилизации в практической биотехнологии при лиофилизации широко применяются различные наполнители-лиопротекторы (стабилизаторы). Они обеспечивают молекулярное окружение белковых молекул подобно нативному состоянию и препятствуют возникновению нежелательных химических и конформационных изменений [6, 195].

Традиционно в технологии производства АИГ в форме раствора для инъекций в качестве стабилизатора применяется глицин в концентрации (2,25±0,25) %, поддерживающий стабильность свойств раствора АИГ. Глицин является формообразующим наполнителем и наряду с другими стабилизаторами применяется при лиофилизации лечебных иммуноглобулинов различной специфичности [302]. Помимо глицина, в биотехнологической практике используют ряд других лиопротекторов – мальтозу, сахарозу, глюкозу, фруктозу, сорбит, маннитол, модифицированный желатин, из них первые два являются наиболее широко применяемыми в дополнение к глицину [102]. В Российской Федерации мальтоза впервые вошла в состав внутривенного иммуноглобулина в 2000 г. при производстве препарата в ГУП «Иммунопрепарат», г. Уфа [82]. Вышеописанное обусловило проведение экспериментальных работ по изучению эффективности применения мальтозы и сахарозы в комбинации с глицином в качестве стабилизаторов при лиофильном высушивании раствора АИГ.

В опытах изучали условия лиофилизации раствора иммуноглобулина с содержанием белка (10±1) % с добавлением различных лиопротекторов (образцы № 1–7 соответственно): глицин (2,25±0,25) % в комбинации с сахарозой (1, 5, 10 %); глицин

($2,25 \pm 0,25$) % в комбинации с мальтозой (1, 5, 10 %). В качестве образца для сравнения использовали иммуноглобулин с содержанием глицина ($2,25 \pm 0,25$) %. Жидкий препарат АИГ высушивали в объеме 1 мл в стеклянных флаконах объемом 3 мл. С использованием рефрижератора сверхнизких температур образцы замораживали в соответствии с выявленными значениями эвтектических температур: образцы АИГ с сахарозой и глицином – до минус (44 ± 1) °С; образцы АИГ с мальтозой и глицином – до минус (38 ± 1) °С. После замораживания образцы выдерживали при конечной температуре в течение 3 ч. Далее на сублимационной установке Frigera LZ 9 осуществляли процесс лиофилизации по традиционной технологии, используемой в институте «Микроб» для сублимационного высушивания иммуноглобулиновых диагностических препаратов.

Включение в состав препарата мальтозы и сахарозы, имеющих углеводную природу, 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 9.5).

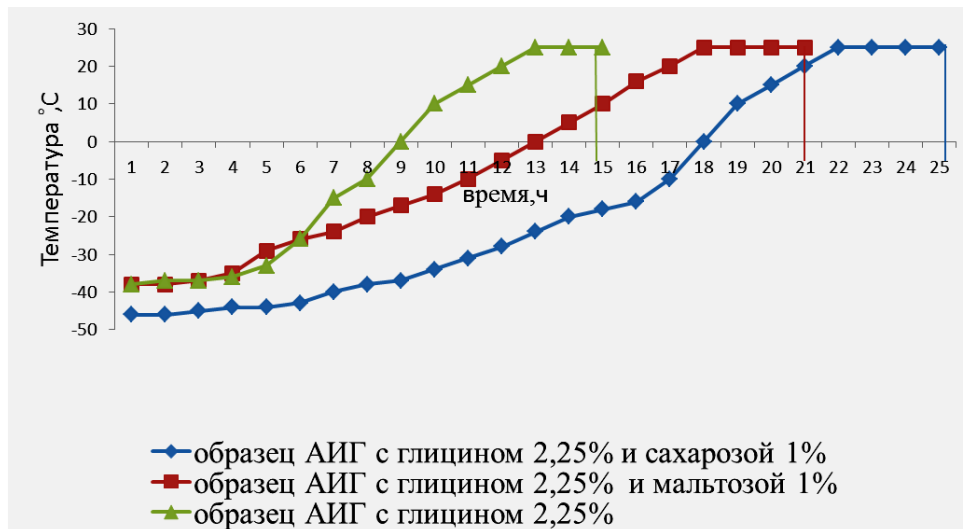


Рисунок 9.5 – Длительность процесса сублимационного высушивания АИГ с лиопротекторами различной природы

Эффективность использования указанных лиопротекторов оценивали по следующим показателям лиофилизатов – описание (внешний вид) полученной таблетки, содержание белка, ПМВ, время растворения (Таблица 9.3). Активность сухого препарата

оценивали на момент получения и в тесте на «ускоренное старение» [177] через месяц хранения лиофилизата при 37 °С.

Таблица 9.3 – 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, % (норма ЕФ – не более 3 %)		Время растворения, мин (норма ЕФ – не более 10 мин)	
	на момент получе- ния	через 1 мес. хранения при 37°С	на момент получе- ния	через 1 мес. хранения при 37°С	на момент получе- ния	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

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.

При изучении активности иммуноглобулина в сухой форме в сравнении с жидким контрольным образцом в ДИА зарегистрированы титры защитных антител на уровне 1:5120 (Рисунок 9.6).

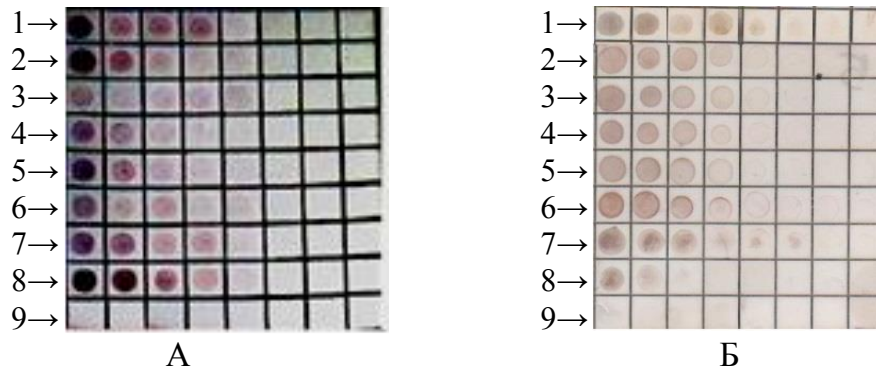


Рисунок 9.6 – Определение активности антирабического иммуноглобулина сухой и жидкой форм в дот-иммуноанализе

А – на момент получения; Б – через 1 мес. хранения при 37 °С. 1–7 ряд – двукратные разведения с 1:320 образцов лиофилизатов АИГ № 1–7, титр 1:5120; 8 ряд – двукратные разведения с 1:320 АИГ в жидкой форме, титр 1:5120 (А) и 1:2560 (Б); 9 ряд – отрицательный контроль (двукратные разведения НЛС).

Исследование в ДИА активности образцов иммуноглобулина в форме лиофилизата через 1 мес. хранения при температуре 37 °С не выявило снижения титров антител, они соответствовали значению 1:5120. Хранение образца АИГ в жидкой форме при повышенной температуре при испытании в тесте на «ускоренное состояние» повлияло на снижение значения титра защитных антител – в прямом ДИА был зарегистрирован титр 1:2560.

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 экспериментах по отработке оптимальных параметров лиофильного высушивания АИГ в качестве лиопротектора (стабилизатора) использовали глицин в концентрации $(2,25 \pm 0,25) \%$.

9.3 Оптимизация технологических параметров лиофильного высушивания гетерологичного антирабического иммуноглобулина и его F(ab')₂-фрагментов

Недостатком устаревшего лиофильного оборудования являются их хладоносители, содержащие хлор и фтор. В настоящей работе использована современная лиофильная установка Power Dry 9000, содержащая хладагент органического происхождения R404A, эксплуатационные характеристики которого явно превосходят таковые у применяемого на установке Frigera LZ 9 фреона R22. Преимуществом R404A является более интенсивная хладопроизводительность, которая выше по сравнению с R22 на 4–5 %, что способствует снижению на 8 % температуры нагнетания компрессора и энергосбережению до 2 %. Кроме того, хладагент R404A обладает нулевым потенциалом разрушения озонового слоя. Немаловажно и то, что хлор- и фторсодержащий фреон R22, применяемый на установке Frigera LZ 9, запрещен к использованию во многих странах мира из-за негативного воздействия на окружающую среду.

Дальнейшие эксперименты по лиофилизации антирабического иммуноглобулина проводили на установке Power Dry 9000, включающей конденсатор с рабочей температурой до минус 50 °С и производительностью 9 кг льда/сут; камеру-диффузатор из акрилата с пятью полками, термостатируемыми в интервале температур от минус 99 до 120 °С; пульт управления с электронным дисплеем, на котором отображаются параметры технологического процесса (Рисунок 9.7).

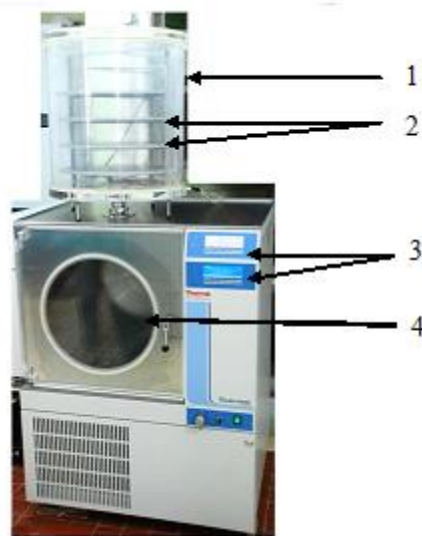


Рисунок 9.7 – Сублимационная установка Power Dry 9000

1 – камера-диффузатор; 2 – термостатируемые полки; 3 – пульт управления; 4 – конденсатор.

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 [32].

Лиофилизация АИГ – процесс многостадийный, далее остановимся на биотехнологических особенностях каждого из них.

Первая стадия лиофилизации – замораживание, во многом определяющая ход протекания технологического процесса и качество получаемого препарата. Как отмечалось выше, при охлаждении жидких объектов до конечной температуры ниже, чем температура полного затвердевания, увеличивается продолжительность лиофилизации, соответственно, увеличиваются энергозатраты. При замораживании препарата до конечной температуры выше, чем температура полного затвердевания, на последующем этапе сублимации может произойти вспенивание жидкой фракции, что отражается на структуре и внешнем виде таблетки и неизбежно ведет к потере качества продукта. В связи с этим важно было установить оптимальную температуру полного отвердевания АИГ. Как упоминалось выше, температура замораживания определяется $T_{эвт}$ и для раствора иммуноглобулина со стабилизатором глицином она равна минус 36 °С. Опыт биотехнологов свидетельствует, что жидкий продукт необходимо промораживать до температуры, ниже температуры эвтектики на несколько градусов, это объясняется переохлаждением промежуточных эвтектических смесей при замораживании [61, 115]. Исходя из вышеизложенного, при отработке технологии лиофильного высушивания АИГ замораживание препарата проводили до минус 38 °С с использованием морозильного оборудования MDF-V5386S. Заметим, что 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 9.8).

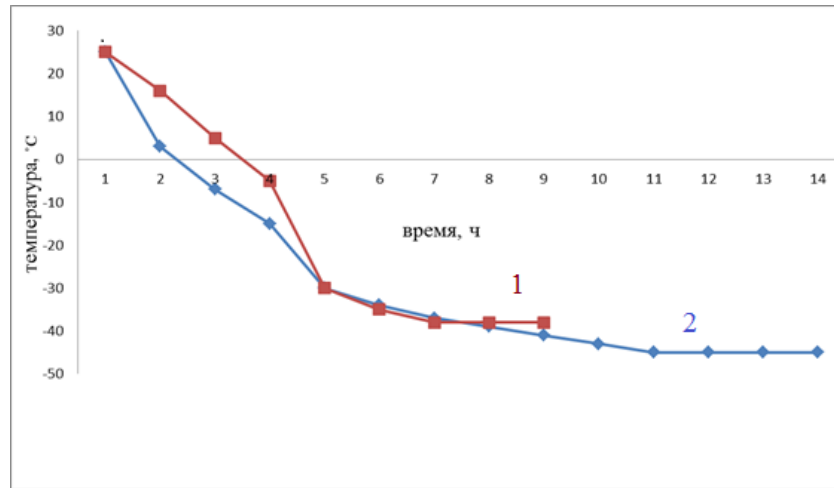


Рисунок 9.8 – Влияние температуры замораживания на длительность этапа замораживания

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

После достижения продуктом заданной температуры охлаждения препарат выдерживали не более 2–3 ч, не допуская его длительного хранения при низких температурах, поскольку длительное хранение может вызвать снижение растворимости и ухудшение качества лиофилизата [92].

Вторым этапом лиофильного высушивания является сублимация, в процессе которой осуществляли подбор оптимальной температуры нагрева продукта. Процесс 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 ее деградации и, соответственно, ухудшению свойств иммуноглобулина. С целью отработки оптимального режима подвода тепла к препарату лиофильное высушивание замороженного иммуноглобулина осуществляли при различных значениях $T_{пл}$, соответствующих (40 ± 1) , (35 ± 1) и (30 ± 1) °С, величина вакуума составляла от 7 до 10 Па. Параметры высушивания (T_m , $T_{пл}$, разрежение в камере, температуру конденсатора) контролировали ежечасно. Графики сублимации представлены на Рисунке 9.9.

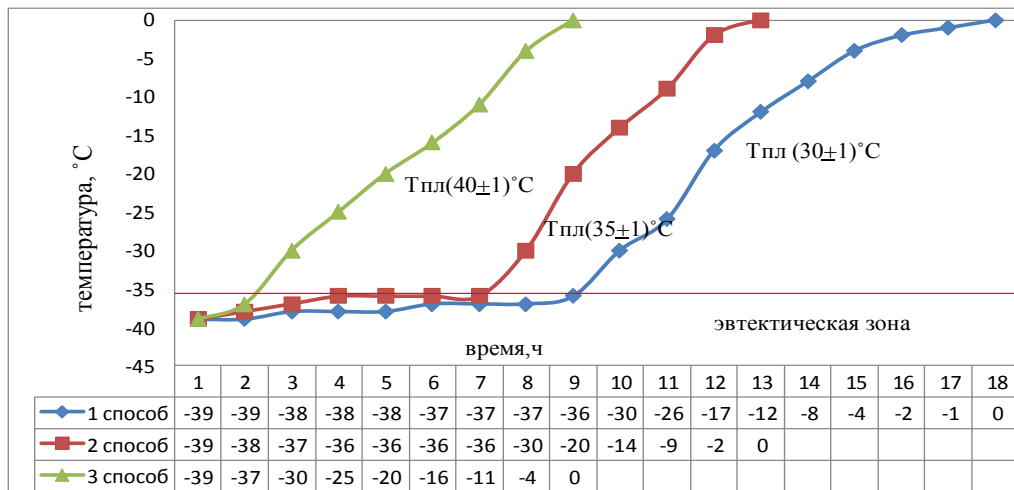


Рисунок 9.9 – Температура антирабического иммуноглобулина при сублимации в зависимости от режима подвода тепла

Эксперимент показал, что при интенсивном подводе тепла, когда $T_{пл}$ составляла $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$, T_m во время сублимации превышала эвтектическую, при значениях $T_{пл}$ $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ процесс сублимации происходил в температурной зоне, близкой или несколько ниже значения эвтектической температуры. Длительность этапа сублимации составила (9 ± 1) ч при $T_{пл}$, равной $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$; (13 ± 1) ч при $T_{пл}$ $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ и (18 ± 1) ч при $T_{пл}$ $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$. Таблетка иммуноглобулина, сублимированного при указанных значениях $T_{пл}$, представляла собой аморфную массу белого цвета, равномерно прилегающую к внутренней поверхности флакона. Таким образом, внешний вид таблетки лиофилизата был удовлетворительным при всех трех способах сублимации (Рисунок 9.10).



Рисунок 9.10 – Антирабический иммуноглобулин, сублимированный при различных режимах подвода тепла

1 – $T_{пл}$ $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$; 2 – $T_{пл}$ $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$; 3 – $T_{пл}$ $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Однако при определении содержания белка в образцах после растворения были выявлены определенные различия (Таблица 9.4). В лиофилизате, сублимированном по способу 3 ($T_{пл} (40 \pm 1) ^\circ\text{C}$), отмечено снижение содержания белка на уровне $(10,5 \pm 0,8) \%$. Значительные потери белка 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 $(9,4 \pm 0,1)$ и $(9,3 \pm 0,2) \%$ (Таблица 9.4).

Таблица 9.4 – Характеристика показателей содержания белка и времени растворения лиофилизатов АИГ, сублимированных при различных способах ($n=3$)

Показатель лиофилизатов	Значение $T_{пл}, ^\circ\text{C}$		
	(30±1)	(35±1)	(40±1)
Содержание белка, %	(9,4±0,1)	(9,3±0,2)	(8,5±0,1)
Потери белка, %	(0,7±0,03)	(0,8±0,01)	(10,5±0,8)
Время растворения на момент получения лиофилизата, мин	(2,2±0,1)	(2,4±0,2)	(2,8±0,1)
Время растворения через 3 мес. хранения, мин	(2,1±0,2)	(2,4±0,3)	(3,6±0,4)

Показатели времени растворения лиофилизатов не превышали 3 мин на момент получения; после хранения в течение 3 мес. время растворения иммуноглобулина, сублимированного при $T_{пл} (40 \pm 1) ^\circ\text{C}$, увеличилось до $(3,6 \pm 0,4)$ мин, растворимость других образцов не претерпела изменений.

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 $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ являются приемлемыми, обеспечивая удаление влаги из продукта в зоне $T_{эвт}$, что минимизирует риск деградации 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 $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 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 $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

После удаления из высушиваемого объекта последних кристаллов льда температура продукта возрастает довольно быстро, после чего происходит вторичное обезвоживание (десорбция), являющееся заключительным этапом лиофилизации. При десорбции из препарата удаляется связанная влага. В практической биотехнологии этапом десорбции считается период повышения температуры материала от 0 °С до заданной конечной температуры объекта. При десорбции критическими показателями, определяющими качественные характеристики целевого продукта, являются конечная T_m и длительность периода досушивания. При проведении заключительного этапа лиофилизации важно поддерживать температуру лиофилизируемого продукта, не превышающую максимально допустимую. От условий проведения десорбции зависит значение показателя ПМВ, который в значительной степени определяет растворимость препарата и его стабильность в процессе хранения. Оптимальное значение ПМВ для конкретного препарата и длительность этапа вторичного обезвоживания зависят от ряда факторов (используемое оборудование, природа объекта) и могут быть определены только экспериментальным путем. Значение ПМВ лиофилизированных лечебных иммуноглобулинов, согласно требованиям Европейской Фармакопеи, не должно превышать 3 %. Руководствуясь данным требованием, в ходе экспериментов были установлены следующие условия десорбции АИГ для достижения оптимального показателя ПМВ: конечная T_m – (25 ± 1) °С; $T_{пл}$ – (30 ± 1) °С; период досушивания при достижении максимальной температуры – не более 3 ч. Более длительный период досушивания обуславливает снижение ПМВ и, как доказано в опыте, у лиофилизатов АИГ с ПМВ менее 1 % ухудшаются показатели растворимости (Таблица 9.5).

Таблица 9.5 – Показатели растворимости лиофилизованного АИГ в зависимости от значения потери в массе при высушивании (ПМВ) (n=3)

Образец	Хранение, мес.	ПМВ, %	Время растворения, мин
лиофилизат АИГ, серия 098	на момент получения	$1,5 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$
	6	$1,6 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2$
	12	$1,5 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,1$
	18	$1,5 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,3$
лиофилизат АИГ, серия 097	на момент получения	$0,20 \pm 0,01$	$5,25 \pm 0,1$
	6	$0,25 \pm 0,02$	$5,5 \pm 0,3$
	12	$0,21 \pm 0,01$	$6,3 \pm 0,4$
	18	$0,22 \pm 0,01$	$7,7 \pm 0,1$

Таким образом, для лиофилизата АИГ оптимальный показатель ПМВ соответствует значению $(2\pm 1)\%$; значение ПМВ менее 1% ведет к ухудшению растворимости препарата.

При использовании оборудования Power Dry 9000 для лиофилизации АИГ длительность этапа десорбции при положительных температурах от 0 до $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ при $T_{пл}$ $(30\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ составила (10 ± 1) ч, аналогичный период с использованием устаревшей установки Frigera LZ 9 при тех же условиях соответствовал значению (23 ± 1) ч (Рисунок 9.11).

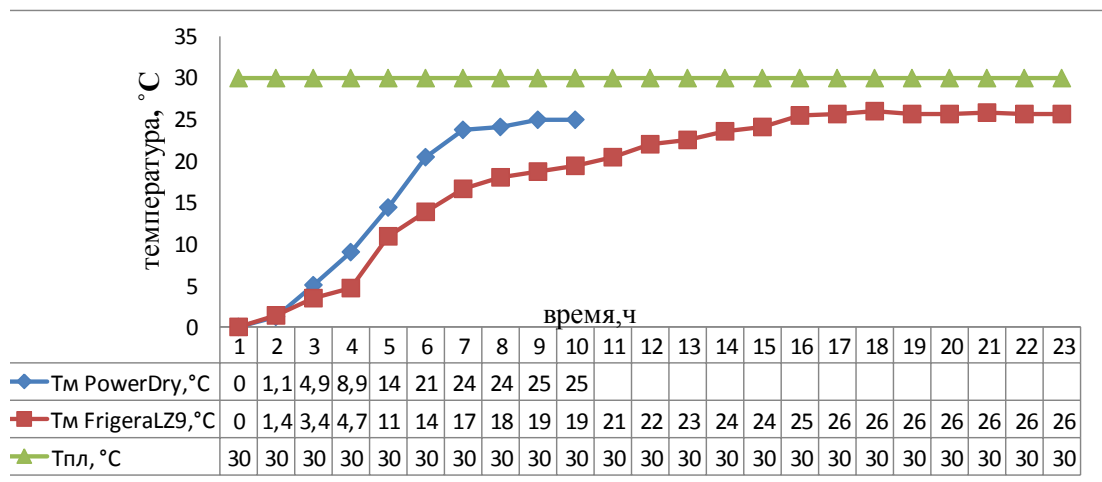


Рисунок 9.11 – Длительность периода десорбции АИГ в зависимости от применяемого сублимационного оборудования

Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение современного лиофильного оборудования Power Dry 9000 для сублимационного высушивания гетерологичного антирабического иммуноглобулина позволило оптимизировать процесс лиофилизации препарата. В ходе опытов отработаны оптимальные параметры лиофилизации АИГ на данной установке, которые представлены в Таблице 9.6.

Ранее в РосНИПЧИ «Микроб» была разработана технология получения $F(ab')_2$ -фрагментов АИГ, обладающих меньшей реактогенностью по сравнению с цельным препаратом [42, 165]. Экспериментальный препарат получен в форме раствора для инъекций, поэтому в данном исследовании практический интерес представляло получение экспериментальных серий $F(ab')_2$ -фрагментов в форме лиофилизата, что позволит увеличить срок годности и повысить стабильность препарата.

Таблица 9.6 – Основные параметры сублимационного высушивания АИГ во флаконах по 5 мл на оборудовании Power Dry 9000 (n=3)

Наименование технологического параметра, ед. изм.	Значение параметра
Температура замораживания, °С	минус (38±1)
Рабочий вакуум, Па	7±3
Продолжительность замораживания, ч	8±1
Скорость замораживания, °С/ч	7,6
Скорость повышения температуры при сублимации, °С/ч	1,56±0,59
Температура нагрева плиты сублиматора, °С	30±1
Продолжительность сублимации, ч	18±1
Конечная температура продукта при десорбции, °С	25±1
Продолжительность десорбции, ч	10±1

В работе была использована установка для лиофильного высушивания Power Dry. Экспериментальный препарат F(ab')₂-фрагментов АИГ высушивали в дозировке 1 мл во флаконах объемом 3 мл. В качестве лиопротектора использовали глицин в конечной концентрации (2,25±0,25) %. С учетом оптимальных параметров лиофилизации цельного АИГ, в ходе экспериментов была разработана схема лиофилизации F(ab')₂-фрагментов АИГ, основные параметры которой представлены в Таблице 9.7.

Таблица 9.7 – Основные параметры лиофилизации F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина на оборудовании Power Dry 9000 (n=3)

Наименование технологического параметра, ед. изм.	Значение параметра
Температура замораживания, °С	минус (38±1)
Рабочий вакуум, Па	7±3
Продолжительность замораживания, ч	6±1
Скорость замораживания, °С/ч	7,6
Скорость повышения температуры при сублимации, °С/ч	4,1±0,1
Температура нагрева плиты сублиматора, °С	30±1
Продолжительность сублимации, ч	12±1
Конечная температура продукта при десорбции, °С	25±1
Продолжительность десорбции, ч	6±1

Таблетка лиофилизированного препарата F(ab')₂-фрагментов характеризовалась белым цветом, была хорошо сформирована, имела однородную мелкопористую структуру.

Результаты изучения биологических и физико-химических свойств лиофилизатов, представленные ниже в данной главе, подтвердили эффективность предложенных биотехнологических приемов по сублимационному высушиванию расщепленного очищенного иммуноглобулина.

Практический интерес представляло проведение экспериментов по лиофилизации цельного АИГ в объеме 1 мл на современной лиофильной установке Epsilon 2-6 D «Christ», предусмотренной для лиофилизации препарата небольшими партиями. В производстве АИГ дозировка 1 мл используется для изготовления стандартных образцов предприятия (СОП), в частности, СОП специфической активности АИГ. Указанный СОП необходим при проведении внутрипроизводственного и выпускающего контроля качества препарата коммерческих серий.

Для лиофилизации образцов-кандидатов в СОП специфической активности была задействована установка Epsilon 2-6 D «Christ», включающая конденсатор с рабочей температурой до минус 85 °С и производительностью льда 6 кг/сут; камеру с полками, термостатируемыми в интервале температур от минус 45 до 60 °С; пульт управления с электронным дисплеем, на котором отображаются параметры лиофилизации (температура конденсатора, величина вакуума, $T_{пл}$, T_m); укупорочное устройство (Рисунок 9.12).

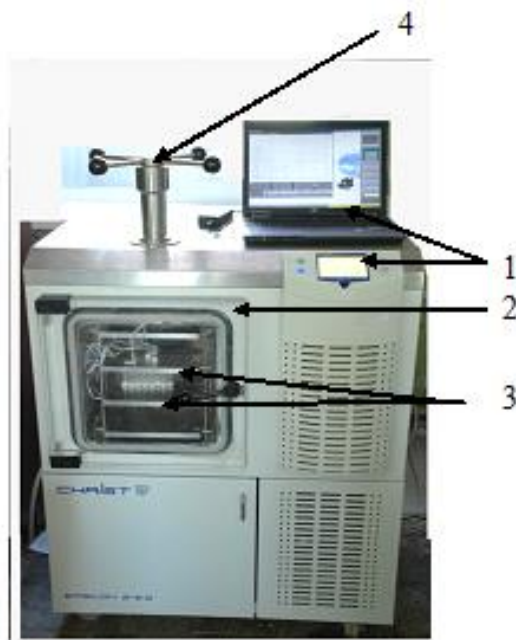


Рисунок 9.12 – Сублимационная установка Epsilon 2-6 D «Christ»

1 – пульт управления; 2 – камера для замораживания и сублимации; 3 – термостатируемые полки; 4 – укупорочное устройство.

К преимуществам установки Epsilon 2-6 D «Christ» относится то, что ее конструктивные особенности позволяют проводить этап замораживания препарата непосредственно в камере установки, что исключает необходимость в дополнительном морозильном оборудовании и минимизирует риск микробной контаминации продукта; предусмотрена функция автоматического укуповоривания флаконов резиновыми пробками непосредственно после высушивания препарата, что немаловажно при производстве стерильных препаратов.

Для изготовления СОП иммуноглобулин разливали в стеклянные флаконы объемом 3 мл в дозировке 1 мл. Этап замораживания проводили при атмосферном давлении с учетом определенной ранее $T_{эвт}$ раствора АИГ до минус $(38\pm 1)^\circ\text{C}$ непосредственно в камере сублиматора. Экспериментальным путем подбирали оптимальные параметры процедуры сушки, для чего процесс осуществляли при нескольких режимах (способах).

Первый способ заключался в проведении первичной лиофилизации при следующих условиях: температура продукта – от минус (38 ± 1) до $(25\pm 1)^\circ\text{C}$; скорость нагрева плиты сублиматора – $6,3^\circ\text{C}/\text{ч}$; $T_{пл}$ $(30\pm 1)^\circ\text{C}$; длительность этапа десорбции – (2 ± 1) ч. Данные условия не обеспечили хорошее качество таблетки после лиофилизации – имело место вспенивание, показатель ПМВ составил $(3,01\pm 0,01)\%$, время растворения – 30 мин.

Второй режим отличался от первого скоростью нагрева полки, равной $3^\circ\text{C}/\text{ч}$, длительность этапа десорбции составила (5 ± 1) ч при $T_{пл}$ $(30\pm 1)^\circ\text{C}$. Лيوфилизированный иммуноглобулин представлял собой хорошо сформированную таблетку белого цвета, значение ПМВ соответствовало $(0,08\pm 0,01)\%$, что обусловило увеличение периода растворения образца – 40 мин.

При 3 способе процесс проводили при аналогичных значениях скорости нагрева полки, конечных T_m и $T_{пл}$; период десорбции уменьшили до (3 ± 1) ч. Таблетка лиофилизата, полученного по способу 3, была хорошо сформирована, имела белый цвет, значение ПМВ составило $(1,09\pm 0,03)\%$, обеспечив хорошую растворимость препарата в течение $(1,0\pm 0,2)$ мин.

С учетом полученных результатов предложены следующие параметры лиофилизации АИГ в объеме 1 мл с использованием оборудования Epsilon 2-6 D «Christ», представленные в Таблице 9.8.

Таблица 9.8 – Основные параметры сублимационного высушивания антирабического иммуноглобулина во флаконах по 1 мл на установке Epsilon 2-6 D «Christ» (n=3)

Наименование технологического параметра, ед. изм.	Значение параметра
Температура замораживания, °С	минус (38±1)
Рабочий вакуум, Па	7±3
Продолжительность замораживания, ч	2±1
Скорость замораживания, °С/ч	6,5±0,1
Скорость повышения температуры при сублимации, °С/ч	3,0±0,5
Температура нагрева плиты сублиматора, °С	30±1
Продолжительность сублимации, ч	8±1
Конечная температура продукта при десорбции, °С	25±1
Продолжительность десорбции, ч	3±1

Специфическую активность полученного лиофилизата, являющуюся основным критерием качества АИГ, определяли в РН на белых мышах относительно II Международного стандарта иммуноглобулина против бешенства активностью 30 МЕ/мл. Результаты по определению специфической активности лиофилизированных образцов в тесте *in vivo* представлены в Таблице 9.9.

Таблица 9.9 – Результаты реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах при исследовании специфической активности лиофилизированного антирабического иммуноглобулина (1 мл)

Наименование образца	Разведение испытуемого образца	Абсолютные данные (кол-во мышей в каждой группе)		Кумулятивные данные		Летальность, %	Титр антител	Специфическая активность, МЕ/мл
		павшие	живые	павшие	живые			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
лиофилизат АИГ образец № 1	1:1000	1	5	1	14	7	1:3563	174
	1:2000	2	4	3	9	25		
	1:4000	3	3	6	5	55		
	1:8000	5	1	11	2	85		
	1:16000	5	1	16	1	94		

1	2	3	4	5	6	7	8	9
лиофилизат АИГ образец № 2	1:1000	0	6	0	14	0	1:3364	164
	1:2000	1	5	1	8	11		
	1:4000	4	2	5	3	63		
	1:8000	5	1	10	1	91		
	1:16000	6	0	16	0	100		
лиофилизат АИГ образец № 3	1:1000	1	5	1	9	10	1:2000	216
	1:2000	3	3	4	4	50		
	1:4000	5	1	9	1	90		
	1:8000	6	0	15	0	100		
	1:16000	6	0	21	0	100		
лиофилизат АИГ образец № 4	1:1000	3	3	3	7	30	1:1741	188
	1:2000	2	4	5	4	55		
	1:4000	5	0	10	0	100		
	1:8000	6	0	16	0	100		
	1:16000	6	0	22	0	100		
лиофилизат АИГ образец № 5	1:1000	2	4	2	11	15	1:3408	173
	1:2000	1	3	3	7	30		
	1:4000	2	3	5	4	56		
	1:8000	6	0	11	0	92		
	1:16000	5	1	16	1	94		
лиофилизат АИГ образец № 6	1:1000	1	5	1	14	7	1:3562	181
	1:2000	2	4	3	9	25		
	1:4000	3	3	6	5	55		
	1:8000	5	1	11	2	85		
	1:16000	5	1	16	1	94		
лиофилизат АИГ образец № 7	1:1000	0	6	0	15	0	1:4000	203
	1:2000	1	5	1	9	10		
	1:4000	3	3	4	4	50		
	1:8000	5	1	9	1	90		
	1:16000	6	0	15	0	100		
лиофилизат АИГ образец № 8	1:1000	1	5	1	14	6	1:3585	215
	1:2000	1	5	2	9	18		
	1:4000	3	3	5	4	56		
	1:8000	5	1	10	1	90		
	1:16000	6	0	16	0	100		
лиофилизат АИГ образец № 9	1:1000	2	4	2	13	13	1:3281	197
	1:2000	1	5	3	9	25		
	1:4000	3	2	6	4	60		
	1:8000	4	2	10	2	83		
	1:16000	5	0	15	0	100		

Как видно из таблицы, во всех опытах значение показателя специфической активности лиофилизированных образцов, откалиброванного против международного стандарта, превышало 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 объемах 5 и 1 мл и F(ab')₂-фрагментов в объеме 1 мл с использованием современного лиофильного оборудования Power Dry 9000 и Epsilon 2-6 D «Christ». Графики сублимационного высушивания иммуноглобулина и его F(ab')₂-фрагментов представлены на Рисунках 9.13, 9.14, 9.15.

9.4 Эффективность внедрения оптимизированной технологии лиофильного высушивания антирабического иммуноглобулина

Лиофилизация является энергетически емким процессом, поэтому для повышения экономичности промышленного производства является весьма важным использование современного менее энергоемкого оборудования в сочетании с сокращением продолжительности цикла лиофилизации. На это направлены и наши исследования по разработке экономичной и эффективной технологии лиофильного высушивания АИГ в различных дозировках, результаты которых представлены в данной главе.

Представлялось целесообразным рассчитать экономический эффект при использовании новых сублимационных установок при производстве АИГ в форме лиофилизата. При расчете ориентировались на выпуск иммуноглобулина объемом 400 л в год и учитывали количество потребляемой технологическим оборудованием электроэнергии при производстве препарата в указанном объеме. Исследования показали, что использование для лиофилизации АИГ современного оборудования Power Dry 9000 позволило интенсифицировать данный процесс по сравнению с сублимацией на устаревшей Frigera LZ-9 с 43 до 28 ч. С учетом полной загрузки Frigera LZ-9 за 1 цикл лиофилизации возможно высушивание 1,8 л иммуноглобулина во флаконах объемом 10 мл в дозировке 5 мл; при такой загрузке для лиофилизации 400 л препарата понадобится 222 цикла лиофилизации. Современная установка Power Dry позволяет однократно загрузить 8,540 л, следовательно, 400 л препарата можно высушить за 46 циклов. Согласно техническим характеристикам, номинальная потребляемая мощность оборудования Frigera LZ-9 составляет 6 кВт/ч, в то время как для Power Dry данная характеристика соответствует 1,2 кВт/ч. Продолжительность процесса лиофилизации АИГ на установке Frigera LZ-9 при полной

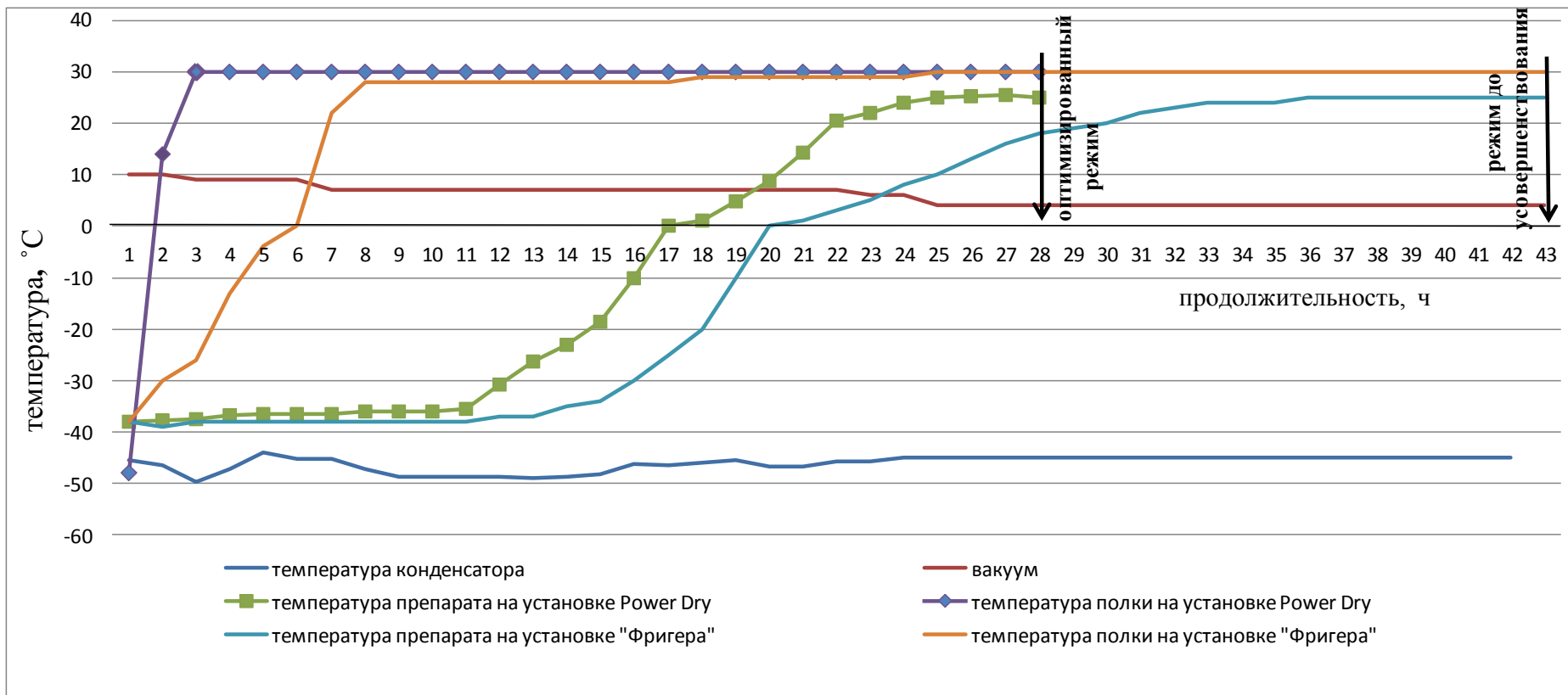


Рисунок 9.13 – Параметры лиофилизации гетерологичного АИГ (5 мл) на оборудовании Frigera LZ-9 и Power Dry 9000

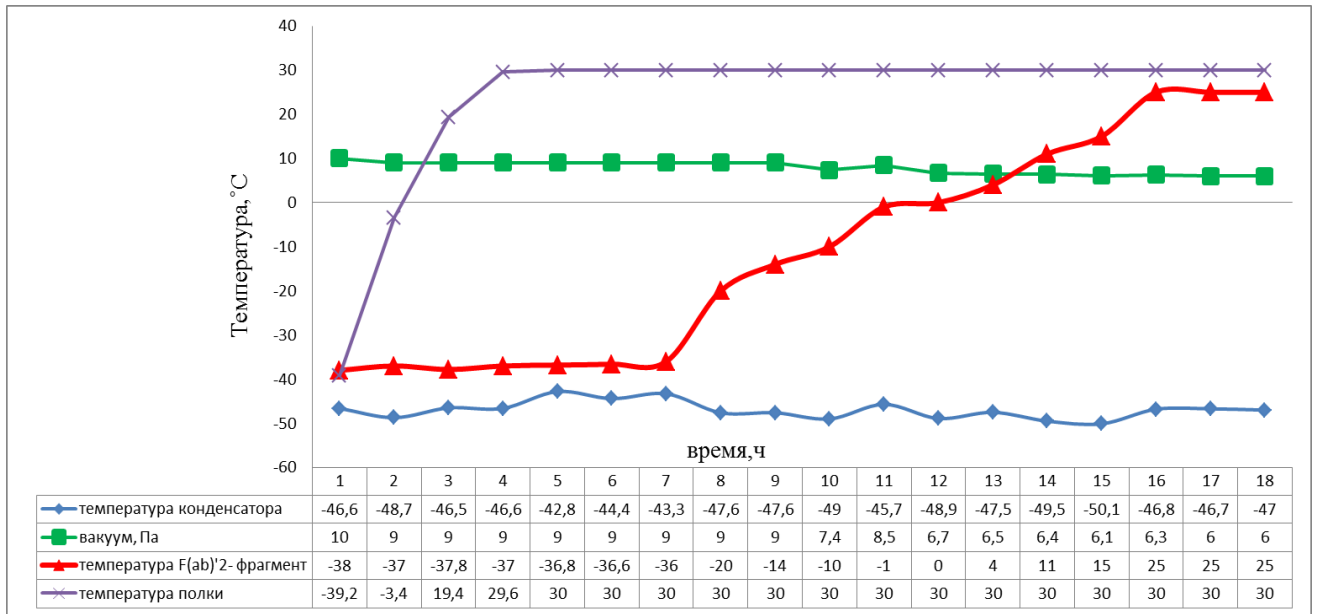


Рисунок 9.14 – Параметры лиофилизации препарата F(ab')₂-фрагментов гетерологического антирабического иммуноглобулина (1 мл) на оборудовании Power Dry 9000

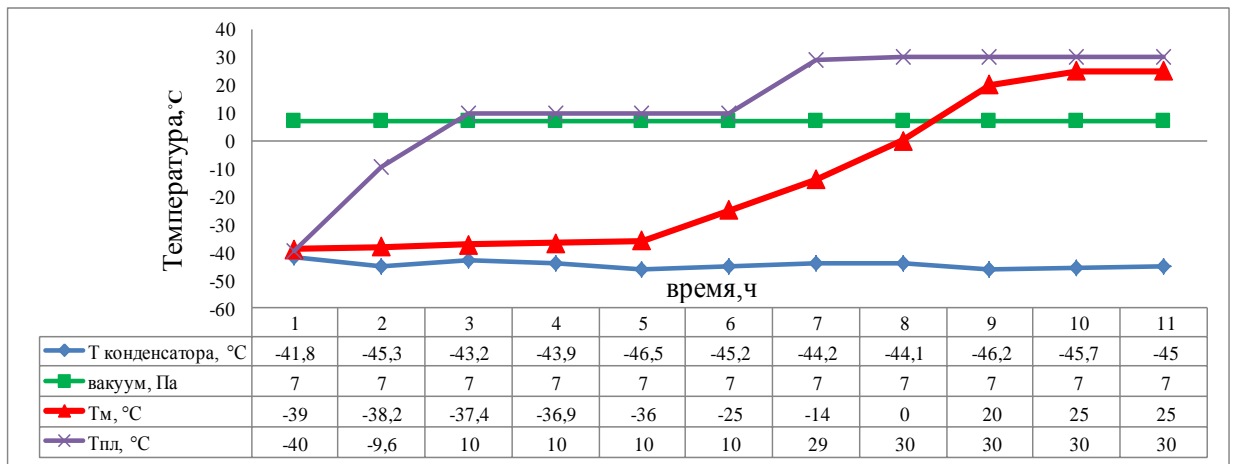


Рисунок 9.15 – Параметры лиофилизации гетерологического антирабического иммуноглобулина (1 мл) на оборудовании Epsilon 2-6 D «Christ»

загрузке составляет 43 ч, на Power Dry – 28 ч, как описано выше. Исходя из длительности процессов, количество потребляемой электроэнергии при высушивании 400 л АИГ на Frigera LZ-9 составит 57276 кВт (6 кВт х 43 ч х 222 цикла лиофилизации); лиофилизация 400 л препарата на Power Dry потребует использования 1545,6 кВт электроэнергии (1,2 кВт х 28 ч х 46 циклов). При средней стоимости 1 кВт/ч электроэнергии в 6,5 руб. затраты на эксплуатацию нового оборудования Power Dry составят 10046,4 руб.; на использование устаревшего оборудования Frigera LZ-9 в целом за год потребуются 372294,0 руб.

Таким образом, экономический эффект от внедрения оптимизированной технологии с использованием нового современного лиофильного оборудования Power Dry 9000 за счет экономии потребляемой электроэнергии составит 362247,6 руб. при выпуске 400 л иммуноглобулина за год.

9.5 Анализ показателей качества лиофилизатов антирабического иммуноглобулина и его F(ab')₂-фрагментов

Для оценки эффективности разработанной нами технологии лиофильного высушивания АИГ и его F(ab')₂-фрагментов в межлабораторных испытаниях была проведена экспериментальная оценка основных биологических и физико-химических показателей полученного лиофилизированного иммуноглобулина.

Образцы лиофилизатов экспериментально-производственных серий 0101, 0102, 0103 были оценены по следующим показателям: описание, время растворения, ПМВ, содержание белка, рН, специфическая активность *in vivo* и *in vitro*, электрофоретическая однородность, цветность, прозрачность, пирогенность, токсичность, риванол, молекулярные параметры, стерильность. Результаты изучения свойств лиофилизатов АИГ представлены в Таблице 9.10.

Леофилизаты представляли собой хорошо сформированную таблетку белого цвета с показателем ПМВ от 1,2 до 1,7 %. Разведенные в 5 мл растворителя (воды для инъекций) образцы представляли собой гомогенную, слабо опалесцирующую бесцветную жидкость без хлопьев и комков, время растворения образцов составило менее 3 мин.

Специфическая активность лиофилизатов иммуноглобулина, определенная в РН на мышах, составила 165, 170 и 171 МЕ/мл соответственно для образцов серий 0101, 0102, 0103 (требование ФСП – не менее 150 МЕ/мл).

Таблица 9.10 – 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	
1	2	3	4	5
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	При добавлении необходимого объема растворителя препарат полностью растворяется в течение 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
Специфическая активность <i>in vitro</i> в ДИА	1:5000–1:10000			–

1	2	3	4	5
Белок, %	9,2	9,3	9,2	От 9 до 11
pH	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 активности лиофилизированного АИГ в прямом ДИА с диагностикумом на основе наночастиц КЗ и ГП *virus fixe* «Москва 3253» защитные антитела выявлены на уровне 1:5000–1:10000 (Рисунок 9.16).

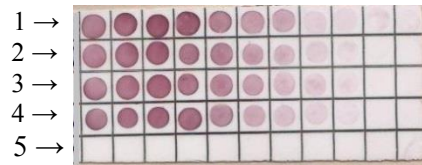


Рисунок 9.16 – Результаты ДИА при исследовании активности лиофилизированного гетерологического антирабического иммуноглобулина серий 0101, 0102, 0103

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)

При исследовании молекулярных параметров регидратированного АИГ экспериментально-производственных серий 0101, 0102, 0103 выявили отсутствие фракций фрагментов и агрегатов – на хроматограммах после завершения гель-хроматографии на колонке 25×2,6 см через ультрагель трисакрил GF 2000М был зарегистрирован единственный пик фракции мономеров (Рисунок 9.17).

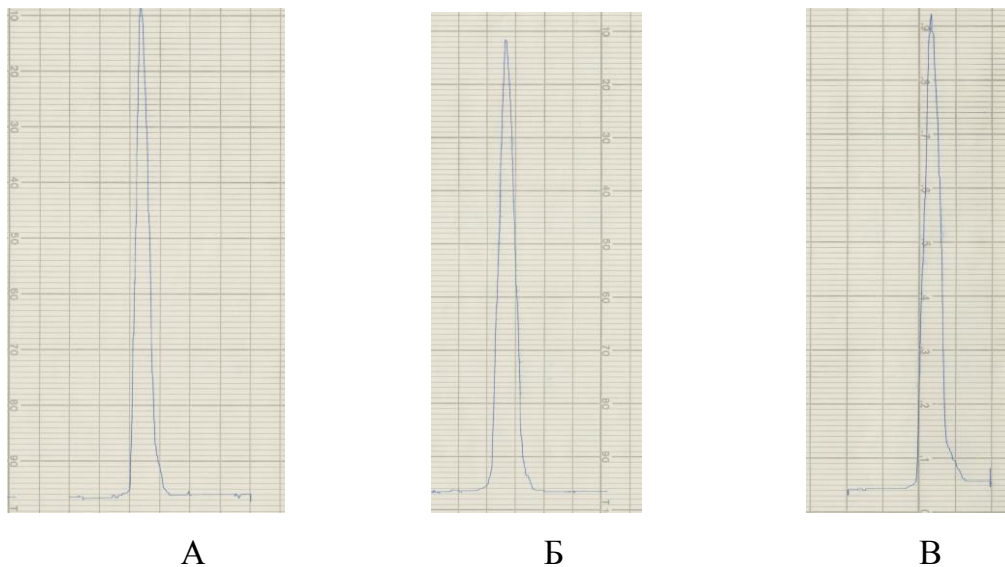


Рисунок 9.17 – Профили элюции регидратированных образцов АИГ, полученного в форме лиофилизата

А – серия 0101; Б – серия 0102; В – серия 0103.

Регидратированные образцы лиофилизированного АИГ успешно прошли испытания на пирогенность и токсичность. Содержание белка, прозрачность, цветность, рН, стерильность и остаточный риванол также соответствовали требованиям НД, предъявляемым к коммерческому гетерологичному иммуноглобулину.

Аналогичным образом были изучены экспериментальные образцы лиофилизированного препарата $F(ab')_2$ -фрагментов АИГ. Данные по изучению их основных физико-химических и биологических показателей представлены в Таблице 9.11. Выявлено, что значения качественных показателей лиофилизатов $F(ab')_2$ -фрагментов удовлетворяют требованиям, изложенным в НД на АИГ.

Уровень специфической активности образцов, определенный *in vivo*, соответствовал значениям 173, 186, 179 МЕ/мл соответственно для серий 01–03 при требовании ФСП не менее 150 МЕ/мл.

При исследовании активности лиофилизированных $F(ab')_2$ -фрагментов *in vitro* в ДИА выявлены защитные титры 1:5000–1:10000 (Рисунок 9.18).

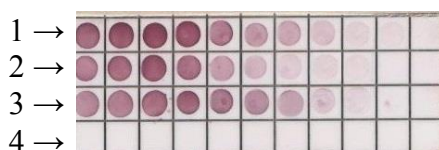


Рисунок 9.18 – Результаты иммуноанализа образцов лиофилизированных $F(ab')_2$ -фрагментов АИГ экспериментальных серий

1–3 ряды – двукратные разведения $F(ab')_2$ -фрагментов серий 01, 02, 03 с 1:80; титр 1:5000–1:10000; 4 ряд – отрицательный контроль (двукратные разведения с 1:20 НЛС).

Таким образом, комиссионное изучение основных биологических и физико-химических показателей лиофилизатов АИГ и его $F(ab')_2$ -фрагментов выявило соответствие свойств полученных лиофилизатов требованиям НД на АИГ из сыворотки крови лошади жидкий, а по показателям описание, растворимость, ПМВ, молекулярные параметры – требованиям Европейской фармакопеи на лиофилизированные лечебные иммуноглобулины. Результаты исследований засвидетельствованы в актах межлабораторных испытаний, утвержденных директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 10.06.2014 г.

Таблица 9.11 – Характеристика основных физико-химических и биологических показателей лиофилизированного препарата F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади

Показатели	Результаты испытаний лиофилизатов F(ab') ₂ -фрагментов экспериментально-производственных серий			Норма НД Р N 002639/01-250210, Европейской фармакопеи
	серия 01	серия 02	серия 03	
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, %	1,3	1,5	1,1	Не более 3
Время растворения, мин	1,0	2,2	1,5	При добавлении необходимого объема растворителя препарат полностью растворяется в течение 20 мин при температуре 20–25 °С
Цветность, ед. ОП	0,068	0,058	0,064	Не более 0,15
Прозрачность, ед. ОП	0,020	0,015	0,018	Не более 0,05
Специфическая активность <i>in vivo</i> в РН, МЕ/мл	173	186	179	Не менее 150 МЕ/мл
Специфическая активность <i>in vitro</i> в ДИА	1:5000–1:10000			–
Белок, %	9,1	9,0	9,0	От 9 до 11 %
рН	7,2	7,2	7,0	От 6,6 до 7,4
Стерильность	стерилен			Препарат должен быть стерильным
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

9.6 Изучение стабильности лиофилизированного антирабического иммуноглобулина при длительном хранении

Качественно лиофилизированный препарат характеризуется стабильностью своих биологических и физико-химических свойств при длительном хранении. Для изучения стабильности лиофилизата в процессе хранения антирабический иммуноглобулин, сублимированный с использованием оборудования Power Dry 9000, оценивали в долгосрочных испытаниях через 6, 12, 24 и 36 мес. хранения в условиях согласно СП [222]. Препарат растворяли в воде для инъекций (5 мл) и тестировали на соответствие выявленных показателей требованиям НД по следующим критериям: внешний вид, время растворения, ПМВ, прозрачность и цветность, специфическая активность *in vivo*, содержание белка. Данные представлены в Таблице 9.12.

Как видно из Таблицы 9.12, через 6, 12, 24, 36 мес. хранения выявленные значения биологических и физико-химических показателей лиофилизатов соответствовали требованиям НД на антирабический иммуноглобулин в форме раствора для инъекций.

Уровень специфической активности лиофилизатов экспериментально-производственных серий, хранившихся в течение 3 лет при условиях, соответствующих СП [222], при исследовании на белых мышах в реакции нейтрализации имел значение не менее 150 МЕ/мл и соответствовал по этому показателю спецификационным требованиям. Результаты испытаний позволили сделать вывод о стабильности АИГ, лиофилизированного по разработанной технологии.

Таким образом, 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 лиофилизированного препарата остаются на уровне, соответствующем требованиям НД.

Таблица 9.12 – Стабильность основных биологических и физико-химических показателей лиофилизатов АИГ экспериментально-производственных серий 0101, 0102, 0103 при длительном хранении (n=3)

Наименование показателя	Значения качественных показателей лиофилизатов антирабического иммуноглобулина при хранении, мес.												Требования ФСП на жидкий антирабический иммуноглобулин
	Серия 0101				Серия 0102				Серия 0103				
	6	12	24	36	6	12	24	36	6	12	24	36	
Потеря в массе при высушивании, %	1,4±0,2	1,3±0,2	1,4±0,1	1,2±0,1	1,5±0,1	1,6±0,1	1,4±0,2	1,4±0,1	1,5±0,2	1,6±0,3	1,4±0,3	1,5±0,1	–
Время растворения, мин	2,4±0,2	2,6±0,1	2,6±0,2	2,7±0,2	2,0±0,2	2,1±0,2	2,2±0,1	2,1±0,1	2,3±0,1	2,2±0,2	2,4±0,1	2,4±0,2	–
Специфическая активность, МЕ/мл	173	161	170	158	204	210	234	188	184	177	179	156	Не менее 150
Цветность, ед. ОП	0,046±0,002	0,048±0,001	0,046±0,002	0,045±0,001	0,034±0,003	0,036±0,003	0,034±0,001	0,036±0,002	0,041±0,001	0,040±0,001	0,038±0,003	0,042±0,002	Не более 0,15
Прозрачность, ед. ОП	0,024±0,001	0,022±0,002	0,025±0,001	0,026±0,001	0,031±0,002	0,032±0,002	0,030±0,001	0,032±0,001	0,034±0,003	0,035±0,002	0,029±0,001	0,031±0,003	Не более 0,05
pH	7,1±0,1	7,0±0,1	7,1±0,1	7,0±0,2	6,8±0,1	6,9±0,1	6,8±0,2	7,0±0,0	7,0±0,2	7,0±0,1	6,9±0,1	6,9±0,2	От 6,6 до 7,4
Содержание белка, %	9,4±0,3	9,4±0,2	9,3±0,1	9,3±0,3	9,4±0,2	9,4±0,2	9,3±0,2	9,4±0,1	9,3±0,2	9,2±0,1	9,2±0,2	9,1±0,1	от 9 до 11
Пирогенность	Апирогенны												Препарат должен быть апирогенным
Токсичность	Нетоксичны												Препарат должен быть нетоксичным
Стерильность	Стерильны												Препарат должен быть стерильным

Заключение по главе

Результатом исследований, представленных в данной главе, явилась разработка технологии лиофильного высушивания АИГ и его F(ab')₂-фрагментов, апробированной в экспериментально-производственных условиях. Экспериментально доказано, что предложенные температурно-временные параметры позволяют получить лиофилизированный АИГ, соответствующий спецификационным требованиям. С использованием современного лиофильного оборудования оптимизированы параметры сублимационного высушивания препарата в различной дозировке. Экспериментально обосновано применение глицина в качестве лиопротектора, установлена температура эвтектики и изучены тепловые свойства раствора иммуноглобулина.

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 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

10.1 Разработка стандартного образца предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади

В последние десятилетия в связи с повышением требований к качеству лекарственных препаратов, выпускаемых в Российской Федерации, актуальными являются вопросы по разработке стандартов качества иммунобиологических лекарственных средств [129]. Одним из важнейших показателей качества гетерологичного АИГ является специфическая активность, определяемая в РН вируса бешенства на белых мышах [128, 423]. Неотъемлемой частью контроля специфической активности препарата является использование стандартного образца специфической активности иммуноглобулина. Отсутствие в настоящее время отраслевого стандартного образца специфической активности (СОС) АИГ диктует обязательное наличие на предприятии-изготовителе Международного стандартного образца иммуноглобулина человеческого против бешенства либо СОП специфической активности, аттестованного против указанного Международного стандарта ВОЗ [245]. Стандартным образцом предприятия является стандартный образец, утвержденный руководителем предприятия в установленном порядке и применяемый в соответствии с нормативными документами предприятия [36].

Целью данного этапа исследований явилась разработка и метрологическая характеристика СОП специфической активности АИГ.

При изготовлении СОП специфической активности были учтены требования НД на АИГ из сыворотки крови лошади. Кандидат для изготовления стандартного образца предприятия представлял собой специфический иммуноглобулин, полученный в соответствии с ПР на производство АИГ из сыворотки крови лошади, биологические и физико-химические показатели которого отвечали требованиям ФСП на указанный препарат. Очищенный и стерильный раствор иммуноглобулина разливали по 1 мл в ампулы объемом 2 мл в случае получения СОП в жидкой форме либо по 1 мл во флаконы объемом 3 мл для последующей лиофилизации в случае изготовления СОП в форме лиофилизата. Особенности лиофилизации иммуноглобулина во флаконах в объеме 1 мл изложены выше в главе 9, п. 9.3. Условия хранения СОП соответствовали СП [222].

Аттестуемой метрологической характеристикой СОП являлась специфическая активность в Международных единицах (МЕ) в ампуле/флаконе. Специфическую активность СОП определяли в соответствии с НД Р N 002639/01-250210, разделом «специфическая активность», в реакции нейтрализации *virus fixe* CVS на белых мышах одновременно с определением активности международного образца специфической активности антирабического иммуноглобулина. В качестве образцов сравнения использовали Первый Международный стандартный образец антирабического иммуноглобулина (*1-st International Standart for rabies immunoglobulin*) с активностью 59 МЕ, Второй Международный стандартный образец иммуноглобулина человеческого против бешенства (*2-nd International Standart for anti-rabies immunoglobulin, human*) с активностью 30 МЕ. Титр иммуноглобулина рассчитывали по методу Reed и Muench [128].

Расчет среднего значения специфической активности при аттестации СОП проводили в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний», изложенной в ГФ СССР, XI изд. [175].

Всего в период с 2010 года по настоящее время было приготовлено и аттестовано 3 серии СОП специфической активности АИГ (Таблица 10.1).

Результаты аттестации образцов трех серий СОП специфической активности АИГ относительно Международных стандартов, представленные в Таблице 10.1, свидетельствуют о соответствии полученных характеристик требованиям НД на АИГ, согласно которой специфическая активность препарата для профилактики бешенства должна иметь значение не менее 150 МЕ/мл. Аттестованные значения соответствовали (177,33±13,89), (192,10±13,45), (198,67±16,62) МЕ/мл (Таблица 10.1).

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. Определение специфической активности СОП проводили по указанной выше методике на момент получения и через 2 года 1 месяц хранения. На момент получения СОП значение его специфической активности составляло (177,33±13,89) МЕ/мл, после хранения СОП в течение 2 лет и 1 месяца величина аттестуемого показателя СОП, по результатам трех последовательных тестов, составила 173, 185 и 175 МЕ/мл, что доказывает стабильность СОП по показателю «специфическая активность» в процессе хранения в течение срока годности (2 года) (Таблица 10.2).

Таблица 10.1 – Результаты аттестации СОП специфической активности АИГ биологическим методом в РН (n=28)

Серия СОП	Дата проведения экспериментов	Титр активности междунар. образца	Активность междунар. образца, МЕ/амп.	Титр активности СОП	Специфическая активность СОП, МЕ/мл	Аттестованное значение СОП, МЕ/мл ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$)
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	

Таблица 10.2 – Исследование стабильности СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического при хранении (n=3)

Серия СОП	Дата выпуска	Срок годности	Дата проведения экспериментов	Активность СОП, МЕ/мл	Титр СОП/ титр междунар. стандарта
32-01-11	02.2011	02.2013	28.10.10–22.12.10	177,33±13,89	См. табл.10.1
			01.03.13 –15.03.13	173	1:2884/1:500
				185	1:3078/1:500
				175	1:2924/1:500

Таким образом, в результате исследований разработан СОП специфической активности гетерологичного АИГ, аттестованный с применением Международных стандартных образцов иммуноглобулина человеческого против бешенства. СОП предназначен для оценки специфической активности АИГ при проведении выпускающего контроля качества препарата коммерческих серий. СОП утвержден ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора и 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.

10.2 Исследование молекулярных параметров антирабического иммуноглобулина и обоснование включения раздела «молекулярные параметры» в спецификацию фармакопейной статьи предприятия

Стабильность биологических и физико-химических свойств антивирусных иммуноглобулиновых препаратов при длительном хранении является одним из критериев качества ИЛП. К негативным процессам, ухудшающим качество иммуноглобулиновых препаратов в процессе хранения, относятся фрагментация и агрегация [8, 27, 178]. Процесс фрагментации может быть инициирован действием сывороточных протеиназ, в результате чего может наблюдаться снижение специфической активности лекарственного средства и его ускоренное выведение из организма пациента. При расщеплении белковых молекул выделяются крупные фрагменты, ведущие себя как моновалентные антигены, и иммунологически неактивные мелкие фрагменты в виде аминокислот и низкомолекулярных пептидов. Фрагменты и цельные молекулы могут агрегировать и образовывать высокомолекулярные слаборастворимые комплексы с антикомплементарной активностью. Причиной процесса агрегации может являться наличие остаточного этилового спирта, применяемого для осаждения специфического иммуноглобулина при фракционировании антирабической сыворотки [79]. Присутствие в иммуноглобулиновых препаратах лабильных липопротеидов и прооксидантов может спровоцировать свободнорадикальное перекисное окисление липидов и появление белковых агрегатов [27, 103]. Появление агрегатов в иммуноглобулиновых препаратах повышает риск проявления нежелательных анафилактикоидных реакций у пациента в ответ на введение лекарственного средства [12].

Следовательно, одним из критериев безопасности гетерологичного АИГ можно назвать отсутствие или минимальное содержание в нем фракций агрегатов и фрагментов. Согласно ФСП, контроль готового препарата АИГ предусматривает изучение 15 показателей, характеризующих его биологические и физико-химические свойства. На сегодняшний день в перечень контролируемых не входит показатель «молекулярные параметры», отражающий количественное содержание фракций мономеров, фрагментов и агрегатов. Данный тест проводится при контроле качества гомологичных иммуноглобулиновых препаратов для внутривенного и внутримышечного введения и является одним из показателей их безопасности. В соответствии с требованиями Европейской фармакопеи, в гомологичных иммуноглобулинах для внутримышечного применения суммарное количество фракций мономеров и димеров должно составлять не менее 85 %, фракций агрегатов и полимеров – не более 10 % [325].

Исследование молекулярных параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина представляет не только научный интерес, но имеет практическое значение, поскольку раздел «молекулярные параметры» планируется к включению в ФСП на АИГ. На целесообразность расширения перечня спецификационных показателей АИГ с целью совершенствования контроля качества готовых серий препарата, а также для гармонизации с требованиями ЕР указывают эксперты Научного центра экспертизы средств медицинского применения [136].

На сегодняшний день практически отсутствуют данные, касающиеся исследований молекулярных параметров гетерологичных иммуноглобулинов.

Целью следующего этапа исследований явилась оценка уровня содержания фракций мономеров, фрагментов и агрегатов в гетерологичном АИГ, произведенного в двух лекарственных формах: раствор для инъекций и лиофилизат. В экспериментах были изучены 12 образцов иммуноглобулина. Биологические и физико-химические показатели лиофилизатов на момент получения соответствовали требованиям ФСП на коммерческий препарат. Методом гель-хроматографии, применяемым в биотехнологии для изучения фракций иммуноглобулиновых препаратов [87], исследовали молекулярные параметры АИГ на момент получения, через 1 год 6 мес. и 3 года хранения, а также после испытаний в стресс-условиях [132].

Опыт продемонстрировал, что АИГ в жидкой форме на момент получения характеризуется 100 % содержанием мономеров – при хроматографическом молекулярном раз-

делении образцов АИГ на колонке 25×2,6 см через ультрагель трисакрил GF 2000М регистрировали один пик мономерной фракции (Рисунок 10.1).

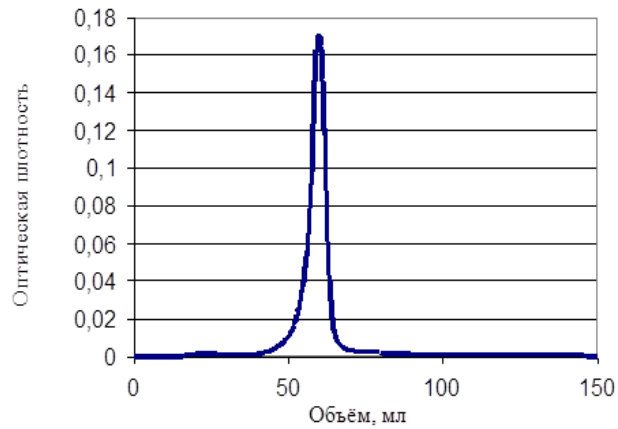


Рисунок 10.1 – Профиль элюции образца жидкого гетерологичного АИГ на момент выпуска

Хранение препарата в жидкой форме в течение 1,5 лет (срок годности) в соответствии с требованиями СП [222], не привело к изменению молекулярных параметров, о чем свидетельствовали результаты хроматографии – на хроматограмме после завершения гель-фльтрации зафиксирована 100 % фракция мономеров (Рисунок 10.2). Полученные результаты позволяют говорить о стабильности АИГ в течение срока годности (1 год 6 мес.).

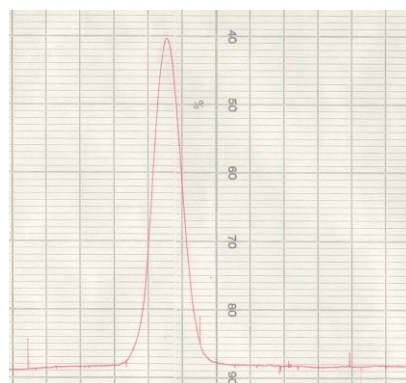


Рисунок 10.2 – Профиль элюции образца жидкого гетерологичного АИГ через 1,5 года хранения

При исследовании образца иммуноглобулина жидкой формы после хранения в течение 3 лет в условиях, соответствующих требованиям СП [222], на хроматограмме бы-

ли зафиксированы дополнительные пики, соответствующие фракции фрагментов, содержание которых в среднем составило $(3,15 \pm 0,16) \%$ (Рисунок 10.3).

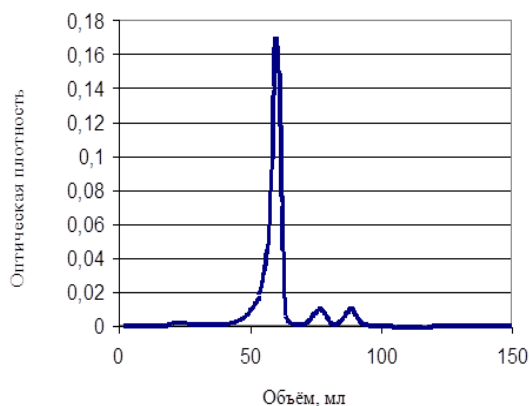


Рисунок 10.3 – Профиль элюции образца антирабического иммуноглобулина жидкой формы через 3 года хранения

При исследовании молекулярных параметров лиофилизированного АИГ, хранившегося в течение 3 лет в условиях согласно требованиям СП [222], на геле-хроматограмме регидратированных образцов регистрировали 100 % фракцию мономеров (Рисунок 10.4), что демонстрирует преимущество лиофилизатов иммуноглобулина по сравнению с препаратом в жидкой лекарственной форме при длительном хранении.

Анализируя результаты хроматографии, отметим, что после 3 лет хранения ни в одном из образцов иммуноглобулина жидкой и сухой форм не было выявлено агрегации, несмотря на период хранения препарата в виде раствора для инъекций, вдвое превышающий срок годности. Данный факт свидетельствует о качественной очистке полупродукта от остаточного этанола, применяемой при производстве препарата.

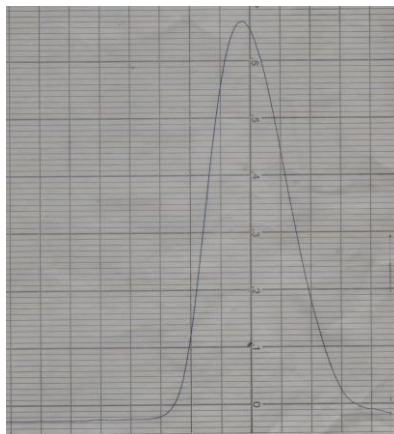


Рисунок 10.4 – Профиль элюции лиофилизата АИГ через 3 года хранения

Дополнительный пик, соответствующий фракции агрегатов (Рисунок 10.5), был зафиксирован при изучении образцов жидкого АИГ, прошедшего испытание в стресс-условиях (1 ч при температуре 56 °С). Указанный тест используется при изучении стабильности ИЛП [132, 407]. Испытание жидкого иммуноглобулина в стресс-условиях, как показали результаты гель-фильтрации, привели к образованию агрегатов в количестве $(15,4 \pm 0,09) \%$.

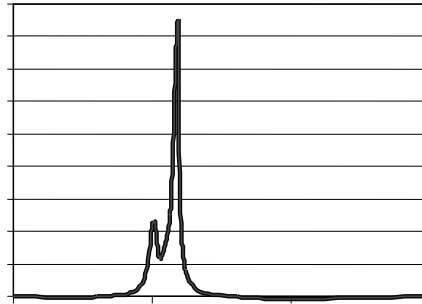


Рисунок 10.5 – Профиль элюции образца жидкого АИГ после испытаний в стресс-условиях

Для сравнительного изучения стабильности препарата в аналогичные стресс-условия был помещен иммуноглобулин в форме лиофилизата. Результаты гель-фильтрации продемонстрировали стабильность лиофилизатов – на хроматограмме был зарегистрирован один пик мономерной фракции (Рисунок 10.6).



Рисунок 10.6 – Профиль элюции лиофилизата АИГ, испытанного в стресс-условиях

Анализируя результаты экспериментов, можно заключить, что АИГ в форме лиофилизата обладает преимуществом по сравнению с препаратом в форме раствора для инъекций в отношении стабильности молекулярных параметров при длительном хранении и при неблагоприятных температурных воздействиях.

Заключение по главе

В главе приведены результаты исследований по разработке стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности гетерологичного АИГ, предназначенного для контроля специфической активности АИГ коммерческих серий. Полученный СОП аттестован с применением Международных стандартных образцов специфической активности иммуноглобулина человека против бешенства. По результатам исследований внесены изменения № 4 в Фармакопейную статью предприятия Р N 002639/01–250210 от 09.02.2016 г.

На сегодняшний день в ФСП на АИГ отсутствует показатель «молекулярные параметры». С целью расширения перечня спецификационных показателей гетерологичного АИГ, что будет способствовать повышению качества препарата, проведены исследования молекулярных параметров АИГ на момент получения и после длительного хранения. Показано, что жидкий АИГ на момент выпуска и в течение срока годности (1 год 6 мес.) характеризуется 100 % содержанием мономеров; при хранении в течение 3 лет в жидком АИГ наблюдается частичная фрагментация белковых молекул на уровне $(3,15 \pm 0,16) \%$, агрегация не выявлена. Лиофилизированный АИГ сохраняет первоначальные молекулярные параметры как после 3 лет хранения, так и после испытаний в стресс-условиях, что позволило сделать вывод о преимуществе АИГ в форме лиофилизата для обеспечения стабильности молекулярных параметров при длительном хранении и при неблагоприятных температурных воздействиях.

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

Гетерологичный антирабический иммуноглобулин – высоковостребованный в отечественном практическом здравоохранении иммунобиологический лекарственный препарат для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей, производство которого на территории Российской Федерации локализовано в РосНИПЧИ «Микроб». Потребность в препарате не имеет тенденции к снижению, что обусловлено неблагоприятной эпизоотической обстановкой по бешенству в Российской Федерации.

Актуальность проведенных в работе исследований подтверждается сообщениями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о напряженной обстановке в мире по бешенству и ежегодной регистрации случаев данного заболевания среди людей на территории Российской Федерации.

Число лиц, ежегодно обращающихся в лечебные учреждения России за антирабической помощью в связи с укусами животных, в последние десятилетия стабильно превышает 400 тыс. Несмотря на всю значимость антирабического иммуноглобулина для практического здравоохранения, следует отметить, что применение препарата при проведении антирабического лечения сопряжено с риском возникновения нежелательных реакций в количестве от 0,015 до 0,145 % от общего числа пациентов, получивших антирабическую помощь в виде комбинации вакцины и иммуноглобулина, по данным АИС-Росздравнадзор-Фармаконадзор. Учитывая, что производство иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб» развернуто в 2004 г. 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. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина, как и многих других иммунобиологических лекарственных препаратов, 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 (Рисунок 11.1).

Важнейшей научно-практической задачей, способствующей повышению качества АИГ, является переход к использованию культуральных технологий на этапе получения

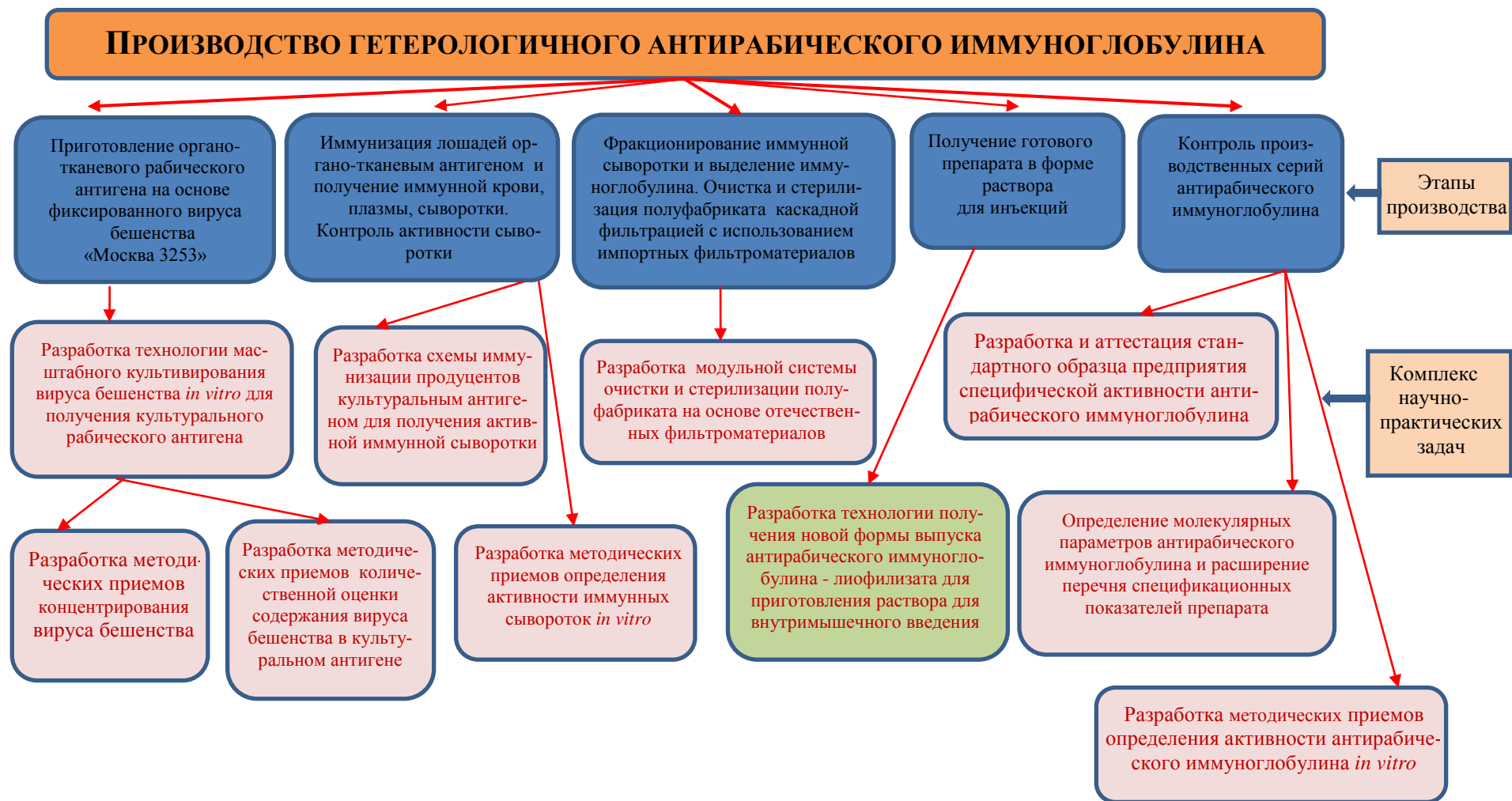


Рисунок 11.1 – Блок-схема комплексного подхода к решению проблемы оптимизации промышленного производства и совершенствования качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина

рабического антигена для иммунизации продуцентов. Работа в данном направлении согласуется с рекомендациями ВОЗ отказаться от использования органо-тканевого антигена в производстве антирабических препаратов для снижения количества нежелательных побочных реакций у пациентов, получающих антирабическое лечение. В мировой биотехнологической практике культуральный рабический антиген применяется для иммунизации продуцентов при получении гетерологичного антирабического иммуноглобулина в таких странах, как Турция, Индия, Таиланд.

Итак, для решения указанной задачи первоначально нами был обоснован тип субстрата, к которому впоследствии был адаптирован *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253». На основании анализа публикаций отечественных и зарубежных исследователей, а также методической и нормативной документации выбор был сделан в пользу перевиваемой линии клеток почки зеленой мартышки Vero. Использование перевиваемых клеток для репродукции вируса бешенства предпочтительнее по сравнению с первичнотрипсинизированными, что обусловлено стандартностью биологических свойств, высокой потенцией роста клеток, возможностью крупномасштабного культивирования в биореакторах. Перевиваемая линия клеток Vero аттестована в России для производства лекарственных иммунобиологических препаратов, немаловажным является отсутствие у данной линии онкогенных свойств, в связи с чем она не представляет опасности для человека. Поскольку *virus fixe* является облигатным нейротропным вирусом и практически не накапливается при его первичном внесении в культуру клеток экстраневрального происхождения, для его репродукции в указанных условиях была необходима предварительная адаптация. Адаптацию вируса бешенства «Москва 3253» к клеткам Vero проводили с применением как прямого пассирования вируса на клеточной культуре Vero, так и поочередного пассирования через мозг кролика и на клеточной культуре. К завершению адаптации (47 пассажей) вирус стабильно накапливался в клеточной культуре и проявлял цитопатическое действие, вызывая деструкцию (85±5) % клеточного монослоя. Наличие инфицированных вирусом клеток Vero подтверждали результаты люминесцентной микроскопии, при которой регистрировали фокусы флуоресценции – группы клеток, в которых имела место репродукция вируса бешенства. В результате исследований на начальном этапе экспериментально обоснованы условия культивирования вируса бешенства «Москва 3253» на клетках Vero стационарным спо-

собом: доза заражения – 0,1 ЛД₅₀/кл; время культивирования 96 ч при температуре (33±1) или (37±1) °С в атмосфере, содержащей 5 % СО₂; рН (7,2±0,2).

Поскольку культивирование вируса бешенства стационарным методом в моно-слойных клеточных культурах не позволяет получать вирусосодержащий материал в больших объемах, для увеличения выхода вирусного материала при получении культурального антигена возникла необходимость отработки более эффективных способов репродукции производственного вируса. В биотехнологической практике для крупномасштабного производства иммунобиологических лекарственных препаратов достаточно эффективно используют метод выращивания суспензионных клеточных культур, а также псевдосуспензионный способ культивирования клеток и вирусов на микроносителях, что определило тактику наших дальнейших исследований, заключающихся в отработке оптимальных параметров масштабного культивирования вируса бешенства «Москва 3253» указанными способами. Решение данной задачи было реализовано с применением биореактора BioG-M Plus объемом 5 дм³. В ходе выполнения исследований были отработаны оптимальные параметры культивирования клеток Vero и производственного вируса бешенства суспензионным и псевдосуспензионным методами и экспериментально доказана возможность применения указанных методов для масштабного выращивания вируса *in vitro* для приготовления рабического антигена. Как свидетельствовали результаты эксперимента, при заражающей дозе 0,1 ЛД₅₀/кл инфекционный титр вируса при культивировании в суспензии и на микроносителях составила более 4,0 lg ЛД₅₀/мл.

Научный и практический интерес представляло изучение возможности масштабного культивирования производственного вируса бешенства на клетках Vero роллерным способом, который находит широкое применение в промышленной биотехнологии. В ходе исследований был изучен оптимальный режим вращения роллерных бутылей, отработаны посевная концентрация клеток и доза их заражения вирусом. Помимо традиционного метода *in vivo*, для оценки уровня накопления вируса в культуральной жидкости был применен ИФА, который успешно применяется в биотехнологической практике для определения активности антирабических вакцин. Установлено, что роллерное культивирование штамма фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» в культуре клеток Vero целесообразно осуществлять при температуре 32 °С в течение 4–5 сут при начальной дозе заражения 0,1 ЛД₅₀/кл с использованием поддерживающей среды 199 с добавлением 0,1 % ЧСА либо 5 % сыворотки КРС, а полученная в результате культиви-

рования биомасса может быть использована в качестве основы для приготовления иммунизирующего материала.

При проведении сравнительного анализа способов масштабного культивирования клеток Vero и вируса бешенства установлено, что псевдосуспензионный способ культивирования дает максимальный выход клеточной биомассы в сравнении с анализируемыми методами при равных значениях посевной концентрации, что можно объяснить высокой общей площадью ростовой поверхности микроносителей. При культивировании клеток псевдосуспензионным и суспензионным способами при посевных концентрациях $(0,5 \pm 0,05) \times 10^5$ и $(1,0 \pm 0,05) \times 10^5$ кл/мл накопление клеточной биомассы до максимальных значений происходило быстрее, чем при роллерном культивировании. При анализе полученных данных нами было сделано заключение, что при культивировании клеток Vero любым из предложенных способов оптимальной посевной концентрацией клеток является $(0,5 \pm 0,05) \times 10^5$ кл/мл, увеличение начальной концентрации до $(1,0 \pm 0,05) \times 10^5$ кл/мл для всех исследуемых методов ведет к снижению индекса пролиферации, а при роллерном и суспензионном способах нами отмечено увеличение скорости отмирания клеток к концу наблюдаемого срока культивирования.

В экспериментах по исследованию эффективности рассматриваемых методов культивирования вируса бешенства уровни накопления вируса в культуральной жидкости к концу срока культивирования при псевдосуспензионном и роллерном способах существенно не различались. Суспензионный способ культивирования несколько уступал псевдосуспензионному и роллерному способам в отношении накопления вируса бешенства, что, предположительно, может являться следствием снижения жизнеспособности клеток, находящихся в суспензии. Следует отметить, что замена ЧСА на компонент с более низкой стоимостью – сыворотку КРС не оказывает заметного влияния на титр вируса в культуральной жидкости в условиях псевдосуспензионного и роллерного культивирования.

При равнозначном выходе целевой биомассы использование роллерного способа представляется менее затратным по сравнению с псевдосуспензионным способом, поскольку отсутствует необходимость использования микроносителей, стоимость которых достаточно высока. Кроме того, работа с роллерной установкой не требует круглосуточного наблюдения за процессом культивирования вируса, что предусмотрено при использовании биореактора в силу требований биологической безопасности при работе с ПБА.

Тем не менее, освоенный нами псевдосуспензионный метод культивирования вируса бешенства на культуре клеток Vero также может быть применим при масштабном получении культурального рабического антигена. Следовательно, полученные результаты позволили нам оценить роллерный способ культивирования вируса бешенства штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero как наиболее практически реализуемый в сравнении с суспензионным и псевдосуспензионным способами культивирования в биореакторе при производстве препарата АИГ с применением культуральных технологий.

Резюмируя выше представленный материал, можно с уверенностью констатировать, что разработана оригинальная методика получения масштабных количеств рабического антигена, способная в ближайшем будущем составить достойную альтернативу традиционным технологиям получения вирусосодержащих антигенных препаратов. Разработанный нами подход может быть применен в промышленном производстве других противовирусных препаратов на этапах получения и накопления промышленных количеств вирусного материала.

Для повышения иммуногенности вируса бешенства, репродуцированного *in vitro*, нами были отработаны приемы концентрирования вирусного урожая с использованием метода тангенциальной ультрафильтрации. Выбор метода обусловлен его экономичностью, производительностью, о чем свидетельствовали как научные публикации, так и опыт коллег-биотехнологов нашего института. В результате опытов показано, что концентрирование инактивированной суспензии культурального вируса бешенства целесообразно осуществлять с использованием мембран с номинальной отсечкой по молекулярной массе, не превышающей 300 кДа, при величине давления $(0,25 \pm 0,01)$ МПа. Концентрирование вирусной суспензии тангенциальной ультрафильтрацией позволило увеличить концентрацию в ней вируса бешенства до уровня, сопоставимым с таковым в органо-тканевом антигене.

Таким образом, разработанная технология позволяет получать вирусосодержащий материал в необходимой для иммунизации животных концентрации вируса. Методика может быть легко адаптирована для получения антигенов при производстве других препаратов для профилактики как опасных, так и особо опасных вирусных инфекционных заболеваний животных и человека.

Работа с клеточными культурами подразумевает проведение периодического контроля культуры клеток Vero, ростовых сред и добавок, культуральной жидкости на наличие микоплазменной контаминации. Мы сочли целесообразным применение для этих целей метода ПЦР с использованием коммерческого набора. Проведенный контроль, результаты которого представлены в работе, выявил наличие контаминированных микоплазмами клеток, что продиктовало необходимость разработки системы мероприятий по предупреждению микоплазменной контаминации клеточной культуры. Эффективность разработанной системы подтверждена в нашей дальнейшей работе с культурой клеток Vero.

Подводя итоги данного этапа работы можно утверждать, что разработан универсальный алгоритм проведения контроля на наличие микоплазменной контаминации. Данный алгоритм может быть без особых затрат внедрен в промышленное производство противовирусных препаратов, а также применен исследователями, занимающихся получением антигенов вирусов с использованием культуральных технологий.

Далее для количественного определения фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» в материале для иммунизации продуцентов, а также в культуральной жидкости на этапах культивирования вируса были разработаны методические подходы с использованием ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. Работа в этом направлении включала в себя следующие этапы: подбор ДНК-мишени, специфичных олигонуклеотидных праймеров и зонда формата TaqMan; получение рекомбинантного штамма *E. coli* TG1 со встроенным фрагментом G-L области генома вируса бешенства «Москва 3253» и набора ПЦР-стандартов для количественного определения вируса бешенства «Москва 3253»; апробацию разработанной количественной ПЦР на антигенном материале органо-тканевого и культурального происхождения. В результате исследований для разработки ПЦР-стандартов был сконструирован рекомбинантный штамм *E. coli* TG1/pRVMoscow3253G-L, содержащий в геноме фрагмент G-L области вируса бешенства штамма «Москва 3253». Указанный штамм депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» под номером КМ 229. Разработанные ПЦР-стандарты были использованы для количественной оценки содержания вируса бешенства «Москва 3253» в образцах рабического антигена органо-тканевого и культурального происхождения. Установлено, что концентрация вируса в мозговой суспензии кроликов составила $n \times 10^8$ ГЭ/мл; в образцах культуральной жидко-

сти до концентрирования – от $n \times 10^4$ до $n \times 10^6$ ГЭ/мл, а после концентрирования фильтрацией «кросс-флоу» – от $n \times 10^7$ до $n \times 10^8$ ГЭ/мл.

Можно констатировать, что разработанная оригинальная тест-система на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов может служить примером внедрения новых технологий для контроля концентрации вирусов как в биологических тканях, так и в культуральном материале. Используя указанный подход, можно добиться стандартизации антигенного материала при экспериментальных исследованиях и производстве диагностических и профилактических иммунобиологических препаратов.

В работе изложены результаты исследований по совершенствованию методических подходов для определения активности антирабических сывороток и иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе с использованием очищенного гликопротеида вируса бешенства – основного иммуногена, индуцирующего образование у макроорганизма вируснейтрализующих антител. Данный подход предложен взамен традиционного метода *in vivo* – реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах, основанной на введении лабораторным животным тестируемого препарата вместе с вирусом бешенства. Преимущество ДИА заключается в возможности в короткие сроки получить адекватную оценку активности иммунных сывороток продуцентов, являющихся сырьем для выделения антирабического иммуноглобулина. При производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина ДИА особенно актуален при проведении исследования сывороток от большого количества животных, а поголовье продуцентов у нас составляет 100 голов, когда требуется принять решение о дальнейшей эксплуатации продуцентов. Исследования, изложенные в данной диссертационной работе, направлены на усовершенствование ранее разработанного диагностикума на основе наночастиц коллоидного золота и вируса бешенства. В качестве иммунореакта при конструировании диагностикума с наночастицами коллоидного золота мы предлагаем использование очищенного гликопротеида вируса бешенства, что способствует выявлению в ДИА антител к гликопротеиду, обладающих вируснейтрализующей направленностью, а именно такие антитела характеризуют специфическую активность производимого нами профилактического препарата. В ходе опытов был выделен гликопротеид с молекулярной массой около 65 кДа, антигенные свойства которого были подтверждены при иммунизации мышей и последующим получением иммунных сывороток. Выявлено, что очищенный гликопротеид индуцирует образование специфических антител в большей степени, чем цельный

вирус бешенства – в ИФА с использованием коммерческого антивидового пероксидазного конъюгата зафиксированы титры специфических антител 1:640–1:1280 и 1:80 соответственно. Результаты дот-иммуноанализа с применением сконструированного диагностикума продемонстрировали, что уровень активности иммунных сывороток соответствовал значениям 1:640–1:1280; активность препарата антирабического иммуноглобулина составила 1:5000–1:10000.

Для оценки активности антирабических препаратов *in vitro* в ДИА нами сконструирован конъюгат на основе белка А *S. aureus* и наночастиц коллоидного золота со средним размером 15–17 нм. Преимущество данного диагностикума заключается в универсальности, поскольку он заменяет антивидовые иммуноглобулины при постановке непрямого ДИА. Для выявления титра антител при постановке непрямого ДИА с диагностикумом на основе белка А в качестве антигена на твердой фазе сорбировали выделенный из вируса бешенства гликопротеид. Тестирование иммунных сывороток продуцентов с использованием диагностикума на основе белка А позволило выявить значения титров антител от 1:640 до 1:1280, иммуноглобулин характеризовался активностью от 1:5000 до 1:20000. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования разработанных диагностикумов в производстве антирабического иммуноглобулина для экспресс-анализа антирабических сывороток и иммуноглобулина.

Вышеизложенное служит доказательством того, что применение ДИА в промышленном производстве противовирусных препаратов экономически оправдано и позволяет в кратчайшие сроки получить информацию о иммунокомпетентности продуцента и решить вопрос о его дальнейшей эксплуатации.

Важнейшей задачей настоящего исследования, решение которой представлено в работе, являлось изучение возможности применения культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов иммунной сыворотки. Приведены результаты экспериментов по получению специфически активных сывороток от животных, иммунизированных культуральным рабическим антигеном, выделению из них специфического гамма-глобулина и изучению его физико-химических и биологических свойств. В результате экспериментов были получены активные антирабические сыворотки от кроликов и лошадей. Предложенная схема иммунизации с использованием адъювантов гидроксида алюминия и полиоксидония позволила получить иммунные сыворотки кроликов с титром специфических антител не ниже 1:500, что свидетельствовало о возможности их

использования в качестве сырья для получения специфического иммуноглобулина. В ходе испытаний были произведены 3 лабораторные серии экспериментального антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови кролика, специфическая активность которого в реакции нейтрализации составила 332, 347 и 345 МЕ/мл соответственно при требовании НД на антирабический иммуноглобулин не менее 150 МЕ/мл. Положительные результаты получения активного иммуноглобулина из сыворотки крови кроликов, иммунизированных культуральным антигеном, явились основанием для последующей иммунизации более крупных продуцентов – лошадей, традиционно используемых в производстве иммуноглобулина. Специфические сыворотки лошадей при исследовании в реакции нейтрализации на белых мышах характеризовались защитным титром 1:987; 1:1024 и 1:898 соответственно для образцов трех экспериментальных серий. В промышленных условиях из указанных сывороток риванол-спиртовым методом был выделен антирабический иммуноглобулин. Последующее изучение физико-химических и биологических свойств антирабического иммуноглобулина трех экспериментально-производственных серий, полученных с применением культуральных технологий, выявило их соответствие требованиям ФСП РН 002639/01-250210 на коммерческий препарат. Специфическая активность экспериментального гетерологичного иммуноглобулина соответствовала значениям 165, 151, 160 МЕ/мл соответственно для образцов трех экспериментально-производственных серий. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения рабического антигена культурального происхождения взамен органо-тканевого в производстве антирабического иммуноглобулина на этапе иммунизации продуцентов.

Для очистки и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина нами разработана модульная система с использованием фильтров отечественного производства как альтернатива схеме каскадной фильтрации с применением дорогостоящих импортных фильтроматериалов. В ходе экспериментов в сравнении с импортными аналогами были испытаны отечественные фильтры глубинного и мембранного типов производства «Владисарт» и «Технофильтр», в том числе модифицированные с положительным зарядом на поверхности. Показано, что схема проведения баромембранных процессов, состоящая из предварительной осветляющей фильтрации через патронные мембранные элементы ЭПМ.К-0,80/0,45 и модифицированные ЭПМ.К+-0,45/0,20 («Технофильтр»), очистки после диализа на глубинных угольных фильтрах ФПК диаметром

142 мм («Владисарт»), двукратной фильтрации через модифицированные мембранные сорбенты капсульного типа КФМ.К+-0,20/0,20 («Технофильтр»), совмещающей депирогенизацию и стерилизацию препарата, позволяет получить качественный препарат, соответствующий требованиям нормативной документации. Разработанная схема внедрена в серийное производство препарата; с применением разработанного фильтрационно-го каскада произведено 6 производственных серий препарата, прошедших необходимые контрольные испытания и показавшие соответствие требованиям нормативной документации. На препарат указанных серий получены сертификаты соответствия, разрешающие выпуск препарата в гражданский оборот. Экономический эффект от внедрения предложенных технологических решений по осветлению, депирогенизации и стерилизации антирабического иммуноглобулина с применением отечественных фильтрационных материалов составляет 216508,25 руб. при выпуске препарата объемом 400 л в год. Результаты проведенных исследований вошли в новую редакцию промышленного регламента ПР № 01898109-47-15 на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций.

Сконструированная технологическая линия каскадной фильтрации, базирующаяся на фильтрующих материалах отечественного производства, абсолютно универсальна и может с успехом быть использована при производстве других иммуноглобулиновых, и не только, препаратов с целью гарантированного получения высококачественных лекарственных средств.

Далее на модели коммерческого антирабического иммуноглобулина и его F(ab')₂-фрагментов была разработана экспериментально-производственная технологии новой формы выпуска противовирусных иммуноглобулиновых лекарственных препаратов – лиофилизата для приготовления раствора для внутримышечного введения. Получение лиофилизированных препаратов немаловажно с точки зрения повышения стабильности лекарственных средств при транспортировании и хранении, кроме того, лиофилизаты характеризуются более длительным сроком годности по сравнению с жидкими препаратами. Отметим, что в Российской Федерации на биотехнологических предприятиях, в частности, «Иммунопрепарат» (г. Уфа) выпускают лечебные иммуноглобулиновые препараты в форме лиофилизата, например, «Иммуновенин» – иммуноглобулин человека нормальный.

На данном этапе работы были отработаны оптимальные режимы лиофильного высушивания антирабического иммуноглобулина и его F(ab')₂-фрагментов, обеспечивающих максимальное сохранение качественных показателей. За базовый вариант технологии высушивания иммуноглобулина взяли технологию, традиционно применяющуюся в институте для высушивания диагностических иммуноглобулинов на установке Frigeta LZ9. Данное оборудование морально и технологически устарело, и в рамках настоящего исследования были проведены исследования по отработке режимов сублимационного высушивания антирабического иммуноглобулина на новых сублиматорах. Для проведения качественной лиофилизации первоначально были исследованы тепловые параметры раствора антирабического иммуноглобулина и определена эвтектическая температура препарата с различными комбинациями стабилизаторов: глицина, мальтозы, сахарозы. Показано, что глицин в концентрации (2,25±0,25) % является оптимальным лиопротектором. В результате экспериментов оптимизированы температурно-временные параметры лиофилизации антирабического иммуноглобулина в дозировке 5 мл и F(ab')₂-фрагментов иммуноглобулина в дозировке 1 мл. Изучение биологических и физико-химических показателей лиофилизатов выявило их соответствие требованиям нормативной документации, что подтверждает эффективность предложенной технологии. Экономический эффект от внедрения оптимизированной технологии за счет экономии потребляемой электроэнергии составит 362247,6 руб. при выпуске 400 л препарат в год. В долгосрочных испытаниях показано, что гетерологичный антирабический иммуноглобулин в новой форме выпуска – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения сохраняет качественные показатели в течение 3 лет, что вдвое превышает срок годности препарата в жидкой лекарственной форме.

Таким образом, сконструирована оригинальная технологическая линия получения лиофилизированного иммуноглобулина, которая с успехом может быть использована в аналогичном производстве, поскольку фактически является универсальной за исключение небольших нюансов. Полученный сухой препарат антирабического иммуноглобулина является качественной альтернативой традиционному препарату и займет достойное место в арсенале врачей-рабиологов при постэкспозиционной профилактике против бешенства.

В работе рассмотрены вопросы оптимизации контроля качества антирабического иммуноглобулина, в частности, разработки стандартного образца предприятия (СОП)

специфической активности гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Надо отметить, что в последние десятилетия в связи с повышением требований к качеству лекарственных препаратов, выпускаемых в Российской Федерации, вопросы по разработке стандартов качества иммунобиологических лекарственных средств являются весьма актуальными. Отсутствие в настоящее время отраслевого стандартного образца специфической активности (СОС) АИГ диктует обязательное наличие на предприятии-изготовителе Международного стандартного образца иммуноглобулина человеческого против бешенства либо СОП специфической активности, аттестованного против указанного Международного стандарта ВОЗ. В ходе экспериментов, начиная с 2010 года, нами получены и аттестованы с применением Международных стандартных образцов специфической активности иммуноглобулина человека против бешенства три серии СОП специфической активности гетерологичного антирабического иммуноглобулина, предназначенного для контроля активности препарата при выпуске коммерческих серий. Активность СОП, оцененная в исследованиях на белых мышах, составила $(177,33 \pm 13,89)$, $(192,10 \pm 13,45)$, $(198,67 \pm 16,62)$ МЕ/мл соответственно для образцов трех серий. По результатам исследований внесены изменения № 4 в Фармакопейную статью предприятия Р N 002639/01-250210 от 09.02.2016 г., утвержденные Министерством здравоохранения Российской Федерации.

В направлении оптимизации методов контроля и расширения перечня спецификационных показателей антирабического иммуноглобулина проведены исследования молекулярных параметров препарата. Показано, что жидкий иммуноглобулин на момент выпуска и в течение срока годности (1 год 6 мес.) характеризуется 100 % содержанием мономеров; при хранении в течение 3 лет в жидком АИГ происходит частичная фрагментация белковых молекул до уровня $(3,15 \pm 0,16)$ % при отсутствии агрегатов. Лиофилизированный АИГ сохраняет первоначальные молекулярные параметры как после 3 лет хранения, так и после испытаний в стресс-условиях, что говорит о преимуществе лиофилизатов АИГ для обеспечения стабильности молекулярных параметров в процессе длительного хранения и при неблагоприятных температурных воздействиях. Результаты исследований явились основой для разработки проекта изменений в ФСП на антирабический иммуноглобулин с целью расширения перечня показателей качества готового препарата.

Таким образом, в ходе исследований решен комплекс научно-практических задач: разработана технология масштабного культивирования производственного штамма фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на клетках перевиваемой клеточной линии Vero для получения культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов взамен органо-тканевого антигена; отработаны условия концентрирования культурального вируса методом тангенциальной ультрафильтрации; получен активный специфический иммуноглобулин и отработаны условия проведения баромембранных процессов его очистки и стерилизации с применением отечественных фильтроматериалов; разработаны методические подходы *in vitro* к количественному определению вируса бешенства и антител к нему; разработана технология новой формы выпуска антирабического иммуноглобулина – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения; усовершенствованы этапы контроля коммерческих серий антирабического иммуноглобулина.

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 органотканевому 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 гибридизационно-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 A *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 про-

мышленное производство препарата. Показана экономическая целесообразность новых технологических решений.

7. Впервые разработана экспериментально-производственная технология новых форм выпуска антирабического иммуноглобулина и его $F(ab')_2$ -фрагментов – лиофилизатов для приготовления раствора для внутримышечного введения, апробированная в промышленных условиях. Исследованы качественные характеристики лиофилизатов антирабического иммуноглобулина и его $F(ab')_2$ -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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АИГ	антирабический иммуноглобулин
АИС	автоматизированная информационная система
БОЕ	бляшкообразующие единицы
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВНА	вируснейтрализующие антитела
ВПЧ	вирусоподобные частицы
ГАЕ	гемагглютинирующие единицы
ГКПБ	государственная коллекция патогенных бактерий
ГО	гидроокись алюминия
ГП	гликопротеид
ГРЛС	Государственный Реестр лекарственных средств
ГФ	Государственная Фармакопея
ГЭ/мл	геном-эквивалент в 1 мл
ДИА	дот-иммуноанализ
дНТФ	дезоксинуклеозидтрифосфат
ДСК	дифференциальная сканирующая калориметрия
ЕФ	Европейская фармакопея
ЖНВЛП	жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты
ИЛП	иммунобиологический лекарственный препарат
ИФА	иммуноферментный анализ
кДНК	ДНК, синтезированная из зрелой мРНК в реакции, катализируемой обратной транскриптазой
КЗ	коллоидное золото
КОКАВ	концентрированная культуральная антирабическая вакцина
КРС	крупный рогатый скот
КФМ.К+	капсульный фильтр на основе мембраны из модифицированного капрона
КФМ.ПС	капсульный фильтр на основе мембраны из полисульфона
КФМ.ПА	капсульный фильтр на основе мембраны из полиамида
КЭ	клещевой энцефалит
ЛД ₅₀ /мл	летальная доза для 50 % животных, взятых в опыт

ЛПС	липополисахарид
МЕ	международная единица
МИБП	медицинский иммунобиологический препарат
м.к.	микробные клетки
МКА	моноклональные антитела
мМоль	миллимоль
мРНК	матричная РНК
МУ, МУК	методические указания
МФА	метод флуоресцирующих антител
НД	нормативная документация
НИИ ВС	научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
НЛС	нормальная сыворотка лошади
НОММ	номинальная отсечка по молекулярной массе
НЦМ	нитроцеллюлозная мембрана
НЦ ЭСМП	научный центр экспертизы средств медицинского применения
ООЕ	оспообразующие единицы
ООИ	особо опасные инфекции
ОСО	отраслевой стандартный образец
ОТ ПЦР	обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция
ПААГ-ДНС	полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия
ПБА	патогенные биологические агенты
ПВДФ	поливинилдендифторид
ПМВ	потеря в массе при высушивании
пМоль	пикамоль
п.н.	пар нуклеотидов
ПО	полиоксидоний
ПР	промышленный регламент
ПС	почка сайги
ПСХ	почка сирийского хомячка
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
ПЭГ	полиэтиленгликоль
РГФ	учет результатов ПЦР с помощью гибридационно-флуоресцентного метода

РДП	реакция диффузной преципитации
РН	реакция нейтрализации
РНГА	реакция непрямой гемагглютинации
РСК	реакция связывания комплемента
СОП	стандартный образец предприятия
СП	санитарные правила
T_k	температура коллапса
T_m	температура материала
$T_{пл}$	температура плиты
$T_{эвт}$	эвтектическая температура
ТУ	технические условия
ФГБУ «ФЦТРБ ВНИВИ»	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»
ФИТЦ	флуоресцеин-5-изотиоцианат
ФО	федеральный округ
ФС	фармакопейная статья
ФСП	фармакопейная статья предприятия
ФЦП	федеральная целевая программа
ЦПД	цитопатическое действие
ЧСА	человеческий сывороточный альбумин
ЭП	электропроводность
ЭПМ.К	элемент патронный мембранный на основе капрона
ВНК	перевиваемая культура клеток почек сирийского хомячка
FDA	Food and Drug Administration управление по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (США)
GMP	Good Manufacturing Practice надлежащая производственная практика
HDCV	Human Diploid Cell Vaccine антирабическая вакцина, полученная на диплоидных клетках человека
Ig G	иммуноглобулины класса G

FAVN	Fluorescent Antibody Virus Neutralization флуоресцентный вируснейтрализующий тест
lg	логарифм при основании 10
lg ₂	логарифм при основании 2
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control Национальный институт биологических стандартов и контроля
PVRV	Purified Vero Rabies Vaccine очищенная антирабическая вакцина, полученная на культуре клеток Vero
RFFIT	Rapid Fluorescent Foci Inhibition Test тест ингибции фокусов флуоресценции
<i>virus fixe</i>	фиксированный вирус бешенства

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Ж.И. Иммуноадъювантный эффект цитокинов / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, С.Е. Акользина, Н.В. Медуницын // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2009. – № 3. – С. 19–22.
2. Акинъшина, Т.В. Разработка набора реагентов для оценки эффективности поствакцинального иммунитета к вирусу бешенства в серологических реакциях: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Акинъшина Татьяна Викторовна. – Щелково, 2005. – 133 с.
3. Акифьев, О.Н. Применение дифференциального термического анализа при создании инъекционных лекарственных форм препаратов / О.Н. Акифьев, Ю.Ш. Гольдберг, М.В. Шиманская // Применение лиофилизации в фармации: матер. семинара. – 1986. – С. 14–15.
4. Аксенова, Т.А. Очистка производственных серий антирабической вакцины с помощью ядерных фильтров / Т.А. Аксенова, И.В. Красильников, Б.В. Мchedlishvili // В кн.: Контроль вирусных и бактериальных препаратов. – М., 1984. – С. 16.
5. Аксенова, Т.А. Экспериментальная культуральная антирабическая вакцина, концентрированная полиэтиленгликолем / Т.А. Аксенова, Е.М. Михайловский, М.А. Селимов // Симпозиум по бешенству: матер. науч. сессии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов. – М., 1972. – С. 8–12.
6. Алсынбаев, М.М. Стабилизаторы и осмолярность препаратов внутривенных иммуноглобулинов. Необходимость оценки конечной лекарственной формы при назначении внутривенного иммуноглобулина / М.М. Алсынбаев, А.Г. Исрафилов, Е.В. Мостовская // Иммунология. – 2004. – № 3. – С. 177–182.
7. Аммур, Ю.И. Разработка методов количественного определения вакцинных штаммов вирусов кори, эпидемического паротита и краснухи на основе ПЦР с детекцией в режиме реального времени: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.02 / Аммур Юлия Игоревна. – М., 2012. – 24 с.
8. Анастасиев, В.В. Разработка производственной технологии получения иммуноглобулина для внутривенного введения нового поколения – имбиоглобулина / В.В. Анастасиев, Т.В. Короткова, Т.А. Крайнова, Л.М. Ефремова // Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний: матер.

науч. конф., посв. 75-летию Нижегородского НИИЭМ. – Н. Новгород: изд-во НГУ им. Н.И. Лобачевского, 2004. – С. 332–340.

9. Антонов, С.Ф. Особенности сублимационной сушки лекарственных и диагностических препаратов в ампулах / С.Ф. Антонов, Г.И. Сигаев, Б.А. Никонов, А.И. Кобатов // Биотехнология. – 1998. – № 5. – С. 48–69.

10. Аршинова, О.Ю. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов / О.Ю. Аршинова, Н.А. Оборотова, Е.В. Санарова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 1 (2). – С. 20–24.

11. Астахов, Б.Ю. Импортозамещение в микрофильтрации / Б.Ю. Астахов, А.Ю. Котова, И.М. Колганова // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2015. – № 6. – С. 94–98.

12. Атангулова, Р.Г. Определение молекулярно-массового состава препаратов внутривенного иммуноглобулина разных производителей методом HPLC / Р.Г. Атангулова, А.Г. Исрафилов, С.С. Воронин // Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology: матер. междунар. науч. конф. – Томск, 2006. – С. 331–332.

13. Атангулова, Р.Г. Определение антител к гликопротеину вируса бешенства в препарате антирабического иммуноглобулина с помощью иммуноферментного метода / Р.Г. Атангулова, А.Г. Исрафилов, Н.П. Ситник // Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, производство и применение: матер. Всероссийской науч. конф. с международным участием. – Уфа, 2005. – Ч. 1. – С. 78–80.

14. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.

15. Бабкин, М.В. Способ получения гипериммунной антирабической сыворотки / М.В. Бабкин, Б.Т. Стегний, С.А. Ничик [и др.] // Патент № 19403 UA, МПК А61К 39/205; 15.12.2006.

16. Бакулов, И.А. Мировая эпизоотическая ситуация по болезням диких животных / И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей: матер. междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2002. – С. 5–10.

17. Баньковский, Д.О. Иммунобиологические свойства штамма ERA G 333 вируса бешенства для изготовления оральной антирабической вакцины: автореф. дис. ... канд. ветер. наук: 06.02.02 / Баньковский Денис Олегович. – Щелково, 2010. – 20 с.

18. Барышников, П.И. Современные проблемы бешенства / И.П. Барышников, В.Н. Грязин, А.В. Зайковская. – М.: КолосС, 2007. – 81 с.
19. Бахтин, И.А. Совершенствование процесса сублимационного высушивания лекарственных препаратов: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.01 / Бахтин Илья Александрович. – Пермь, 2012. – 25 с.
20. Беланова, А.А. История разработки и применение наноантител как инструмента современной медицины и энзимологии / А.А. Беланова, П.В. Золотухин, Ю.А. Лебедева [и др.] // Валеология. – 2015. – № 2. – С. 42–52.
21. Беневоленский, С.В. Гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты (fab) против вируса бешенства, изолированный фрагмент днк, кодирующий fab против вируса бешенства, клетка дрожжей, трансформированная фрагментом днк, и способ получения fab против вируса бешенства с использованием дрожжей / С.В. Беневоленский, С.С. Зацепин, Е.В. Клячко [и др.] // Патент РФ № 2440412, МПК С12N001/00; 25.03.2010.
22. Березин, В.Э. Гликопротеиды оболочечных вирусов, получение очищенных препаратов и оценка иммуногенных свойств / В.Э. Березин, В.М. Зайдес, В.М. Жданов // Вопросы вирусологии. – 1986. – Т. 31, № 3. – С. 262–274.
23. Бешенство. Информационный бюллетень ВОЗ [Электронный ресурс]. – 2015. – № 99. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/ru/>.
24. Бикбулатова, С.М. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / С.М. Бикбулатова, Д.А. Чемерис, Ю.М. Никоноров [и др.] // Вестник Башкирского университета. – 2012. – Т. 17, № 1. – С. 59–67.
25. Биалалова, Г.П. Производство вакцин для профилактики клещевого энцефалита в Томске. Разработка и применение вакцины ЭнцеВир / Г.П. Биалалова // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, № 2. – Вып. 2. – С. 25–32.
26. Биотехнология / Под ред. Е.С. Воронина. – СПб.: ГИОРД – 2005. – 792 с.
27. Благородов, С.Г. Стабилизация физико-химических свойств препаратов иммуноглобулинов при хранении / С.Г. Благородов, А.П. Шепелев, Н.А. Дмитриева [и др.] // Иммунобиологические препараты: сб. науч. трудов. – М. – 1989. – С. 38–43.
28. Бланков, Б.И. Применение лиофилизации в микробиологии / Б.И. Бланков, Д.Л. Клебанов. – М.: Медгиз, 1961. – 263 с.

29. Ботвинкин, А.Д. Обнаружение антител к вирусу бешенства с помощью ELISA в пробах крови, собранных на бумажные диски / А.Д. Ботвинкин, О.Ц. Наволокин // Лаб. дело. – 1988. – № 3. – С. 73–74.
30. Брахт, К. Фильтрация кросс-флоу / К. Брахт, Е.Е. Каталевский, С.П. Савельева // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2009. – № 6. – С. 47–51.
31. Брюханов, А.Л. Молекулярная микробиология / А.Л. Брюханов, К.В. Рыбак, А.И. Нетрусов. – М.: Изд-во Московского университета, 2012. – 477 с.
32. Булатов, А.Е. Анализ тенденций в использовании первичной упаковки при производстве инфузионных растворов в РФ / А.Е. Булатов, Е.О. Трофимова // Ремедиум. – 2013. – № 1. – С. 48–53.
33. Вишняков, И.Ф. Способ определения антирабических вируснейтрализующих антител / И.Ф. Вишняков, В.В. Недосеков, К.Н. Груздев [и др.] // Патент № 97116427 РФ, МПКG01N33/569, A61K39/205; 01.10.97.
34. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 70 с.
35. Волкова, А.В. Культивирование вируса бешенства штамма Внуково-32 в культуре перевиваемых клеток для производства антирабической вакцины: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 / Волкова Аэлита Витальевна. – М., 1997. – 19 с.
36. Волкова, Р.А. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств / Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина, В.И. Климов [и др.] // Биопрепараты. – 2016. – Т. 16, № 4. – С. 229–237.
37. В Подмосковье в 2015 году выявили рекордное за 63 года число случаев бешенства животных [Электронный ресурс] // Информационное агентство ТАСС. – Режим доступа: <http://tass.ru/moskovskaya-oblast/2678356>.
38. Вялков, А.И. Стандартные операционные процедуры (СОПы) как один из элементов управления качеством медицинской помощи / А.И. Вялков, П.А. Воробьев, М.В. Сура, М.В. Авксентьева // Проблемы стандартизации в здравоохранении. – 2005. – № 7. – С. 1–6.
39. Вятчанин, А.С. Модификация процедуры фагового дисплея для повышения эффективности селекции антиген-связывающих доменов особых одноцепочечных верблюжьих антител / А.С. Вятчанин, С.В. Тиллиб // Биотехнология. – 2008. – № 4. – С. 22–27.

40. Гаврилова, М.А. «ОспаВир» – новый препарат для первичной вакцинации против натуральной оспы двухэтапным методом / М.А. Гаврилова, О.В. Шкуратова, Г.Г. Мальцева [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – № 2. – Вып. 2. – С. 63–67.
41. Гаврилова, Н.А. Регулирование обращения препаратов гетерологичных сывороток и иммуноглобулинов для профилактики и лечения инфекционных заболеваний в современных условиях / Н.А. Гаврилова, Л.В. Саяпина, Ю.И. Обухов [и др.] // Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года: матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Саратов, 2016. – С. 60–62.
42. Генералов, С.В. Разработка биотехнологической схемы получения препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина на основе F(ab)₂-фрагментов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 / Генералов Сергей Вячеславович. – Саратов, 2009. – 22 с.
43. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
44. Голубев, Л.Г. Сушка в химико-фармацевтической промышленности / Л.Г. Голубев, Б.С. Сажин, Е.Р. Валашек. – М.: Медицина, 1978. – 272 с.
45. Горшкова, Т.Ф. Технологические разработки инактивированной антирабической вакцины / Т.Ф. Горшкова, В.В. Недосеков, В.И. Жестеров, О.Г. Лаптева // матер. международной науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ. – Покров, 2001. – С. 57–58.
46. ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств. – М.: Стандартинформ, 2010. – 138 с.
47. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XII издание. Ч. 1. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.
48. Грабко, В.И. Фрагмент днк, кодирующий синтез гликопротеина g вируса бешенства, рекомбинантная плазмидная днк pvg18-1, кодирующая гликопротеин g вируса бешенства, штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент гликопротеина g вируса бешенства / В.И. Грабко // Патент № 2008355 РФ, МПК С12N15/70, С12N15/23; 28.02.94.
49. Грибенча, С.В. Современные аспекты биологии и профилактики лиссавирусных инфекций (Экспериментальное исследование): автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.06 / Грибенча Сергей Васильевич. – М., 1993. – 81 с.

50. Грибенча, С.В. Новый принцип селекции вакцинного вируса на основе количественного уровня экспрессии G-белка главного иммуногена вируса бешенства / С.В. Грибенча, М.А. Лосич, Л.Ф. Грибенча, И.В. Непоклонов // Вопросы вирусологии. – 2012. – № 3. – С. 44–48.

51. Гринь, С.А. Современные биотехнологические процессы и иммунологические методы при промышленном производстве ветеринарных препаратов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23 / Гринь Светлана Анатольевна. – Щелково, 2008. – 54 с.

52. Груздев, К.Н. Бешенство животных / К.Н. Груздев, В.В. Недосеков. – М.: Аквариум, 2001. – 303 с.

53. Груздев, Л.К. Изучение репродукции фиксированного штамма вируса бешенства в культуре клеток / Л.К. Груздев, А.Е. Дешевых, К.Н. Груздев // Вопросы прикладной экологии (природопользования), охотоведения и звероводства: матер. науч. конф. – Киров, 1997. – С. 285–286.

54. Гуйго, Э.И. Влияние условий предварительного замораживания на проницаемость сухого слоя продуктов в процессе вакуумной сублимационной сушки / Э.И. Гуйго, Ц.Д. Цветков // Холодильная техника. – 1972. – № 6. – С. 34–35.

55. Гулякин, И.Д. Применение мембранных фильтров в технологии получения стерильных лекарственных препаратов / И.Д. Гулякин, Л.Л. Николаева, Е.В. Санарова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50, № 1. – С. 28–32.

56. Гусаров, Д.А. Лиофилизация биофармацевтических белков (миниобзор) / Д.А. Гусаров // Биофармацевтический журнал. – 2010. – Т. 2, № 5. – С. 3–7.

57. Гусаров, Д.А. Вирусная безопасность биофармацевтических препаратов / Д.А. Гусаров // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – № 1 (14). – С. 86–92.

58. Давыдкин, В.Ю. Отработка процесса сублимационного высушивания комплексного иммуноглобулинового препарата / В.Ю. Давыдкин // Проблемы инфекционных болезней: матер. науч.-практ. конф. – М., 2000. – Ч. 2. – С. 61–65.

59. Дейнеко, Е.В. Генетически модифицированные растения – продуценты рекомбинантных белков медицинского назначения / Е.В. Дейнеко // Вестник Томского государственного университета. – Биология. – 2012. – № 2 (18). – С. 41–51.

60. Доброва, В.Е. Разработка методических подходов к созданию стандартных операционных процедур на месте проведения клинического испытания / В.Е. Доброва, Е.А. Зупанец, К.Л. Ратушная // Клиническая фармация. – 2013. – № 3. – С. 16–20.

61. Долинов, К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов / К.Е. Долинов. – М.: Медицина, 1969. – 231 с.

62. Доронина, Н.А. Влияние стабилизирующих добавок на антикомплементарную активность иммуноглобулина / Н.А. Доронина, Л.Н. Сарафанова, В.Н. Мигунов [и др.] // Иммуноглобулины: сб. науч. трудов. – Изд-во Нижегородского медицинского института. – 1993. – С. 68–74.

63. Дуглас, Х. Специфичные в отношении вируса бешенства нейтрализующие моноклональные антитела человека и нуклеиновые кислоты и связанные с ними способы / Х. Дуглас, Д. Бернхард // Патент 2272809 РФ, МПК С07К 16/08, С12N 15/13, С12N 15/63, А61К 39/42, А61Р 31/12; 29.08.2007.

64. Дыкман, Л.А. Золотые наночастицы: синтез, свойства и биомедицинские применения / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев, С.Ю. Щеголев, Н.Г. Хлебцов. – М.: Наука, 2008. – 318 с.

65. Дыкман, Л.А. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы / Л.А. Дыкман, Н.Г. Хлебцов // АСТА NATURAE. – 2011. – Т. 3, № 2 (9). – С. 16–38.

66. Дяченко, С.А. Количественная оценка гликопротеина в вакцинах против бешенства методом иммуноферментного анализа: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Дяченко Сергей Александрович. – Щелково, 2016. – 127 с.

67. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Серии европейских договоров – № 123 [Электронный ресурс] // Страсбург, 18 марта 1986 года. – Режим доступа: <https://rm.coe.int/168007aba8>.

68. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова // М.: Высшая школа, 1991. – 288 с.

69. Еникеева, Л.Ф. Изучение специфической активности в тесте ИФА вируса бешенства при культивировании в перевиваемых клетках Vero / Л.Ф. Еникеева, Р.С. Шафеева, Д.Р. Латыпова // Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов: матер. Всероссийской науч.

конф., посвященной 95-летию Уфимского НИИВС им. И.И. Мечникова ГУП «Иммуно-препарат». – Уфа, 2000. – Ч. 1. – С. 54–56.

70. Екимов, А.Н. Новейшие технологии в генодиагностике: полимеразная цепная реакция в реальном времени (Real-Time PCR) / А.Н. Екимов, Г.А. Шипулин, Е.Г. Бочкарев, Д.В. Рюмин // Вестник последипломного образования. – 2001. – № 3. – С. 7–10.

71. Епачинцев, А.А. Оптимизация условий хроматографической очистки вакцины клещевого энцефалита на макропористом стекле / А.А. Епачинцев, О.В. Стронин, О.И. Шарова [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, № 2. – С. 59–62.

72. Еремин, В.И. Эпизоотологическая ситуация по бешенству в Саратовской области / В.И. Еремин, Н.Н. Красильникова, Н.А. Заяц // Социальные проблемы медицины и экологии человека: матер. Всероссийской науч.-практ. конф. – Саратов, 2009. – С. 104–106.

73. Еремин, В.И. Состояние антирабической помощи населению Саратовской области / В.И. Еремин, Н.Н. Красильникова, Н.А. Заяц // Социальные проблемы медицины и экологии человека: матер. Всероссийской науч.-практ. конф. – Саратов, 2009. – С. 106–108.

74. Ермолаев, С.В. Влияние осмотического давления, гелеобразования и коагуляции пор на удельную производительность ультрафильтрационных мембран / С.В. Ермолаев, Н.С. Орлов // Мембраны и мембранные технологии. – 2013. – Том 3, № 3. – С. 175–185.

75. Жданов, В.М. Общая и частная вирусология / В.М. Жданов, С.Я. Гайдамович. – М.: Медицина, 1982. – 1016 с.

76. Забияка, Ю.И. Метод ПЦР-РВ для оценки титра вируса краснухи в вируссо-держашей жидкости / Ю.И. Забияка // Ломоносов-2010: матер. XVII междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. – М., 2010. – С. 167.

77. Зайдес, В.М. Очистка и концентрирование вирусных суспензий методами жидкостной хроматографии и микрофильтрации / В.М. Зайдес, С.Ю. Ключник, Б.В. Мчедлишвили [и др.] // В кн.: Методы исследования в молекулярной, общей и медицинской вирусологии. – М.: Медицина, 1987. – С. 52–61.

78. Зайкова, О.Н. Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области /

О.Н. Зайкова, Т.В. Гребенникова, А.Л. Елаков [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2016. – Т. 61, № 4. – С. 186–192.

79. Змачинская, Т.Б. Оптимизация технологической схемы получения препаратов иммуноглобулинов для внутримышечного введения / Т.Б. Змачинская, В.В. Анастасиев // Вестник Нижегородского ун-та им. Н.И. Лобачевского. – 2001. – № 1. – С. 70–73.

80. Золотов, Ю.А. Основы аналитической химии / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева [и др.]. – М.: Высшая школа, 1996. – Т.1. – С. 319–325.

81. Иванов, И.В. Совершенствование технологии получения инактивированных антирабических вакцин: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06, 06.02.02 / Иванов Игорь Викторович. – Щелково, 2011. – 22 с.

82. Исрафилов, А.Г. Иммуновенин – первая отечественная стабильная лиофилизированная форма внутривенного иммуноглобулина в Российской Федерации / А.Г. Исрафилов, Г.Б. Кудашева, И.А. Корнилова [и др.] // Медицинские иммунобиол. препараты в XXI веке: разработка, производство и применение: матер. Всероссийской конф. – Уфа, 2005. – Ч. 2. – С. 5–12.

83. Исрафилов, А.Г. Способ очистки иммуноглобулина от пирогенных веществ / А.Г. Исрафилов, Г.Б. Кудашева, А.М. Осипенко [и др.] // Патент 2110279 РФ, МПК А61К39/395; 10.05.1998.

84. Исрафилов, А.Г. Способ получения лиофилизированной формы иммуноглобулина для внутривенного введения / А.Г. Исрафилов, А.Г. Лютов, И.А. Корнилова [и др.] // Клин. фармакол. и терапия. – 1994. – № 4. – С. 174–182.

85. Истомина, М.А. Совершенствование методов диагностики и оценки эффективности вакцинопрофилактики бешенства животных: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Истомина Мария Александровна. – Щелково, 2011. – 120 с.

86. Ишкильдин, И.Б. Морфологические аспекты репродукции вируса бешенства в культуре клеток / И.Б. Ишкильдин, Е.И. Ишкильдина, О.И. Захарова [и др.] // Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, производство и применение: матер. Всероссийской науч. конф. с международным участием. – Уфа, 2005. – Т. 1. – С. 252–255.

87. Каргина, Т.М. Изучение молекулярного состава фракций иммуноглобулиновых препаратов методом гель-фильтрации / Т.М. Каргина, В.Ф. Рунова // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1987. – № 12. – С. 74–77.

88. Каркищенко, Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях / Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачев. – М.: 2010. – 173 с.
89. Карпов, А.М. Сушка продуктов микробиологического синтеза / А.М. Карпов, А.А. Улумиев. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 216 с.
90. Карпов, С.П. Гипериммунные сыворотки / С.П. Карпов, С.М. Прегер, Г.Е. Синельников, Ю.В. Федоров. – Томск: Изд-во Томского университета, 1976. – 380 с.
91. Карпова, Е.Ф. Гликопротеиды вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей. Получение и антигенные свойства / Е.Ф. Карпова, Я.Я. Цилинский // Методы исследования в молекулярной, общей и медицинской вирусологии. – М. – 1987. – С. 49–51.
92. Ключкова, Т.И. Исследования по оптимизации производства и стандартизации лиофилизированных препаратов на примере противоопухолевых лекарственных средств: дис. ... д-ра фарм. наук: 15.00.01 / Ключкова Татьяна Ивановна. – М., 2005. – 200 с.
93. Ключник, С.Ю. Разработка мембранно-хроматографических технологий очистки и концентрирования вирусов для получения вакцинных и диагностических препаратов: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.06 / Ключник Сергей Юрьевич. – М., 1993. – 24 с.
94. Ключник, С.Ю. Очистка и концентрирование вируса бешенства методом диалитриационного концентрирования / С.Ю. Ключник, Б.В. Мчедлишвили, С.В. Грибенча [и др.] // Вопросы вирусологии. – 1991. – № 5. – С. 394–399.
95. Ковалев, Н.А. Изучение бешенства и разработка средств и способов его профилактики в Беларуси / Н.А. Ковалев, Д.В. Бучукури // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – 2014. – № 4. – С. 96–101.
96. Колодкина, В.Л. Приготовление иммунозолотого маркера и его использование в иммунодот-анализе для выявления дифтерийного токсина / В.Л. Колодкина, Т.Н. Денисевич, Л.А. Дыкман, О.Н. Врублевская // Медицинский журнал. – 2009. – № 2. – С. 66–68.
97. Комиссаров, А.В. Экспериментальная оценка использования метода ультрафильтрации по принципу «кросс-флоу» для концентрирования О-антигена в производстве холерной бивалентной химической вакцины / А.В. Комиссаров, С.А. Еремин, Ю.А. Алешина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 2 (108). – С. 83–86.

98. Комиссаров, А.В. Изучение процесса стерилизующей фильтрации жидкого противосибирезвенного лошадиного глобулина / А.В. Комиссаров, Г.В. Комоско, А.А. Лещенко [и др.] // Биотехнология. – 2002. – № 2. – С. 66–74.

99. Комиссаров, А.В. Разработка сухой формы полуфабриката глобулина противосибирезвенного лошадиного / А.В. Комиссаров, Г.В. Комоско, А.А. Лещенко [и др.] // Биотехнология. – 2003. – № 3. – С. 74–79.

100. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года: [программа: утв. Правительством РФ от 24 апреля 2012 г. N 1853п-П8] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://government.ru/media/files/41d4e85f0b854eb1b02d.pdf>.

101. Константино, Г.Р. Повреждение препаратов лиофилизированных белков / Г.Р. Константино, С.Р. Швендерман, Р. Лангер, А.М. Клибанов // Биохимия. – 1998. – Т. 68, вып. 3. – С. 422–429.

102. Корнилова, И.А. Обеспечение стабильности иммуноглобулинов для внутривенного введения / И.А. Корнилова, А.Г. Исрафилов, В.Г. Кудашева // Медицинские иммунобиол. препараты в XXI веке: разработка, производство и применение: матер. Всероссийской конф. – Уфа, 2005. – Ч. 2. – С. 123–125.

103. Короткова, Т.В. Влияние различных факторов на содержание димеров в препарате иммуноглобулинов / Т.В. Короткова, В.В. Анастасиев // Вакцинология: матер. Всероссийской науч.-практ. конф. – М., 2006. – С. 52.

104. Короткова, Т.В. Пирогенные вещества в препаратах иммуноглобулинов / Т.В. Короткова, В.В. Анастасиев, Л.М. Ефремова, Т.Б. Змачинская // Вестник службы крови России. – 2002. – № 2. – С. 35–37.

105. Котова, А.Ю. Технология осветления трудно-фильтруемых биологических жидкостей / А.Ю. Котова, С.В. Горобец // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2008. – № 3. – С. 38–40.

106. Кочетков, Н.В. Эпидемиологическая ситуация по бешенству в Саратовской области / Н.В. Кочетков, А.Н. Данилов // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2013. – Т. 3, вып. 2. – С. 336.

107. Кравченко, В.М. Влияние эвтектических явлений на сохраняемость препаратов при высушивании / В.М. Кравченко, Р.М. Онищенко, И.Г. Коренной, Н.П. Жоков // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии. – Владимир, 1977. – С. 107–110.

108. Краснопольский, Ю.М. Биотехнология иммунобиологических препаратов / Ю.М. Краснопольский, М.И. Борщевская // Харьков: Фармитэк, 2008. – 312 с.
109. Кротова, Л.И. Изучение структурных белков вируса бешенства: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 / Кротова Лариса Ивановна. – М., 1985. – 24 с.
110. Кугач, В.В. Стандартная операционная процедура как структурная единица стандартизации / В.В. Кугач // Вестник фармации. – 2007. – № 3 – С. 6–10.
111. Кузнецова, С.В. Получение очищенного и концентрированного культурально-го вируса бешенства / С.В. Кузнецова, Л.В. Исаевич, Б.Н. Блехерман [и др.] // Вестник с.-х. науки. – 1981. – № 6 (297). – С. 65–70.
112. Лаковская, И.А. Определение параметров сублимационного консервирования и исследование их влияния на сохранение исходных биологических свойств объектов: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.175 / Лаковская Ирина Анатольевна. – М., 1971. – 28 с.
113. Лаптева, Л.К. Сохраняемость специфических антител в иммуноглобулине человека противостолбнячном в зависимости от степени фрагментации IgG / Л.К. Лаптева, Л.В. Минакова, В.Ю. Гавриленкова // Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. – 1987. – № 4. – С. 148–153.
114. Лепешин, С.А. Микрофильтрационные полиамидные мембраны, обладающие стерилизующими и бактериостатическими свойствами: дис. ... канд. техн. наук: 05.17.06 / Лепешин Сергей Александрович. – Владимир, 2016. – 132 с.
115. Логвинов, С.В. Оптимизация процессов получения и свойства сухой формы иммуноглобулина противосибиреязвенного / С.В. Логвинов, В.П. Бондарев, А.Н. Шевцов [и др.] // Биотехнология. – 2007. – № 6. – С. 42–49.
116. Лосич, М.А. Иммунобиологические свойства штамма ERA-CВ 20М вируса бешенства и разработка на его основе антирабической вакцины: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.02 / Лосич Милана Анатольевна. – М., 2014. – 25 с.
117. Лосич, М.А. Разработка и использование ИФА для оценки содержания гликопротеина (G-белка) вируса бешенства / М.А. Лосич, И.В. Непоклонова, О.А. Верховский [и др.] // Ветеринария. – 2012. – № 7. – С. 30–35.
118. Лыков, А.В. Теория сушки / А.В. Лыков. – М.: Энергия, 1968. – 472 с.
119. Львов, Д.К. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных: руководство по вирусологии / Д.К. Львов. – М.: МИА. – 2013. – 1200 с.

120. Ляпина, А.М. Применение полиоксидония для получения специфических антител к бактериальным антигенам [Электронный ресурс] / А.М. Ляпина, Т.И. Полянина, О.В. Ульянова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. – Режим доступа: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5729>.
121. Макаров, В.В. Бешенство: естественная история на рубеже столетий / В.В. Макаров, А.М. Гулюкин, М.И. Гулюкин. – М.: ЗооВетКнига, 2015. – 121 с.
122. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
123. Медицинская вирусология: Руководство / под ред. Д.К. Львова. – М.: ООО Медицинское информационное агентство, 2008. – 656 с.
124. Медуницын, Н.В. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней / Н.В. Медуницын, В.И. Покровский. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 512 с.
125. Мелихова, А.В. Разработка технологии приготовления сухих дозированных форм комплексного иммуноглобулинового препарата: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Мелихова Александра Вадимовна. – М., 2010. – 29 с.
126. Меркулов, В.А. Оценка нежелательных реакций при применении лекарственных средств в России в 2013 году / В.А. Меркулов, Н.Д. Бунятян, В.К. Лепахин [и др.] // Безопасность и риск фармакотерапии. – 2014. – № 1 (2). – С. 31–41.
127. Метлин, А.Е. Молекулярно-биологические характеристики полевых изолятов и аттенуированных штаммов вируса бешенства: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Метлин Артем Евгеньевич. – Владимир, 2004. – 26 с.
128. Методы лабораторных исследований по бешенству. Третье издание / под ред. М.М. Каплан, Н. Копровски. – Женева: ВОЗ, 1975. – 360 с.
129. Миронов, А.Н. Актуальные вопросы по разработке стандартов качества иммунобиологических лекарственных препаратов / А.Н. Миронов, А.А. Мовсисянц, В.П. Бондарев [и др.] // Ведомости НЦ ЭСМП. – 2013. – № 2. – С. 57–59.
130. Миронова, Л.Л. Разные аспекты применения культур клеток в вакцинологии / Л.Л. Миронова // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 9. – С. 60–62.
131. Миронова, Л.Л. Культуры клеток в вирусологических исследованиях / Л.Л. Миронова, Ю.Х. Хапчаев // В сб.: Применение культур клеток человека и животных в биотехнологии. – М., 2005. – С. 1–16.

132. Митькина, Л.И. Стресс-исследования и фотостабильность как часть данных по фармацевтической разработке лекарственного средства / Л.И. Митькина, Е.Л. Ковалева, И.А. Прокопов // Ведомости НЦЭСМП. – 2015. – № 2. – С. 9–12.

133. Михайлова, Г.Р. Новый способ выявления микоплазм в перевиваемых культурах клеток / Г.Р. Михайлова, А.С. Новохатский, М.А. Родова // Вопросы вирусологии. – 1982. – Т. 27, № 6. – С. 119–121.

134. Мовсесянц, А.А. Современные проблемы лечения гидрофобии антирабическими препаратами: дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.06 / Мовсесянц Артем Авакович. – М., 1993. – 475 с.

135. Мовсесянц, А.А. Медицинские иммунобиопрепараты для специфической профилактики бешенства / А.А. Мовсесянц, Г.Б. Агеенко // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С. 48–51.

136. Мовсесянц, А.А. К вопросу о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей / А.А. Мовсесянц, А.Ю. Бутырский, В.П. Бондарев [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – № 5 (84). – С. 85–89.

137. Мовсесянц, А.А. Профилактика и лечение бешенства: достижения и проблемы / А.А. Мовсесянц, А.Т. Кравченко // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1989. – № 8. – С. 97–104.

138. Мовсесянц, А.А. Проблема смертности людей от бешенства в Российской Федерации в 2010–2011 годах / А.А. Мовсесянц, А.Н. Миронов, В.А. Ведерников [и др.] // Ведомости НЦЭСМП. – 2012. – № 3. – С. 48–52.

139. Мовсесянц, А.А. Бешенство людей в Российской Федерации / А.А. Мовсесянц, О.С. Хадарцев // Журнал микробиологии. – 2003. – № 5. – С. 112–116.

140. Могилевский, Б.Ю. Практическая рабиология с практикумом по антирабическим назначениям / Б.Ю. Могилевский. – Херсон: Наддніпряночка, 2009. – 248 с.

141. Морозова, О.В. Динамика репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток / О.В. Морозова, А.Е. Гришечкин, В.Н. Бахвалова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2012. – № 2. – С. 40–43.

142. МУ 1.3.2569-2009 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности. Методические указания. – М., 2009. – 31 с.

143. МУ 3.3.1.1099-2002 Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства. Методические указания. – М., 2002. – 28 с.

144. МУ РД 42-28-10-89 Аттестация перевиваемых клеточных линий – субстратов производства и контроля медицинских и иммунологических препаратов. Методические указания. – М., 1989. – 33 с.

145. МУК 4.1/4.2.588-96 Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. Методические указания. – М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. – 128 с.

146. Мухачева, А.В. Выбор оптимальных методов очистки белковых веществ, входящих в состав вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной (КОКАВ) / А.В. Мухачева, А.А. Мовсесянц, М.М. Алсынбаев // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 3 (76). – С. 84–88.

147. Мчедлишвили, Б.В. Очистка и концентрирование вирусных суспензий методами жидкостной хроматографии и микрофльтрации / Б.В. Мчедлишвили, В.М. Зайдес, С.Ю. Ключник [и др.] // В кн.: Методы исследования в молекулярной общей и медицинской вирусологии. Сборник научных Трудов Института вирусологии АМН СССР. – М., 1987. – С. 52–61.

148. Мчедлишвили, Б.В. Концентрирование вируса лейкоза КРС с использованием ядерных фильтров / Б.В. Мчедлишвили, Н.Г. Ярославцева, М.Н. Санков, М.И. Парфанович // В кн.: Методы исследования в молекулярной общей и медицинской вирусологии. Сборник научных Трудов Института вирусологии АМН СССР. – М., 1987. – С.61–65.

149. Нагиева, Ф.Г. Репродукция фиксированного вируса бешенства в культуре перепелиных фибробластов, растущих в суспензии / Ф.Г. Нагиева, М.С. Бектемирова, К.Ш. Матевосян [и др.] // Вопросы вирусологии. – 1980. – № 4. – С. 429–431.

150. Нафеев, А.А. Эпидемиологические проблемы профилактики бешенства у человека / А.А. Нафеев, Д.А. Хакимова, Г.М. Айнутдинова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2011. – № 6. – С. 48–50.

151. Недосеков, В.В. Технология изготовления антирабического антигена / В.В. Недосеков // Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей: матер. междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2002. – С. 225–227.

152. Недосеков, В.В. Титрование антирабических антител с помощью теста ингибции фокусов флуоресценции / В.В. Недосеков, И.Ф. Вишняков, В.И. Жестерев [и др.] // Ветеринария. – 1998. – № 7. – С. 28–30.

153. Недосеков, В.В. Способ получения гипериммунной антирабической сыворотки / В.В. Недосеков, И.А. Сливко, В.В. Куриннов [и др.] // Патент № 2196607 РФ, МПК А61К39/205, А61К39/42; 20.01.2003.

154. Нежута, А.А. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов / А.А. Нежута, Е.С. Сербис // Биотехнология. – 2001. – № 6. – С. 59–67.

155. Нежута, А.А. Научное обоснование и методика разработки и совершенствования промышленной технологии сублимационного высушивания биопрепаратов: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23 / Нежута Александр Александрович. – Щелково, 2003. – 243 с.

156. Некрасов, А.В. Применение полиоксидония в медицине: иммунология, вакцинология, новые лекарственные средства / А.В. Некрасов, Н.Г. Пучкова, А.С. Иванова [и др.] // Биотехнология: состояние и перспективы развития: матер. III Московского Международного конгресса. – М., 2005. – С. 46.

157. Несчисляев, В.А. Повышение эффективности процесса лиофилизации в технологии пробиотиков / В.А. Несчисляев, А.В. Семченко, Е.Г. Арчакова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 12. – С. 369–370.

158. Неугодова, Н.П. Современные направления в мембранной нанофильтрации биофармпрепаратов. Часть 3. Способы обеспечения безопасности фильтроэлементов / Н.П. Неугодова, Г.В. Долгова, Г.А. Сапожникова [и др.] // Мембраны. – 2008. – № 2 (38). – С. 14–17.

159. Неугодова, Н.П. Исследование возможности использования положительно заряженных мембран производства НПП «Технофильтр» для депирогенизации дистиллированной воды / Н.П. Неугодова, Г.А. Сапожникова, О.В. Шаповалова // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2009. – № 6. – С. 52–55.

160. Нефедова, Л.Н. Применение молекулярных методов исследования в генетике / Л.Н. Нефедова. – М.: ИНФРА-М. – 2013. – 103 с.

161. Нечаева, А.С. Практическое руководство по производству γ -глобулина / А.С. Нечаева, Н.А. Пономарева. – М.: Медицина, 1956. – 114 с.

162. Никитин, Е.Е. Замораживание и высушивание биологических препаратов / Е.Е. Никитин, И.В. Звягин. – М.: Колос, 1971. – 342 с.

163. Никитина, В.Д. Исследование фрагментации препаратов гамма-глобулинов, выпускаемых в СССР / В.Д. Никитина, И.В. Холчев, Л.И. Колесникова, З.И. Кораблева // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1975. – № 1. – С. 44–48.

164. Никифоров, А.К. Разработка научно-прикладных направлений совершенствования иммунобиологических препаратов для профилактики холеры и бешенства: дис. ... д-ра биол. наук: 03.02.03, 03.01.06 / Никифоров Алексей Константинович. – Саратов, 2014. – 309 с.

165. Никифоров, А.К. Получение и анализ основных свойств препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина, состоящего из F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина / А.К. Никифоров, И.А. Дятлов, О.А. Волох [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2007. – № 2. – С. 75–78.

166. Новикова, Л.С. Эвтектические температуры некоторых растворов термолабильных препаратов / Л.С. Новикова, Ю.Е. Шевченко, Н.Е. Чернов // Химико-фармацевтический журнал. – 1977. – № 11. – С. 100–102.

167. Об обращении лекарственных средств: [федер. закон № 61: принят Гос. Думой 12 апреля 2010 г.] // Российская газета. – 2010. – 14 апреля.

168. Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2017 год: [распоряжение Правительства Российской Федерации от 28.12.2016 N 2885-р] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_210292/.

169. Озерецковский, Н.А. Предложения по профилактике нежелательных реакций при применении иммунобиологических лекарственных препаратов в Российской Федерации / Н.А. Озерецковский, К.Э. Затолочина, И.И. Снегирева // Безопасность и риск фармакотерапии. – 2015. – № 1 (6). – С. 25–29.

170. Опарин, Ю.Г. Повреждение и защита биоматериалов при замораживании и лиофилизации / Ю.Г. Опарин // Биотехнология. – 1996. – № 7. – С. 3–13.

171. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2011 году: Государственный доклад. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. – 316 с.

172. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2012 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2013. – 176 с.

173. ОСТ 64-02-003-2002 Стандарт отрасли. Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. – М.: Департамент промышленной и инновационной политики в медицинской и биотехнологической промышленности, 2002. – 93 с.

174. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман. – М.: Мир. – 1981. – 120 с.

175. ОФС Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний / В кн.: Государственная Фармакопея СССР. XI издание. – Вып. 1. Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – С. 199–251.

176. Петрова, И.И. Специфическая активность вирусного материала, полученного на перевиваемой линии клеток Веро (В) / И.И. Петрова, Л.Ф. Еникеева, Ю.М. Никонов [и др.] // Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, производство и применение: матер. Всероссийской науч. конф. с международным участием. – Уфа, 2005. – Т.1. – С. 244–245.

177. Петухов, В.Г. Определение стабильности Отраслевых Стандартных Образцов (ОСО) и других МИБП ускоренным методом. Методические рекомендации. – М.: Медицина, 2003. – 7 с.

178. Пилявская, Е.А. Определение фрагментации и агрегации белка в гетерогенном антирабическом иммуноглобулине / Е.А. Пилявская // В сб.: Научные основы производства гипериммунных сывороток. – Томск, 1979. – С. 60–61.

179. Пилявская, Е.А. Характеристика качества гетерологичных антивирусных иммуноглобулинов в процессе хранения / Е.А. Пилявская, З.Ф. Киселева, А.Р. Явья // В сб.: Вирусные и бактериальные препараты. – Томск, 1984. – Т. 33. – С. 82–86.

180. Пилявская, Е.А. Получение сухого антирабического иммуноглобулина / Е.А. Пилявская, Л.Н. Никитина // В сб. мат. Всесоюзного симпозиума, посв. 90-летию Тбилисского НИИ ВС. – Тбилиси, 1984. – С. 534–536.

181. Пинаев, Г.П. Клеточная биотехнология: учебно-методическое пособие / Г.П. Пинаев, М.И. Блинова, Н.С. Николаенко [и др.] // СПб: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. – 224 с.

182. Погода, А.А. Тест-система на основе ПЦР в реальном времени для количественного определения вируса болезни Гамборо / А.А. Погода, М.А. Потехина // Вопросы вирусологии. – 2010. – № 3. – С. 44–48.

183. Подольский, М.В. Высушивание препаратов крови и кровезаменителей / М.В. Подольский. – М.: Медицина, 1973. – 190 с.

184. Подчерняева, Р.Я. Применение культур клеток для вирусологических исследований / Р.Я. Подчерняева, М.В. Мезенцева, И.А. Суетина [и др.] // Клеточные культуры. Инф. бюлл. института цитологии РАН. – 2014. – Вып 30. – С. 56–71.

185. Подчерняева, Р.Я. Определение микоплазм и вируса бычьей диареи в коллекционных клеточных линиях / Р.Я. Подчерняева, Л.В. Урываев, А.В. Дедова [и др.] // Клеточные культуры. Инф. бюлл. института цитологии РАН. – 2011. – Вып 27. – С. 80–88.

186. Подчерняева, Р.Я. Линия клеток Vero В для приготовления медико-биологических препаратов / Р.Я. Подчерняева, Т.М. Хижнякова, Г.Р. Михайлова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 1996. – № 4. – С. 183–185.

187. Полещук, Е.М. Современные особенности эпидемиологии бешенства в России / Е.М. Полещук, А.Д. Броневец, Г.Н. Сидоров // Инфекционные болезни. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 29–36.

188. Полещук, Е.М. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России / Е.М. Полещук, Г.Н. Сидоров, С.В. Грибенча // Вопросы вирусологии. – 2013. – № 3. – С. 9–17.

189. Положение о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев): [утверждено Министром здравоохранения РФ 23.04.2003 г. и президентом РАМН 22.04.2003 г.] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.scbmt.ru/mag/polojenie.pdf>.

190. Пономарева, Т.С. Влияние полиоксидония на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины / Т.С. Пономарева, П.Н. Дерябин, Б.В. Каральник [и др.] // Иммунология. – 2014. – № 5. – С. 286–291.

191. Правила надлежащей лабораторной практики: [приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01 апреля 2016 г.] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://depr.mos.ru/upload_local/iblock/fd4/fd4ba77acfb4fee7094a6c681e97c02e/prikaz_minzdrava_rossii_ot_1_aprelya_2016_g._n_199n.pdf.

192. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств: [приказ Минпромторга Российской Федерации № 916 от 14 июля 2013 г.] // Российская газета. – 2013. – 8 ноября.

193. Прегер, С.М. Сравнительная характеристика метода очистки сывороток от пирогена / С.М. Прегер, Н.Г. Турлянцева, А.П. Дутова // Труды Томского НИИ ВС. – 1960. – Т. 12. – С. 246–250.

194. Пушкарь, В.Г. Усовершенствование процесса лиофильного высушивания иммунобиологических препаратов на современном оборудовании / В.Г. Пушкарь, И.В. Новицкая, М.Я. Кулаков [и др.] // Вестник ВолгГМУ. – 2011. – Вып. 4 (40). – С. 65–68.

195. Пушкарь, Н.С. Криопротекторы / Н.С. Пушкарь, М.И. Шраго, А.М. Белоус, Ю.К. Калугин. – Киев: Наукова Думка, 1978. – 204 с.

196. Рахманин, П.В. Иммуноферментная тест-система для определения уровня антирабических антител в сыворотках крови привитых против бешенства кошек и собак: автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.23 / Рахманин Петр Владимирович. – Щелково, 2008. – 29 с.

197. Ребриков, Д.В. ПЦР «в реальном времени» / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов [и др.] – М.: БИОНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.

198. Реутская, Л.А. Порядок разработки рабочих инструкций и операционных процедур / Л.А. Реутская, А.Н. Долголикова, Е.Л. Александрова, В.В. Кугач // Вестник фармации. – 2007. – Вып. 3 (37). – С. 10–15.

199. Сазанова, Э.Я. Иммуноферментный анализ при индикации вируса бешенства и определении уровня антител / Э.Я. Сазанова, С.В. Кузнецова, Е.В. Маслов [и др.] // Ветеринария. – 1991. – № 8. – С. 63–64.

200. Саканян, Е.И. Современные подходы к составлению фармакопейных статей, регламентирующих качество лекарственных препаратов для парентерального и офтальмологического применения / Е.И. Саканян, Н.Д. Бунятян, Р.А. Лавренчук [и др.] // Фармация. – 2015. – № 5. – С. 47–50.

201. Самойлова, И.Г. Алгоритм разработки медико-технологических стандартных операционных процедур в процессе внедрения стратегического управления медицинской организацией / И.Г. Самойлова // Журнал инфектологии. – 2014. – № 2. – С. 65–70.

202. Самуйленко, С.А. Гликопротеин вируса бешенства и протеин А (*Staphylococcus Aureus*) в титровании методом ИФА антирабических антител / С.А. Самуйленко,

Э.Я. Сазанова, С.В. Кузнецова, Д.П. Кузнецов // Сб. науч. трудов, посв. 75-летию НИИ Микробиологии МО РФ. – Киров, 2003. – С. 113–114.

203. Свешников, П.Г. Получение гуманизированного Fab-фрагмента нейтрализующего антитела против вируса бешенства / П.Г. Свешников, Т.А. Ягудин, Е.В. Морозкина [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2010. – № 3. – С. 185–190.

204. Свинцов, Р.А. Выбор и оценка метода эксплуатации лошадей-продуцентов в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина / Р.А. Свинцов, Е.Г. Абрамова, С.В. Генералов, И.М. Жулидов // Ветеринария. – 2014. – № 12. – С. 53–56.

205. Свитцов, А.А. Баромембранные процессы в биотехнологии / А.А. Свитцов // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2007. – № 4. – С. 18–21.

206. Седелкин, В.М. Структура и свойства полупроницаемых мембран на основе модифицированных диацетатов целлюлозы / В.М. Седелкин, Л.Н. Потехина, О.А. Чиркова [и др.] // Мембраны и мембранные технологии. – 2014. – Том 4, № 2. – С. 114–128.

207. Седова, Е.С. Новые антирабические рекомбинантные вакцины / Е.С. Седова, М.М. Шмаров // Биопрепараты. – 2016. – Том 16, № 4. – С. 219–229.

208. Селимов, М.А. Бешенство / М.А. Селимов // М.: Медицина, 1978. – 336 с.

209. Селимов, М.А. Прошлое, настоящее и будущее специфической профилактики гидрофобии (к 100-летию первой пастеровской антирабической прививки) / М.А. Селимов // Вопросы вирусологии. – 1986. – № 3. – С. 370–374.

210. Селимов, М.А. Современные достижения в области рабиологии / М.А. Селимов // Эпидемиология, вирусология и инфекционные заболевания: обзорная информация. Вып.4. – М.: ВНИИ, 1987. – 68 с.

211. Сельникова, О.П. Изучение реактогенности и серологической активности инактивированной антирабической вакцины Верораб [Электронный ресурс] / О.П. Сельникова, А.В. Моисеева, Л.А. Антонова [и др.] // Бюлл. Вакцинация. Бешенство. – 2005. – № 1 (37). – Режим доступа: <http://medi.ru/doc/15b3706.htm>.

212. Сергеев, В.А. Вирусы и вирусные вакцины / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер // М.: Библионика, 2007. – 524 с.

213. Симонова, Е.Г. Современные тенденции и особенности контроля за ситуацией по бешенству в Российской Федерации / Е.Г. Симонова, О.С. Хадарцев // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2014. – № 2. – С. 65–68.

214. Ситник, Н.П. Разработка высокоочищенного препарата иммуноглобулина антирабического из плазмы крови лошади: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.00.36 / Ситник Наталья Павловна. – Уфа, 2007. – 24 с.

215. Ситник, Н.П. Способ получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки / Н.П. Ситник, Н.В. Загидуллин, А.Г. Исрафилов [и др.] // Патент № 2322503 РФ, МПК С12Р 21/00, А61К 39/42; 2008.

216. Ситник, Н.П. Зависимость гуморального ответа от типа антирабической вакцины и используемого адьюванта / Н.П. Ситник, А.Г. Исрафилов, Л.Ф. Еникеева [и др.] // Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, производство и применение: матер. Всероссийской науч. конф. с международным участием. – Уфа, 2005. – Т.2. – С. 57–60.

217. Скрипченко, Г.С. Исторические и современные аспекты бешенства / Г.С. Скрипченко, А.И. Пономаренко, Т.М. Рыбакова [и др.] // Украинський медичний часопис. – 2003. – № 4 (36). – С. 61–68.

218. Сливко, И.А. Иммунологические свойства вакцинных штаммов ТС-80 и 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ вируса бешенства: автореф. дис. ... канд. ветер. наук: 16.00.03 / Сливко Игорь Александрович. – Покров, 2003. – 24 с.

219. Смирнова, Т.Д. Контаминация клеточных культур микоплазмами: методы обнаружения и возможные пути распространения микоплазма-инфекции / Т.Д. Смирнова, И.И. Фридлянская // Цитология. – 1985. – Т. 27, № 3. – С. 276–281.

220. Снегирева, И.И. Безопасность применения препаратов крови по данным пострегистрационного мониторинга / И.И. Снегирева, Б.К. Романов, Н.А. Озерецковский // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 5. – С. 146–151.

221. СП 1.3.2322-2008 Безопасность работы с микроорганизмами III и IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила. – М., 2008. – 20 с.

222. СП 3.3.2.3332-16 Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов. Санитарно-эпидемиологические правила. – М., 2016. – 19 с.

223. Стародубова, Е.С. Вакцины против бешенства: современное состояние и перспективы развития / Е.С. Стародубова, О.В. Преображенская, Ю.В. Кузьменко [и др.] // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, № 4. – С. 577–584.

224. Степанова, Л.А. Изучение содержания нейротоксинов в гипериммунной антирабической сыворотке и препаратах, полученных из нее / Л.А. Степанова, Л.Н. Ведищева // Научные основы производства гипериммунных сывороток. – Томск, 1979. – С. 27–29.

225. Сугобаева, Б.П. Выявление рабических антител с помощью РСК / Б.П. Сугобаева, Ж.С. Дадабаева, Т.С. Сайдулдин // Диагностика, лечение и профилактика инфекционных болезней животных Казахстана. – Алма-Ата, 1989. – С. 45–53.

226. Супотницкий, М.В. Препараты, полученные из крови человека и животных, в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности // М.В. Супотницкий, А.А. Елапов, И.В. Борисевич // Биопрепараты. – 2015. – № 3 (55). – С. 33–48.

227. Сухинин, В.Н. Применение метода дифференциальной сканирующей калориметрии для оптимизации процесса сублимационной сушки лекарственных препаратов / В.Н. Сухинин, С.Ю. Бидный, Ф.А. Конев // Применение лиофилизации в фармации: матер. семинара. – Рига, 1986. – С. 38–39.

228. Тарасов, А.В. Мембранные микрофильтры для удаления бактериальных эндотоксинов с целью получения апирогенной воды и водных растворов / А.В. Тарасов, А.Г. Ситников, В.В. Демидова, Е.С. Яворская // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2013. – № 5. – С. 110–111.

229. Тарасов, А.В. Валидация процесса стерилизующей фильтрации в производстве готовых лекарственных средств / А.В. Тарасов, С.А. Тарасова, С.В. Андреев [и др.] // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2013. – № 6. – С. 124–125.

230. Тарасова, С.А. Фильтрующие капсулы в производстве лекарственных препаратов / С.А. Тарасова // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2014. – № 6. – С. 44–45.

231. Тарасова, С.А. Микрофилтрационные полиамидные мембраны и фильтрующие элементы на их основе в процессах осветления и стерилизации жидких лекарственных форм / С.А. Тарасова, Ю.А. Федотов // В кн.: Производство лекарств по GMP. – М.: Медицинский бизнес, 2005. – С. 153–158.

232. Терентьев, М.А. Как выбирать мембранный фильтр для стерилизующей фильтрации / М.А. Терентьев // В кн.: Производство лекарств по GMP. – М.: Медицинский бизнес, 2005. – С. 138–142.
233. Терентьев, М.А. Мифы и грезы о стерилизующих фильтрах / М.А. Терентьев // Чистые помещения и технологические среды. – 2011. – № 2. – С. 38–41.
234. Тертон, М. Новые методы иммуноанализа / М. Тертон, Д.Р. Бангхем, К.А. Колкотт [и др.]; под общ. ред. У. Коллинза. – М.: Мир, 1991. – 280 с.
235. Тиллиб, С.В. «Верблюжьих антител» – эффективный инструмент для исследований, диагностики и терапии / С.В. Тиллиб // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45, № 1. – С. 77–85.
236. Тиллиб, С.В. Тримеризованное однодоменное антитело, специфически связывающееся с гликопротеином g вируса бешенства, нейтрализующее вирус бешенства / С.В. Тиллиб, Т.И. Иванова, Л.А. Васильев [и др.] // Патент № 2533802 РФ, МПК С07К16/10, А61К39/42; 20.11.2014.
237. Требования к перевиваемым линиям клеток, используемых для производства биологических препаратов // Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов: серия техн. докладов ВОЗ № 745. – М., 1998. – С. 85–98.
238. Троценко, Н.И. Практикум по ветеринарной вирусологии / Н.И. Троценко, Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская. – М.: Колос. – 2000. – 272 с.
239. Тучков, И.В. Нуклеотидная последовательность и филогенетический анализ G гликопротеина Российского фиксированного штамма «Москва 3253» вируса бешенства / И.В. Тучков, Я.М. Краснов, Ж.В. Матвеева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 4. – С. 73–75.
240. Тучков, И.В. ДНК-иммунизация против бешенства / И.В. Тучков, А.К. Никифоров // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – Вып. 104. – С. 74–77.
241. Урываев, Л.В. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами / Л.В. Урываев, К.С. Ионова, А.В. Дедова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2012. – № 5. – С. 15–21.
242. Федотов, А.Е. Основы GMP: производство лекарственных средств / А.Е. Федотов. – М.: АСИНКОМ, 2012. – 583 с.
243. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток / Р.Я. Фрешни // Практическое руководство. – М.: БИОНОМ. Лаборатория знаний. – 2010. – 714 с.

244. Фролова, А.В. Крупномасштабное культивирование вируса бешенства в культуре перевиваемых клеток / А.В. Фролова, Р.С. Шафеева // Роль иммунобиологических препаратов в современной медицине: матер. науч.-практ. конф. – Уфа, 1995. – Т.1. – С. 191–194.
245. ФС.3.3.1.0038.15 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади / В кн.: Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том 3. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. – С. 1126–1137.
246. ФС 42-3874-99 Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Фармакопейная статья. – М.: МЗ РФ, 2000. – 77 с.
247. Ханенко, О.Н. Клинико-эпидемиологические аспекты случаев бешенства в республике Беларусь / О.Н. Ханенко, А.Л. Лешкевич, Н.Д. Коломиец [и др.] // Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года: матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Саратов, 2016. – С. 256–258.
248. Хапчаев, Ю.Х. Разработка методов получения и культивирования первичных и перевиваемых культур клеток животных для производства вирусных вакцин: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.06 / Хапчаев Юсуф Хаджи-бекович. – М., 2003. – 180 с.
249. Цеденхуу, П. Культуральная инактивированная вакцина против бешенства из штаммов ВНИИЗЖ и ERA: дис. ... канд. ветер. наук: 16.00.03 / Цеденхуу Пуревхуу. – Владимир, 2005. – 131 с.
250. Цетлин, Е.М. Отработка оптимальной схемы учета результатов при применении иммуноферментной тест-системы для определения антигенной активности культуральной антирабической вакцины / Е.М. Цетлин, В.А. Волкова // Вопросы вирусологии. – 1996. – № 1. – С. 21–24.
251. Чернов, В.М. Микоплазменные контаминации клеточных культур: везикулярный трафик у бактерий и проблема контроля инфектогенов / В.М. Чернов, О.А. Чернова, Х.Т. Санчес-Вега [и др.] // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2014. – Т. 6, № 3 (22). – С. 43–54.
252. Чернов, С.М. Результаты использования прямого твердофазного иммуноферментного анализа для оценки специфической активности антирабических вакцин /

С.М. Чернов, Е.М. Цетлин, А.Д. Ботвинкин, Л.Н. Романова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1991. – № 5. – С. 30–33.

253. Чернышова, Е.В. Эпизоотическая ситуация по бешенству в России и анализ эффективности антирабической вакцинации среди домашних животных, вывозимых за границу / Е.В. Чернышова, Н.А. Назаров, А.Е. Метлин // Ветеринария сегодня. – 2013. – № 4. – С. 49–51.

254. Чуешов, В.И. Промышленная технология лекарств / В.И. Чуешов. – Харьков: НФАУ, 2002. – Т. 1. – 560 с.

255. Чупин, С.А. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008–2011 гг. / С.А. Чупин, Е.В. Чернышова, А.Е. Метлин // Вопросы вирусологии. – 2013. – № 4. – С. 44–49.

256. Шалаев, Е.Ю. Способ лиофильной сушки биопрепарата / Е.Ю. Шалаев, Ф. Франкс, Н.А. Вараксин, М.Ю. Рукавишников // Патент РФ № 2111426, МПК F26B5/06; 20.05.1998.

257. Шалунова, Н.В. Требования к клеточным культурам, используемым для производства и контроля качества иммунобиологических препаратов / Н.В. Шалунова, В.А. Меркулов, А.В. Комратов [и др.] // Ведомости НЦ ЭСМП. – 2013. – № 1. – С. 28–33.

258. Шарапова, Н.А. Конструирование диагностикума с использованием наночастиц золота для определения активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в дот-иммуноанализе: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06, 03.01.04 / Шарапова Наталия Анатольевна. – Саратов, 2013. – 22 с.

259. Шафеева, Р.С. Получение в эксперименте концентрированной очищенной культуральной антирабической вакцины на основе перевиваемых клеток Веро / Р.С. Шафеева, А.В. Фролова, М.Н. Муллагулова // В сб.: Роль иммунобиологических препаратов в современной медицине. – Уфа, 1995. – Т. 1. – С. 191–194.

260. Шафеева, Р.С. Использование РНГА для титрования сывороток доноров при получении антирабического иммуноглобулина из крови человека / Р.С. Шафеева, А.К. Шамсувалеева // В сб.: Роль иммунобиологических препаратов в современной медицине. – Уфа, 1995. – Т. 1. – С. 206–208.

261. Шах, Д.Х. Стандартные операционные процедуры в фармацевтическом производстве. Общие принципы / Д.Х. Шах. – М.: Автограф, 2007. – 456 с.
262. Шевцов, А.Н. Усовершенствование технологии получения сибиреязвенного протективного антигена / А.Н. Шевцов, Д.В. Боровский, И.В. Дармов [и др.] // Биотехнология. – 2009. – № 6. – С. 68–71.
263. Шестопапов, А.М. Бешенство и его распространение в мире / А.М. Шестопапов, М.И. Кисурина, К.Н. Груздев // Вопросы вирусологии. – 2001. – № 2. – С. 7–12.
264. Щелканов, М.Ю. Изоляция и секвенирование полноразмерного генома штамма вируса бешенства, выделенного от бурого медведя (*Ursus arctos*), напавшего на человека в Приморском крае (ноябрь 2014 г.) / М.Ю. Щелканов, А.А. Девяткин, В.Ю. Ананьев [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2016. – Т. 61, № 4. – С. 180–186.
265. Юрков, С.Г. Универсальная роллерная технология выращивания клеточных культур / С.Г. Юрков // Ветеринария. – 1995. – № 9. – С. 34–39.
266. Юрченко, Т.Н. Влияние криопротекторов на биологические системы / Т.Н. Юрченко, В.Ф. Козлова, Б.А. Скорняков [и др.]. – Киев: Наукова думка, 1989. – 239 с.
267. Яворская, Е.С. Современные направления в мембранной нанофильтрации биофармпрепаратов. Часть 2. Удаление бактериальных эндотоксинов, мембранная ионообменная и аффинная хроматография. Мембраны для контроля вирусов в воде / Е.С. Яворская // Мембраны. – 2007. – № 2 (34). – С. 34–41.
268. Ягудин, Т.А. Гуманизация антител против возбудителей чумы и бешенства: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.04 / Ягудин Тимур Анверович. – М., 2010. – 23 с.
269. Abdul-Fattah, A.M. Drying-induced variations in physico-chemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability (I): stability of a monoclonal antibody / A.M. Abdul-Fattah, V. Truong-Le, L. Yee [et al.] // J. Pharm Sci. – 2007. – Vol. 96, № 8. – P. 1983–2008.
270. Aikimbayev, A. Fighting rabies in Eastern Europe, the Middle East and Central Asia – experts call for a regional initiative for rabies elimination / A. Aikimbayev, D. Briggs, G. Coltan [et al.] // Zoonoses Public Health. – 2014. – Vol. 61, № 3. – P. 219–226.
271. Aiming for elimination of dog-mediated human rabies cases by 2030: News and Reports // Veterinary Record. – 2016. – Vol. 178. – P. 86–87.

272. Amann, R. A new rabies vaccine based on a recombinant ORF virus (parapoxvirus) expressing the rabies virus glycoprotein / R. Amann, J. Rohde, U. Wulle [et al.] // *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87, № 3. – P. 1618–1630.
273. Aracawa, T. Protein-solvent interactions in Pharmaceutical formulations / T. Aracawa, Y. Kita, J.F. Carpenter // *Pharm. Res.* – 1991. – Vol. 8. – P. 285–291.
274. Aracawa, T. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins / T. Aracawa, S. Prestrelski, W. Kinney, J. Carpenter // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 1993. – Vol. 10. – P. 1–28.
275. Ashraf, S. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice / S. Ashraf, P.K. Singh, D.K. Yadav [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 119. – P. 1–14.
276. Atanasiu, P. Purification partielle et concentration du virus rabique des rues, culture sur une souche de cellules clonales de rein de hamster / P. Atanasiu, P. Lepine, P. Dighe // *Comprend desseans.* – 1973. – Vol. 256. – P. 1415–1417.
277. Atanasiu, P. Nouveau vaccine antirabique humain de culture cellulaire primaire / P. Atanasiu, H. Tsiang, A. Gamet // *Ann. Microbiolology.* – 1974. – Vol. 125. – P. 419–432.
278. Ayatollahi, J. Severe Abdominal Pain as the First Manifestation of Rabies / J. Ayatollahi, M.R. Sharifi, S.H. Shahcheraghi // *Jundishapur J. Microbiol.* – 2014. – Vol. 7, № 8. – P. 11671.
279. Bakker, A.B. First administration to humans of a monoclonal antibody cocktail against rabies virus: safety, tolerability, and neutralizing activity / A.B. Bakker, C. Python, C.J. Kissling [et al.] // *Vaccine.* – 2008. – Vol. 26, № 47. – P. 5922–5927.
280. Banyard, A.C. Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat / A.C. Banyard, J.S. Evans, T.R. Luo, A.R. Fooks // *Viruses.* – 2014. – Vol. 6, № 8. – P. 2974–2990.
281. Banyard, A.C. Control and prevention of canine rabies: The need for building laboratory-based surveillance capacity / A.C. Banyard, D.L. Horton, C. Freuling [et al.] // *Anti-viral Research.* – 2013. – Vol. 98. – P. 357–364.
282. Barile, M.F. Mycoplasma-tissue cell interaction / M.F. Barile // In: *The Mycoplasmas*: edit. by J.G. Tully, R.F. Whitcomb. – New York: Acad. Press. – 1979. – Vol. 2. – P. 425–474.

283. Barrett, P. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines / P. Barrett, W. Mundt, O. Kistner [et al.] // *Expert. Rev. Vaccines*. – 2009. – Vol. 8. – P. 607–618.
284. Bates, J.A. Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres* / J.A. Bates, E.J. Taylor // *Molec. Plant Pathology*. – 2001. – Vol. 2. – P. 275–280.
285. Bedu-Addo, F.K. Understanding lyophilization formulation development / F.K. Bedu-Addo // *Pharmaceutical technology. – Lyophilization*. – 2004. – P. 10–18.
286. Benmansour, A. Antigenicity of rabies virus glycoprotein / A. Benmansour, H. Leblois, P. Coulon [et al.] // *J. Virol.* – 1991. – Vol. 65, № 8. – P. 4198–4203.
287. Bernard, P.S. Integrated amplification and detection of the C677T point mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves / P.S. Bernard, M.J. Lay, C.T. Wittwer // *Analytic. Biochemistry*. – 1998. – Vol. 255. – P. 101–107.
288. Berson, E. A self-feeding roller bottle for Continuous Cell Culture / E. Berson, G. Friederich // *Biotechnol. Prog.* – 2008. – Vol. 24. – P. 154–157.
289. Black, E.M. A rapid RT-PCR method to differentials six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology / E.M. Black, J.P. Lowings, J. Smith [et al.] // *J. Viral. Methods*. – 2002. – Vol. 105. – P. 25–35.
290. Bonnet, G. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes / G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber [et al.] // *Protoc. Natl. Acad Sci USA*, 1999. – Vol. 96. – P. 6171–6176.
291. Borchert, S.J. Accelerated extractable studies of borosilicate glass containers / S.J. Borchert, M.M. Ryan, R.L. Davison, W. Speed // *J. of Parenteral science and Technology*. – 1989. – Vol. 43, № 2. – P. 67–69.
292. Borson, N.D. Direct quantitation of RNA transcripts by competitive single-tube RT-PCR and capillary electrophoresis / N.D. Borson, M.A. Strausbauch, P.J. Wettstein [et al.] // *Biotechniques*. – 1998. – Vol. 25. – P. 130–137.
293. Both, L. Monoclonal antibodies for prophylactic and therapeutic use against viral infections / L. Both // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31, № 12. – P. 1553–1559.

294. Bourhy, H. The use of passive rabies immunotherapy: from the past to the future / H. Bourhy, L. Dacheux, F. Ribadeau-Dumas // *Biol. Aujourd'hui*. – 2010. – Vol. 204, № 1. – P. 71–80.

295. Braun, A. Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN- α) in normal and transgenic mice / A. Braun, L. Kwee, M.A. Labow, A. Alsens // *Pharm. Res.* – 1997. – Vol. 14, № 10. – P. 1472–1478.

296. Brookes, S. Rabies human diploid cell vaccine elicits cross-neutralising and cross-protecting immune responses against European and Australian bat lyssaviruses / S. Brookes, G. Parsons, N. Johnson [et al.] // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23. – P. 4101–4109.

297. Brosteaux, J. Etude sur la dessiccation des protéines / J. Brosteaux, I. Eriksson-Quensel // *Arch. Phys. Biol.* – 1935. – Vol. 12. – P. 209.

298. Bucciantini, M. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases / M. Bucciantini, E. Giannoni, F. Chiti [et al.] // *Nature*. – 2002. – Vol. 416. – P. 507–511.

299. Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay / S.A. Bustin // *J. Mol. Endocrinol.* – 2000. – Vol. 25. – P. 169–193.

300. Cao, W. Influence of process conditions on the crystallization and transition of metastable mannitol forms in protein formulations during lyophilization / W. Cao, Y. Xie, S. Krishnan [et al.] // *Pharmaceutical Research*. – 2013. – Vol. 30, № 1. – P. 131.

301. Carpenter, J.F. Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in frozen and dried state / J.F. Carpenter, J. Grove, T.W. Arakawa // *J. Dairy Sci.* – 1990. – Vol. 73. – P. 3627–3636.

302. Carpenter, J.F. Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice / J.F. Carpenter, M.J. Pical, B.S. Chang, T.W. Randolph // *Pharm. Res.* – 1997. – Vol. 14. – P. 969–975.

303. Choy, M.M. Comparison of the mosquito inoculation technique and quantitative real time polymerase chain reaction to measure dengue virus concentration / M.M. Choy, B.R. Ellis, E.M. Ellis, D.J. Gubler // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2013. – № 89 (5). – P. 1001–1005.

304. Cliquet, F. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats / F. Cliquet, L.M. McElhinney, A. Servat [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2004. – Vol. 117, № 1. – P. 1–8.
305. Coll, J.M. The glycoprotein G of rhabdoviruses / J.M. Coll // *Arch. Virol.* – 1995. – Vol. 140. – P. 827–851.
306. Consales, C.A. Rabies review: immunopathology, clinical aspects and treatment [Электронный ресурс] / C.A. Consales, V.L. Bolzan // *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* – 2007. – Vol. 13, № 1. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992007000100002>.
307. Consales, C.A. Cytopathic effect induced by rabies virus in McCoy cells / C.A. Consales, R.Z. Mendonca, N.M.F. Gallina, C.A. Pereira // *Journal of Virological Methods.* – 1990. – Vol. 27. – P. 277–286.
308. Consales, C.A. The preparation of cultured rabies virus and the production of anti-serum for human use / C.A. Consales, E.G. Valentini, A. Albas [et al.] // *J. of Biolog. Standardization.* – 1988. – Vol. 16. – P. 27–32.
309. Constantino, H. Aggregation of a lyophilized pharmaceutical protein, recombinant human albumin: effect of moisture and stabilization by excipients / H. Constantino, R. Langer, A. Klivanov // *Biotechnology.* – 1995. – Vol. 13, № 5. – P. 493–496.
310. Constantino, H. Heterogeneity of serum albumin samples with respect to solid-state aggregation via thiol-disulfide interchange-implications for sustained release from polymers / H. Constantino, L. Shieh, A. Klivanov, R. Langer // *J. Control. Release.* – 1997. – Vol. 44. – P. 255–261.
311. Costa, W. Immunogenicity and safety of a new Vero cell rabies vaccine produced using serum-free medium / W. Costa, R. Cunha, V. Bolzan [et al.] // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25. – P. 8140–8145.
312. Cox, J.H. Rabies Virus Glycoprotein. II. Biological and Serological Characterization / J.H. Cox, B. Dietzschold, L.G. Schneider // *Infection and immunity.* – 1977. – Vol. 16, № 3. – P. 754–759.
313. Crotts, G. Stability and release of bovine serum albumin encapsulated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles / G. Crotts, T. Park // *J. Control. Release.* – 1997. – Vol. 44. – P. 123–134.

314. Dato, V.M. Recurrent temporary paralysis reported after human rabies post-exposure prophylaxis / V.M. Dato, E.R. Campagnolo, D.U. Shah [et al.] // *Zoonoses Public Health*. – 2015. – Vol. 62, № 3. – P. 222–227.

315. De Benedictis, P. Development of broad-spectrum human monoclonal antibodies for rabies post-exposure prophylaxis / P. De Benedictis, A. Minola, E. Rota Nodari [et al.] // *EMBO Mol. Med.* – 2016. – Vol. 8, № 4. – P. 407–421.

316. Demeule, B. Where disease pathogenesis meets protein formulation: Renal deposition of immunoglobulin aggregates / B. Demeule, R. Gurny, T. Arvinte // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2006. – Vol. 62. – P. 1211–1230.

317. Didenko, V.V. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications / V.V. Didenko // *Biotechniques*. – 2001. – Vol. 31. – P. 1106–1121.

318. Dietzschold, B. Oligosaccharides of the glycoprotein of rabies virus / B. Dietzschold // *Journal of virology*. – 1977. – Vol. 23, № 2. – P. 286–293.

319. Dietzschold, B. Pathogenesis of rabies / B. Dietzschold, M. Schnell, H. Koprovski // *Curr. Top Microbiol. Immunology*. – 2005. – Vol. 292. – P. 45–56.

320. Dietzschold, M.L. In vitro growth and stability of recombinant rabies viruses designed for vaccination of wildlife / M.L. Dietzschold, M. Faber, J.A. Mattis [et al.] // *Vaccine*. – 2004. – Vol. 23, № 4. – P. 518–524.

321. Doerner, A. Therapeutic antibody engineering by high efficiency cell screening / A. Doerner, L. Rhiel, S. Zielonka, H. Kolmar // *FEBS Lett.* – 2014. – Vol. 588, № 2. – P. 278–287.

322. Duan, Y. A novel disulfide-stabilized single-chain variable antibody fragment against rabies virus G protein with enhanced in vivo neutralizing potency / Y. Duan, T.J. Gu, C.L. Jiang [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2012. – Vol. 51, № 2. – P. 188–196.

323. Enokibori, M. Anaphylactoid reaction to maltose 5 % solution during spinal anaesthesia / M. Enokibori, M. Kuge, K. Mori // *Canadian Journal of Anesthesia*. – 1998. – Vol. 45, № 1. – P. 52–55.

324. Ertl, H.C.J. Novel vaccines to human rabies / H.C.J. Ertl // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2009. – Vol. 3, № 9. – P. 515.

325. European Pharmacopoeia 8.0. – Council of Europe, Strasbourg, 2014. – 2133 p.

326. Faber, M. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity / M. Faber, M.L. Faber, A. Papaneri [et al.] // *J. Virol.* – 2005. – Vol. 79, № 22. – P. 14141–14148.

327. Fernandes, M. Mechanism of the cytopathic effect of rabies virus in tissue culture / M. Fernandes, T. Wiktor, H. Koprowski // *J. Virology.* – 1963. – № 21. – P. 128–130.

328. Ferraro, B. In a single shot, the design of efficient multivalent plasmids will be very beneficial for DNA-based vaccination against numerous diseases / B. Ferraro, M.P. Morrow, N.A. Hutnick // *Clin. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 53, № 3. – P. 296–302.

329. Feyssaguet, M. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIA RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vaccinated people / M. Feyssaguet, L. Dacheux, L. Audry [et al.] // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25, № 12. – P. 2244–2251.

330. Fooks, A.R. Current status of rabies and prospects for elimination / A.R. Fooks, A.C. Banyard, D.L. Horton [et al.] // *The Lancet.* – 2014. – Vol. 384, № 9951. – P. 1389–1399.

331. Franco, M. Polygenic control of antibody production and correlation with vaccine induced resistance to rabies virus in high and low antibody responder mice / M. Franco, S. Massa, R.C. Vassao [et al.] // *Arch. Virol.* – 1996. – Vol. 141, № 8. – P. 1397–1406.

332. Franka, R. Rabies virus pathogenesis in relationship to intervention with inactivated and attenuated rabies vaccines / R. Franka, X. Wu, F.R. Jackson [et al.] // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 27, № 51. – P. 7149–7155.

333. Franks, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles in to practice / F. Franks // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* – 1998. – Vol. 45. – P. 221–229.

334. Franks, F. Scientific and technological aspects of aqueous glasses / F. Franks // *Biophys. Chem.* – 2003. – Vol. 105, № 2–3. – P. 251–261.

335. Franks, F. Freeze-Drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals: Principles and Practice / F. Franks. – Royal Society of Chemistry, 2007. – 1 edit. – 218 p.

336. Frazzati-Gallina, N.M. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers / N.M. Frazzati-Gallina, R.L. Paoli, R.M. Mourão-Fuches [et al.] // *J. of biotechnology.* – 2001. – Vol. 92, № 1. – P. 67–72.

337. Fuenzalida, E. Suckling mouse brain vaccine / E. Fuenzalida // In: Laboratory Techniques in Rabies. Third. ed. – Geneva: WHO, 1973. – P. 216–221.
338. Gaudin, Y. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperons / Y. Gaudin // J. Virology. – 1997. – № 71. – P. 3742–3750.
339. Gautret, P. Rabies – an important zoonotic threat for travelers / P. Gautret // Travel Med. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 12. – P. 557–558.
340. Gautret, P. Animal-associated exposure to rabies virus among travelers, 1997–2012 / P. Gautret, K. Harvey, P. Pandey [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 21, № 4. – P. 569–577.
341. Gelosa, L. Serological determination of rabies antibodies in vaccinated subjects / L. Gelosa, G. Borroni // Microbiologica. – 1990. – Vol. 13, № 3. – P. 257–262.
342. Girard, L.S. Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco cell culture / L.S. Girard, M.J. Fabis, M. Bastin [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – Vol. 345, № 2. – P. 602–607.
343. Gispén, R. Suckling rabbit brain vaccine / R. Gispén // In: Laboratory Techniques in Rabies. Third. ed. – Geneva: WHO, 1973. – P. 221–228.
344. Glück, R. Purification techniques for heterologous rabies antiserum / R. Glück, D. Labert // In: Laboratory techniques in rabies. 4 th ed. – Geneva: WHO, 1996. – P. 405–410.
345. Gluska, S. Rabies Virus Hijacks and accelerates the p75^{NTR} retrograde axonal transport machinery / S. Gluska, E.E. Zahavi, M. Chein [et al.] // PLoS Pathog. – 2014. – Vol. 10, № 8. – P. 17.
346. Goel, S.K. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin / S.K. Goel, S. Sharma, U.S. Singh // Biologicals. – 2003. – Vol. 31, № 4. – P. 233–236.
347. Goudsmit, J. Comparison of an anti-rabies human monoclonal antibody combination with human polyclonal anti-rabies immune globulin / J. Goudsmit, W.E. Marissen, W.C. Weldon [et al.] // J. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 193, № 6. – P. 796–801.
348. Gozdas, H.T. Suspected rabid bites and postexposure rabies prophylaxis / H.T. Gozdas // Travel Medicine and Infectious Disease. – 2015. – Vol. 13, № 5. – P. 434.

349. Gozdas, H.T. The importance of rabies immunoglobulin in postexposure prophylaxis / H.T. Gozdas // *American Journal of Emergency Medicine*. – 2015. – Vol. 33, № 4. – P. 594.
350. Gozdas, H.T. Acute vestibulocochlear neuritis following postexposure rabies prophylaxis [Электронный ресурс] / H.T. Gozdas, A. Gokoglu // *J. Neurol. Sci.* – 2016. – Режим доступа: <http://www.pubfacts.com/detail/26853462/>.
351. Gozdas, H.T. Rabies prophylaxis for travellers / H.T. Gozdas // *The Netherlands Journal of Medicine*. – 2016. – Vol. 74, № 1. – P. 54.
352. Greiff, D. The effects on biological materials of freezing and drying by vacuum sublimation. 1. Development and testing of apparatus / D. Greiff, H. Pinkerton // *J. Exp. Med.* – 1954. – № 100 (1). – P. 81–88.
353. Griebenov, K. Lyophilization – induced reversibly changes in the secondary structure of proteins / K. Griebenov, A. Klibanov // *Pros. Natl. Sci. USA*. – 1995. – Vol. 92, № 24. – P. 10969–10976.
354. Hacibektaşoğlu, A. Comparison of PVRV and HDCV rabies vaccines as to immunity, reliability and protective value / A. Hacibektaşoğlu, A. Inal, C. Eyigün [et al.] // *Mikrobiyol. Bul.* – 1992. – Vol. 26, № 1. – P. 26–36.
355. Hageman, M.J. The role of moisture in protein stability / M.J. Hageman // *Drug Dev. Ind. Pharm.* – 1988. – Vol. 14. – P. 2047–2070.
356. Hageman, M. Water sorption and solid state stability of proteins. In: *Stability of protein pharmaceuticals. Part A. Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation* / M. Hageman, edit. by T. Ahern, M.C. Manning. – New York: Plenum Press. – 1992. – P. 273–309.
357. Hahn, R.G. Intravenous infusion of irrigating fluids containing glycine or mannitol with and without ethanol / R.G. Hahn, H.P. Stalberg, S.A. Gustafsson // *J. Urol.* – 1989. – Vol. 142. – P. 1102–1105.
358. Hansen-Schmidt, S. Osmotic, nephrosis due to high-dose immunoglobulin therapy containing sucrose (but not with glycine) in a patient with immunoglobulin A nephritis / S. Hansen-Schmidt, J. Silomon, F. Keller // *Am. J. Kidney. Dis.* – 1996. – Vol. 28, № 3. – P. 451–453.

359. Heaton, P.R. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses / P.R. Heaton, P. Johnstone, L.M. McElhinney [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35. – P. 2762–2766.

360. Higuchi, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences / R. Higuchi, G. Dollinger, P.S. Walsh [et al.] // *J. Biotechnology.* – 1992. – Vol. 10. – P. 413–417.

361. Higuchi, R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reaction / R. Higuchi, C. Focler, G. Dollinger [et al.] // *Biotechnology.* – 1993, № 9. – Vol. 11. – P. 1026–1030.

362. Hong, H. Methods for the purification of equine rabies immunoglobulin: effects on yield and biological activity / H. Hong, E. Rooijackers, N. Ke [et al.] // *Biologicals.* – 1994. – Vol. 22. – P. 1–6.

363. Hoskins, J.M. Duck-embryo vaccine / J.M. Hoskins // In: *Laboratory Techniques in Rabies*. Third ed. – Geneva: WHO, 1973. – P. 243–255.

364. Hua, T.-C. Freeze-drying of pharmaceutical and food products / T.-C. Hua, B.-L. Liu, H. Zhang. – Science Press, 2010. – 250 p.

365. Hurisa, B. Production of cell based antirabies vaccine in Ethiopia / B. Hurisa, A. Mengesha, B. Newayesilassie [et al.] // *Procedia in Vaccinology.* – 2013. – № 7. – P. 2–7.

366. Isachenko, V. New technology for vitrification and field (microscope-free) thawing and transfer of the small ruminant embryos. / V. Isachenko, J.L. Alabart, M. Dattena [et al.] // *Theriogenology.* – 2003. – Vol. 59, № 5–6. – P. 1209–1218.

367. Ishiguro, T. Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of fluorescent intercalator / T. Ishiguro, J. Saitoh, H. Yawata [et al.] // *Anal. Biochemistry.* – 1995. – Vol. 229. – P. 207–213.

368. Izutsu, K. Stabilization of protein structure in freeze-dried amorphous organic acid buffer salts / K. Izutsu, S. Kadoya, Ch. Yomota [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* – 2009. – Vol. 57, № 11. – P. 1231–1236.

369. Izutsu, K. The effects of additives on the stability of freeze-dried 3-galactosidase stored at elevated temperatures / K. Izutsu, S. Yoshioka, Y. Takeda // *Int. J. Pharm.* – 1991. – Vol. 71. – P. 137–146.

370. Jackson, A.C. Current and future approaches to the therapy of human rabies / A.C. Jackson // *Antiviral Research.* – 2013. – Vol. 99. – P. 61–67.

371. Jackson, A.C. Management of rabies in humans / A.C. Jackson, M.J. Warrell, C.E. Rupprecht [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2003. – Vol. 36, № 1. – P. 60–63.

372. Jagannathan, S. Analysis of alternative purification of beta-propiolactone inactivated, tangential flow filtration concentrated Vero cell derived rabies vaccine / S. Jagannathan, K.R. Mani, R. Vijayakumar // *Journal of vaccines & vaccination*. – 2015. – Vol. 6. – P. 1–6.

373. Jagannathan, S. Kinetics analysis of beta-propiolactone with tangential flow filtration (TFF) concentrated Vero cell derived rabies viral protein / S. Jagannathan, G.P. Rahul, R. Vijayakumar // *Journal of Biological Sciences*. – 2013. – Vol. 13. – P. 521–527.

374. Jaiaroensup, W. Safety and efficacy of purified Vero cell rabies vaccine given intramuscularly and intradermally. (Results of a prospective randomized trial) / W. Jaiaroensup, J. Lang, P. Thipkong [et al.] // *Vaccine*. – 1998. – Vol. 16, № 16. – P. 1559–1562.

375. Jain, R.S. Paralytic rabies or postvaccination myelitis: a diagnostic dilemma [Электронный ресурс] / R.S. Jain, P.K. Gupta, R. Handa // *American Journal of Emergency Medicine*. – 2015. – Vol. 33, № 4. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajem.2014.09.026>.

376. Jallet, C. Chimeric Lyssavirus Glycoproteins with Increased Immunological Potential / C. Jallet, Y. Jacob, C. Bachloul [et al.] // *J. Virology*. – 1999. – Vol. 73. – P. 225–233.

377. Jones, A. Colloidal Gold for the Detection of Proteins on Blots and Immunoblots / A. Jones, M. Moeremans // *Methods in Molecular Biology*. – 1988. – Vol. 3. – P. 441–479.

378. Joubert, M.K. Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates / M.K. Joubert, Q. Luo, Y. Nashed-Samuel [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 28. – P. 25118–25133.

379. Kaisheva, E.A. Stable lyophilized pharmaceutical formulation of IgG antibodies / E.A. Kaisheva, A. Flores-Nate, S. Gupta // Patent №7592004 US, A61K9/19, A61K39/395S, C07K16/28H, A61K9/00M5; 2003.

380. Kallel, H. A novel process for the purification of veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells grown on microcarriers in 20-l bioreactor / H. Kallel, S. Rourou, S. Majoul, H. Loukil // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 61. – P. 441–446.

381. Karliner, J.S. Incidence of reactions following administration of antirabies serum: a study of 526 cases / J.S. Karliner, G.S. Belaval // *Journal of the American Medical Association*. – 1965. – № 193. – P. 359–362.

382. Karlsen, F. SYBR I DNA staining increases the detection sensitivity of viruses by polymerase chain reaction / F. Karlsen, H.B. Steen, J.M. Nesland // *J. Virol. Methods.* – 1995. – Vol. 55. – P. 153–156.

383. Karrenberg, R. The dangers of fructose-sorbitol infusions / R. Karrenberg, H.D. Stober // *Anaesthesiol. Reanim.* – 1990. – Vol. 15, № 3. – P. 181–187.

384. Kelley, J. The glycoprotein of vesicular stomatitis virus is the antigen that given rise to and reacts with neutralizing antibody / J. Kelley, S. Emerson, R. Wanger // *J. Virology.* – 1972. – Vol. 10. – P. 1231–1235.

385. Kleppe, E. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases / E. Kleppe, E. Ohtsuka, R. Kleppe [et al.] // *J. Molec. Biology.* – 1971. – Vol. 56. – P. 341–361.

386. Koprovski, H. Vaccine for man prepared in humandiploid cells / H. Koprovski // In: *Laboratory Techniques in Rabies.* Third ed. – Geneva: WHO, 1973. – P. 256–261.

387. Korak, P. A recombinant rabies vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice / P. Korak, B. Bosch, M. Cox [et al.] // *Vaccine.* – 2014. – Vol. 32. – P. 4644–4650.

388. Kosinova, E. Real-time PCR for quantitation of bovine viral diarrhea virus RNA using SYBR Green I fluorimetry / E. Kosinova, I. Psikal, B. Robesova, K. Kovarcik // *Veterinari medicine.* – 2007. – Vol. 52, № 6. – P. 259–261.

389. Krasilnikov, I.V. Purification and concentration of rabies virus by chromatography on chemically modified porous silicates / I.V. Krasilnikov, T.A. Aksenova, B.V. Mchedlishvili // *Acta virol.* – 1981. – Vol. 25, № 4. – P. 205–212.

390. Kreilgaard, L. Effects of additives on the stability of recombinant human factor XIII during freeze-drying and storage in the dried solid / L. Kreilgaard, S. Frokjaer, J.M. Flink [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – Vol. 360, № 1. – P. 121–134.

391. Kumar, A. Purification, potency and immunogenicity analysis of Vero cell culture-derived rabies vaccine: a comparative study of single-step column chromatography and zonal centrifuge purification / A. Kumar, K. Mani, C. Palaniappan [et al.] // *Microbes Infect.* – 2005. – Vol. 7, № 9–10. – P. 1110–1116.

392. Kumar, R. A case report of post Rabipur (purified chick embryo rabies vaccine) acute disseminated encephalomyelitis / R. Kumar, A.K. Singh, R.N. Pradhan, V.K. Pathak // *J. Assoc. Physicians. India.* – 2015. – Vol. 63, № 1. – P. 56–58.

393. Lalosević, D. BHK-21 cell culture rabies vaccine: immunogenicity of a candidate vaccine for humans / D. Lalosević, V. Lalosević, L. Lazarević-Ivanc, I. Knezević // *Dev Biol (Basel)*. – 2008. – Vol. 131. – P. 421–429.

394. Lankester, F. Implementing Pasteur's vision for rabies elimination / F. Lankester, K. Hampson, T. Lembo [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 345, № 6204. – P. 1562–1564.

395. Lang, J. Evaluation of the safety, immunogenicity, and pharmacokinetic profile of a new, highly purified, heat-treated equine rabies immunoglobulin, administered either alone or in association with a purified, Vero-cell rabies vaccine / J. Lang, P. Attanath, B. Quiambao [et al.] // *Acta Trop*. – 1998. – Vol. 70, № 3. – P. 317–333.

396. Lay, M.J. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid – cycle PCR / M.J. Lay, C.T. Wittwer // *Clin. Chemistry*. – 1997. – Vol. 43. – P. 2262–2267.

397. Lepine, P. Fermi-type vaccine / P. Lepine // In: *Laboratory Techniques in Rabies* Third ed. – Geneva: WHO, 1973. – P. 199–201.

398. Lester, L.R. Should adding albumin to parenteral nutrient solutions be considered an unsafe practice / L.R. Lester, C.M. Crill, E.B. Hak // *Am. J. Health. Syst. Pharm.* – 2006. – Vol. 63, № 17. – P. 1656–1661.

399. Li, S. Effects of reducing sugars on the chemical stability of human relaxin in the lyophilized state / S. Li, T.W. Patapoff, D. Overcashier [et al.] // *J. Pharm. Sci.* – 1996. – Vol. 85. – P. 873–877.

400. Li, Z. A novel variable antibody fragment dimerized by leucine zippers with enhanced neutralizing potency against rabies virus G protein compared to its corresponding single-chain variable antibody [Электронный ресурс] / Z. Li, Y. Cheng, H. Xi [et al.] // *Molecular Immunology*. – 2015. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.06.027>.

401. Lin, L.-F.H. Overcoming challenges in the reconstitution of a high-concentration protein drug product / L.-F.H. Lin, R. Bunnell // *BioPharm International*. – 2013. – Vol. 26, № 3. – P. 28.

402. Liu, W. Moisture-induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state / W. Liu, R. Langer, A. Klibanov // *Biotech. Bioeng.* – 1991. – Vol. 37. – P. 177–184.

403. Liu, X. Rabbit anti-rabies immunoglobulins production and evaluation / X. Liu, Q. Liu, X. Feng [et al.] // *Trop. Biomed.* – 2011. – Vol. 28, № 1. – P. 138–148.

404. Liu, X. A recombinant rabies virus encoding two copies of the glycoprotein gene confers protection in dogs against a virulent challenge / X. Liu, Q.Y. Yang, Z. Sun [et al.] // PLOS One. – 2014. – Vol. 9, № 2. – P. 87105.

405. Loza-Rubio, E. Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein / E. Loza-Rubio, E. Rojas-Anaya, J. López [et al.] // Vaccine. – 2012. – Vol. 30, № 37. – P. 5551–5556.

406. Luekrajan, T. Production of antirabies serum of equine origin / T. Luekrajan, J. Wangsai, P. Phanuphak // In: Laboratory techniques in rabies. 4 th ed. – Geneva: WHO, 1996. – P. 401–404.

407. Luo, Q. Chemical modifications in therapeutic protein aggregates generated under different stress conditions / Q. Luo, M.K. Joubert, R. Stevenson [et al.] // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286, № 28. – P. 25134–25144.

408. Lvov, D.K. Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology / D.K. Lvov, M.Yu. Shchelkanov, S.V. Alkhovsky, P.G. Deryabin. – Elsevier Science Publishing, 2015. – 440 p.

409. Mackenzie, A.P. Basic principles of freeze-drying for pharmaceuticals / A.P. Mackenzie // Bull. Parenter. Drug Assoc. – 1966. – Vol. 20. – P. 101–130.

410. Mackenzie, A.P. The physico-chemical basis for the freeze-drying process / A.P. Mackenzie // Develop. Biol. Standard. – 1977. – Vol. 36. – P. 51–68.

411. Madhusudana, S. Economical multi-site intradermal regimen with purified chick embryo cell vaccine (Rabipur) prevents rabies in people bitten by confirmed rabid animals / S. Madhusudana, N. Anand, R. Shamsundar // Int. J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 6. – P. 210–214.

412. Madhusudana, S. Feasibility of reducing rabies immunoglobulin dosage for passive immunization against rabies. Results of in vitro and in vivo studies / S. Madhusudana, B. Ashwin, S. Sudarshan // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2013. – Vol. 9, № 9. – P. 1914–1917.

413. Madhusudana, S. Comparison of safety and immunogenicity of purified chick embryo cell rabies vaccine (PCECV) and purified Vero cell rabies vaccine (PVRV) using the Thai Red Cross intradermal regimen at a dose of 0.1 ml / S. Madhusudana, T. Sanjay, B. Mahendra [et al.] // Hum. Vaccin. – 2006. – Vol. 2. – P. 200–204.

414. Maltesen, M.J. Drying methods for protein pharmaceuticals / M.J. Maltesen, M. van de Weert // *Drug Discovery Today: Technologies*. – 2008. – Vol. 5, № 2–3. – P. 81–88.

415. Marras, S.A. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes / S.A. Marras, F.R. Kramer, S. Tyagi // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – P. 122.

416. Matsumoto, T. Whole-genome analysis of a human rabies virus from Sri Lanka / T. Matsumoto, A. Nishizono, K. Ahmed [et al.] // *Archives of Virology*. – 2011. – Vol. 156, № 4. – P. 659–669.

417. Mayberry, J. The New Scope of Pharmaceutical Lyophilization / J. Mayberry // *Pharmaceutical Processing*. – 2012. – Vol. 27, № 6. – P. 36–37.

418. McGarvey, P.B. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes / P.B. McGarvey, J. Hammond, M.M. Dienelt [et al.] // *Biotechnology (N Y)*. – 1995. – Vol. 13. – P. 1484–1487.

419. Mendonça, R.Z. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell cultures using a microcarrier system / R.Z. Mendonça, L.M. Ioshimoto, R.M.Z. Mendonça [et al.] // *Bra. J. Med. Biol. Res.* – 1993. – Vol. 26, № 12. – P. 1305–1319.

420. Menezes, R. Rabies in India / R. Menezes // *CMAJ*. – 2008. – Vol. 178, № 5. – P. 564–566.

421. Meng, S. Evolutionary dynamics of rabies viruses highlights the importance of China rabies transmission in Asia / S. Meng, G. Xu, J. Wu [et al.] // *Virology*. – 2011. – Vol. 410, № 2. – P. 403–409.

422. Meredith, P. Freeze-drying: in situ observations using cryoenviromental scanning electron microscopy and differential scanning calorimetry / P. Meredith, A.M. Donald, R.S. Payne // *J. Pharm. Sci.* – 1996. – Vol. 85. – P. 631–637.

423. Meslin, F.X. Laboratory techniques in rabies / edited by F.X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski. – 4 th ed. – Geneva: WHO, 1996. – 469 p.

424. Mesquita, E.C. Acute bilateral vestibulocochlear neuritis following cultured cell vaccine administration for rabies post-exposure prophylaxis / E.C. Mesquita, C. Rouanet, G.L. Lucas [et al.] // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2015. – Vol. 359, № 1–2. – P. 84–85.

425. Mhalda, M.M. Using Molecular Beacons to Detect Single-Nucleotide Polymorphisms with Real-Time PCR / M.M. Mhalda, L. Malmberg // *Methods*. – 2001. – Vol. 25. – P. 463–471.

426. Mikhailovsky, E.M. Concentration of rabies virus by polyethylene glycol / E.M. Mikhailovsky, H. Tsiang, P. Atanasiu // *Ann. Inst. Pasteur*. – 1971. – Vol. 121. – P. 563–568.

427. Modelska, A. Immunization against rabies with plant-derived antigen / A. Modelska, B. Dietzschold, N. Sleysh // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – Vol. 95, № 5. – P. 2481–2485.

428. Moore, S.M. Rabies-specific antibodies: measuring surrogates of protection against a fatal disease / S.M. Moore, C.A. Hanlon // *PLoS Negl. Trop. Dis*. – 2010. – Vol. 4, № 2. – P. 595.

429. Morrison, T.B. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification / T.B. Morrison, J.J. Weis, C.T. Wittwer // *Biotechniques*. – 1998. – Vol. 24. – P. 954–962.

430. Motoi, Y. Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli* / Y. Motoi, K. Sato, H. Hatta [et al.] // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23, № 23. – P. 3026–3032.

431. Muller, R.H. Application of ion exchange resins to the purification of certain viruses / R.H. Muller // *Proc. Soc. Exp. Biol. Medicine*. – 1950. – Vol. 73. – P. 239–241.

432. Müller, T.F. Spatio-temporal use of oral rabies vaccines in fox rabies elimination programmes in Europe / T.F. Müller, T.C. Mettenleiter, C.M. Freuling [et al.] // *PLoS Negl. Trop. Dis*. – 2015. – Vol. 9, № 8. – P. 34.

433. Nagarajan, T. Monoclonal antibodies for the prevention of rabies: theory and clinical practice / T. Nagarajan, W. Marissin, C. Rupprecht // *Antibody Technology Journal*. – 2014. – Vol. 4. – P. 1–12.

434. Nagarajan, T. A simple immuno-capture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture / T. Nagarajan, G.S. Reddy, B. Mohana [et al.] // *Biologicals*. – 2006. – Vol. 34, № 1. – P. 21–27.

435. Nail, S.L. Freeze-drying: principles and practice / S.L. Nail, L.A. Gatin // *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker publisher. – New York. – 1992. – Vol. 2. – P. 163–233.

436. Nandi, S. Global perspective of rabies and rabies related viruses: a comprehensive review / S. Nandi, M. Kumar // *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. – 2011. – Vol. 6, № 2. – P. 101–116.
437. Neumayr, A. When horse serum meets dog bite / A. Neumayr, J. Blum // *ID Cases*. – 2016. – № 3. – P. 1–2.
438. Nezlin, R. Interactions between immunoglobulin G molecules / R. Nezlin // *Immunol. Lett.* – 2010. – Vol. 132. – P. 1–5.
439. Nikolai, T.J. Cultivation of mammalian cells on macroporous microcarriers / T.J. Nikolai, W.-S. Hu // *Enzyme Microb. Technol.* – 1992. – Vol. 14. – P. 203–208.
440. Nireesha, G.R. Liophilization / freeze drying – an review / G.R. Nireesha, L. Divya, C. Sowmya [et al.] // *International journal of novel trends in pharmaceutical sci.* – 2013. – Vol. 3, № 4. – P. 87–98.
441. Nishida, M. Liophilized native gamma globulin preparation for intravenous administration / M. Nishida, S. Yabushita, S. Fajita, T. Saki // *Patent 4168303 US, A61K 37/06*; 1979.
442. Nor, Y.A. The growth study of Vero cells in different type of microcarrier / Y.A. Nor, N.H. Sulong, M. Mel [et al.] // *Materials Sciences and Applications*. – 2010. – Vol. 1, № 5. – P. 261–266.
443. Ogura, M. Use of fluorescent dye YOYO-1 to quantify oligonucleotides immobilized on plastic plates / M. Ogura, C. Keller, K. Koo [et al.] // *Biotechniques*. – 1994. – Vol. 16. – P. 1032–1034.
444. Ondrejškova, A. Comparison of the detection and quantification of rabies antibodies in canine sera / A. Ondrejškova, J. Suli, R. Ondrejškova [et al.] // *Original Paper Vet. Med.* – 2002. – № 8. – P. 218–221.
445. Osinubi, M.O. Enhancing comparative rabies DNA vaccine effectiveness through glycoprotein gene modifications / M.O. Osinubi, X.Wu, R. Franka [et al.] // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27, № 51. – P. 7214–7218.
446. Owens, O. A new method for cultivation of mammalian cells suspended in agitated fluid medium / O. Owens, G.O. Gey, M.K. Gey // *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* – 1953. – Vol. 1. – P. 41.
447. Ozkan, O. Production of heterolog anti-rabies immune sera / O. Ozkan, O. Aylan, C. Ates, B. Celebi // *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. – 2004. – № 15. – P. 49–54.

448. Paldurai, A. Growth kinetics of rabies virus in BHK-21 cells using fluorescent activated cell sorter (FACS) analysis and a monoclonal antibody based cell – ELISA / A. Paldurai, R.P. Singh, P.K. Gupta // *Immunol. Vacc. Technol.* – 2014. – Vol. 1, № 1. – P. 1–9.

449. Pant, G.R. Characterization of rabies virus from a human case in Nepal / G.R. Pant, M. Dahal, J.N. Rai [et al.] // *Archives of Virology.* – 2011. – Vol. 156, № 4. – P. 681–684.

450. Patra, M. Differential scanning calorimetry (DSC) an essential and critical instrument in optimizing liophilization process / M. Patra, P.K. Acharya, S. Seth, M. Shadangi // *Pharmaceutical Science.* – 2013. – Vol. 3. – P. 11–19.

451. Peirson, S.N. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis / S.N. Peirson, J.N. Butler, R.G. Foster // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – Vol. 31. – P. 73.

452. Perez, O. Production methods for rabies vaccine / O. Perez, C. Paolazzi // *J. of indust. microbiology & biotechnology.* – 1997. – Vol. 18. – P. 340–347.

453. Pical-Cleland, K.A. Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric β -galactosidase / K.A. Pical-Cleland, N. Rodriguez-Hornedo, G.L. Amidon, J.F. Carpenter // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – Vol. 384. – P. 398–406.

454. Pikal, M.J. Freeze-drying of proteins. Part I: process design / M.J. Pikal // *Bio Pharm.* – 1990. – Vol. 3. – P. 18–28.

455. Pikal, M.J. Formulation and stability of freeze-dried proteins: effects of moisture and oxygen on the stability of freeze-dried formulations of human growth hormone / M.J. Pikal, K.M. Dellerman, M.L. Roy // *Develop. Bio. Standard.* – 1991. – Vol. 74. – P. 21–38.

456. Pikal, M.J. Intravial distribution of moisture during the secondary drying stage of freeze drying / M.J. Pikal, S. Shah // *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* – 1997. – Vol. 51, № 1. – P. 17–24.

457. Pikal, M.J. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure / M.J. Pikal, S. Shah, M.L. Roy, R. Putman // *Int. J. Pharm.* – 1990. – Vol. 60. – P. 203–217.

458. Piyasirisilp, S. B-cell responses to myelin basic protein and its epitopes in autoimmune encephalomyelitis induced by Semple rabies vaccine / S. Piyasirisilp, T. Hemachudha, D.E. Griffin // *J. Neuroimmunol.* – 1999. – Vol. 98, № 2. – P. 96–104.

459. Piza, A.S. An ELISA suitable for the detection of rabies virus antibodies in serum samples from human vaccinated with either cell-culture vaccine or suckling-mouse-brain-vaccine / A.S. Piza, J.L. Santos, L.B. Chaves, C.R. Zanetti // *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* – Vol. 41, № 1. – 1999. – P. 39–43.

460. Prehaud, C. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors / C. Prehaud, K. Takehara, A. Flamand, D.H. Bishop // *Virology.* – 1989. – Vol. 173. – P. 390–399.

461. Prem Kumar, A.A. Purification, potency and immunogenicity analysis of Vero cell culture-derived rabies vaccine: a comparative study of single-step column chromatography and zonal centrifuge purification / A.A. Prem Kumar, K.R. Mani, C. Palaniappan [et al.] // *Microbes Infect.* – 2005. – Vol. 7, № 9–10. – P. 1110–1116.

462. Quiambao, B.P. Rabies post-exposure prophylaxis in the Philippines: health status of patients having received purified equine F(ab')₍₂₎ fragment rabies immunoglobulin (Favirab) / B.P. Quiambao, H.Z. Dytioco, R.M. Dizon [et al.] // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2008. – Vol. 28, № 2 (5). – P. 243.

463. Quiambao, B.P. Immunogenicity and effectiveness of post-exposure rabies prophylaxis with a new chromatographically purified Vero-cell rabies vaccine (CPRV): a two-stage randomised clinical trial in the Philippines / B.P. Quiambao, J. Lang, S. Vital [et al.] // *Acta Trop.* – 2000. – Vol. 75, № 1. – P. 39–52.

464. Radonic, A. Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Cameplox virus and Cytomegalovirus infections / A. Radonic, S. Thulke, H. Bae [et al.] // *Virology Journal.* – 2005. – № 2. – P. 2–7.

465. Ray, K. Selection of single chain variable fragments (scFv) against the glycoprotein antigen of the rabies virus from a human synthetic scFv phage display library and their fusion with the Fc region of human IgG1 / K. Ray, M.J. Embleton, B.L. Jaiikhani [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 2001. – Vol. 125, № 1. – P. 94–101.

466. Rayn, M. Adverse effects of intravenous immunoglobulin therapy / M.E. Rayn, M.L. Webster, J.D. Statler // *Clin. Pediatr.* – 1996. – Vol. 35. – P. 23–31.

467. Redwan, E.-R. Ovine anti-rabies antibody production and evaluation / E.-R. Redwan, A. Fahmy, A.E. Hanafy [et al.] // *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 32. – P. 9–19.

468. Reid, D.S. Nature of aqueous sugar solutions at low temperatures / D.S. Reid, R.B. Hemming // *Criobiol.* – 1977. – Vol. 14, № 6. – P. 707–716.
469. Rey, L.R. Thermal analysis of eutectics in freezing solutions / L.R. Rey // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 1960. – Vol. 85. – P. 513–534.
470. Rey, L.R. Fundamental aspects of lyophilization. In: *Research and Development in Freeze-Drying* / L.R. Rey. – Hermann, Paris, 1964. – P. 24–47.
471. Rey, L.R. *Freezedrying/lyophilization of pharmaceuticals and biological products* / L.R. Rey, J.C. May. – New York. – 1999. – 541 p.
472. Ririe, K.M. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction / K.M. Ririe, R.P. Rasmussen, C.T. Wittwer // *Anal. Biochemistry.* – 1997. – Vol. 245. – P. 154–160.
473. Robardet, E. Rabies in the Baltic states: decoding a process of control and elimination / E. Robardet, E. Picard-Meyer, M. Dobroštana [et al.] // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2016. – Vol.10, № 2. – P. 4432.
474. Roth, C. Novel micro-balance technique for measuring drying-rate during freeze-drying / C. Roth, G. Winter, G. Lee // *Prog. 3rd World Meeting APV/APGI, Berlin, 3/6 April.* – 2000. – P. 19–20.
475. Rourou, S. A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions / S. Rourou, A. van der Ark, T. van der Velden [et al.] // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25. – P. 3879–3889.
476. Rupprecht, C.E. Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus / C.E. Rupprecht, L. Blass, K. Smith [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 345, №8. – P. 582–586.
477. Sánchez, C.A. Disease risk perception and safety practices: a survey of Australian flying fox rehabilitators / C.A. Sánchez, M.L. Baker // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2016. – Vol. 10, № 2. – P. 4411.
478. Sarciaux, J.M. Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying / J.M. Sarciaux, S. Mansour, M.J. Hageman, S.L. Nail // *J. Pharm. Sci.* – 1999. – Vol. 88. – P. 1354–1361.
479. Sari, T. Adverse events following rabies post-exposure prophylaxis: A comparative study of two different schedules and two vaccines / T. Sari, N. Tulek, C. Bulut [et al.] // *Travel Medicine and Infectious Disease.* – 2014. – Vol. 12. – P. 659–666.

480. Sato, G. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil / G. Sato, T. Itou, Y. Shoji [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2004. – Vol. 66. – P. 747–753.
481. Sato, G. Rapid discrimination of rabies viruses isolated from various host species in Brazil by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction / G. Sato, H. Tanabe, Y. Shoji [et al.] // *J. Clin. Virology.* – 2005. – Vol. 33, № 4. – P. 267–273.
482. Sato, S. Trehalose can be used as a parenteral saccharide source in rabbits / S. Sato, K. Okamoto, R. Minami [et al.] // *J. Nutr.* – 1999. – Vol. 129. – P. 158–164.
483. Sawai, Y. The purification of rabies virus using ion-exchange resins / Y. Sawai, H. Yanaka, M.A. Makino [et al.] // *J. Bacteriology.* – 1974. – Vol. 9. – P. 509–512.
484. Schneider, L.G. Purification of rabies virus from tissue culture / L.G. Schneider, M. Horzinek, M.J. Schnell // *Infectious rabies viruses from cloned cDNA* // *EMBO J.* – 1994. – Vol. 13, № 18. – P. 4195–4203.
485. Schutten, M. Development of real-time quantitative RT-PCR for the detection of HIV-2 RNA in plasma / M. Schutten, B. van den Hoogen, M.E. van der Ende [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2000. – Vol. 88. – P. 81–87.
486. Schwendeman, S.P. In controlled drug delivery / S.P. Schwendeman, H.R. Costantino, R.K. Gupta, R. Langer // *American Chemical Society.* – Washington. – 1997. – P. 229–267.
487. Sedlacek, H.H. The biological properties of immunoglobulin G and its split products [F(ab')₂ and Fab] / H.H. Sedlacek, P. Gronski, T. Hofstaetter [et al.] // *Klin. Wochenschr.* – 1983. – Vol. 61. – P. 723–736.
488. Seligman, E.B. Semple type vaccine / E.B. Seligman // *In: Laboratory Techniques in Rabies.* Third. ed. Ed. by M. M. Kaplan, H. Koprowski. Monogr, Ser. № 23. – Geneva: WHO. – 1973. – P. 192–199.
489. Selimov, M.A. Efficacite de l'administration combinee de gamma-globulin de serum immune de cheval et de vaccin antirabiques chez des loups enrages / M.A. Selimov // *Extrait de «La Revue de Medicine».* – 1975. – № 10–11. – P. 723–730.
490. Selimov, M.A. Tissue culture antirabic vaccine for human use / M.A. Selimov, T.A. Aksyonova // *Sympos. Ser. Immunobiol. Standard.* – 1966. – Vol. 1. – P. 377–381.
491. Shankar, B.P. Advances in Diagnosis of Rabies / B.P. Shankar // *Veterinary World.* – 2009. – Vol. 2, № 2. – P. 74–78.

492. Sharma, S.K. Endotoxin detection and elimination in biotechnology / S.K. Sharma // *Biotechnol. appl. Biochem.* – 1986. – Vol. 8, № 1. – P. 5–22.
493. Shiota, S. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies / S. Shiota, K. Mannen, T. Matsumoto [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2009. – Vol. 161, № 1. – P. 58–62.
494. Shu, L. Completely humanized neutralizing antibody for anti-rabies viruses / L. Shu, Y. Xiaoling, W. Yueming, L. Huaxin // Patent 2013107039 CN; 01.08.2013.
495. Siew, A. Freeze drying protein formulations / A. Siew // *Pharmaceutical Technology.* – 2014. – Vol. 38, № 5. – P. 20.
496. Silva, A. Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petis ruminants vaccine / A. Silva, I. Deldago, M. Sousa [et al.] // *Vaccine.* – 2008. – № 2. – P. 3305–3311.
497. Siontorou, C.G. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy / C.G. Siontorou // *Int. J. Nanomedicine.* – 2013. – № 8. – P. 4215–4227.
498. Smith, J.S. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody / J.S. Smith, P.A. Yager, G.M. Baer // In: *Laboratory techniques in rabies: 4 th ed.* – Geneva, 1996. – P. 181–191.
499. Socol, F. Biochemical of viral vaccines / F. Socol // In: *Recent Advances in Microbiology X international Congress for Microbiology: edit. by A. Perez-Miravete, D. Pelaez.* – Mexico, 1981. – P. 551–562.
500. Socol, F. Purification of rabies virus grown in tissue culture / F. Socol, H.D. Schumberger, P.J. Wictor [et al.] // *J. Virology.* – 1978. – Vol. 2. – P. 836.
501. Socol, F. Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus / F. Socol, H.D. Schumberger, P.J. Wictor [et al.] // *J. Virology.* – 1979. – Vol. 38. – P. 651–665.
502. Sola-Penna, M. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars / M. Sola-Penna, J. Meyer-Fernandes // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – Vol. 360, № 1. – P. 10–14.
503. Solinas, A. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications / A. Solinas, L.J. Brown, C. McKeen [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – P. 96.
504. Srinivasan, K. Enhanced detection of PCR products through use of TOTO and YOYO intercalating dyes with laser included fluorescence–capillary electrophoresis / K. Srinivasan

vasan, S.C. Morris, J.E. Girard [et al.] // *Appl. Theor. Electrophor.* – 1993. – Vol. 3. – P. 235–239.

505. Stahl, J.-P. Update on human rabies in a dog- and fox-rabies-free country / J.-P. Stahl, P. Gautret, F. Ribadeau-Dumas [et al.] // *Médecine et maladies infectieuses.* – 2014. – Vol. 44. – P. 292–301.

506. Stahman, M.A. Thermal properties of human IgG / M.A. Stahman, A.K. Spenser, E. Rosenqvist [et al.] // *Molecul. Immunol.* – 1987. – Vol. 24, № 5. – P. 495–501.

507. Stantic-Pavlinic, M. Vaccination against rabies and protective antibodies – comparison of ELISA and fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) assays / M. Stantic-Pavlinic, S. Hostnik, S. Levicnik-Stežinar [et al.] // *Vet. Arhiv.* – 2006. – Vol. 76, № 4. – P. 281–289.

508. Sudarshan, M.K. An immunogenicity, safety and post-marketing surveillance of a novel adsorbed human diploid cell rabies vaccine (Rabivax) in Indian subjects / M.K. Sudarshan, S. Bhardwaj, B.J. Mahendra [et al.] // *Human vaccines.* – Vol. 4, № 4. – P. 275–279.

509. Sugiyama, M. Control of rabies: epidemiology of rabies in Asia and development of new-generation vaccines for rabies / M. Sugiyama, N. Ito // *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases.* – 2007. – Vol. 30, № 5–6. – P. 273–286.

510. Tagawa, A. Studies on purification of rabies virus. Application of methanol precipitation and two other methods / A. Tagawa, W. Ozawa, A. Kondo // *Yokohama Med. Bull.* – 1973. – Vol. 4. – P. 78–86.

511. Tanaka, R. Cryoprotective effect of saccharides on denaturation of catalase by freeze-drying / R. Tanaka, T. Takeda, K. Miyajima // *Chem. Pharm.* – 1991. – Vol. 399, № 5. – P. 1091–1094.

512. Tang, X.C. Freeze-drying process design by manometric temperature measurement: design of a smart freeze-dryer / X.C. Tang, S.L. Nail, M.J. Pikal // *Pharm. Res.* – 2005. – Vol. 21, № 4. – P. 685–700.

513. Tang, X.C. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice / X.C. Tang, M.J. Pikal // *Pharm. Res.* – 2004. – Vol. 2. – P. 191–200.

514. Tao, L. Generation of a recombinant rabies Flury LEP virus carrying an additional G gene creates an improved seed virus for inactivated vaccine production / L. Tao, J. Ge, X. Wang [et al.] // *Virol. J.* – 2011. – Vol. 8. – P. 454.

515. Tenzin. Review of rabies epidemiology and control in South, South East and East Asia: past, present and prospects for elimination / Tenzin, M.P. Ward // *Zoonoses Public Health*. – 2012. – Vol. 59, № 7. – P. 451–467.

516. Tesoro Cruz, E. Efficient post-exposure prophylaxis against rabies by applying a four-dose DNA vaccine intranasally / E. Tesoro Cruz, I.A. Feria Romero, J.G. Lopez Mendoza [et al.] // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – P. 6936–6944.

517. Theakston, R.D. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms / R.D. Theakston, D.A. Warrell, E. Griffiths // *Toxicon*. – 2003. – Vol. 41, № 5. – P. 541–557.

518. Thelwell, N. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection / N. Thelwell, S. Millington, A. Solinas [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28. – P. 3752–3761.

519. Tichopad, A. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up / A. Tichopad, M. Dilger, G. Schwarz, M.W. Pfaffl // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – Vol. 31, № 20. – P. 122.

520. Tichopad, A. Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer – linked amplification efficiency / A. Tichopad, A. Dzidic, M.W. Pfaffl // *Biotechnol. Lett.* – 2002. – Vol. 24. – P. 2053–2056.

521. Tomono, T. A new intact immunoglobulin for intravenous use stabilized by chemically modified derivatives / T. Tomono, K. Ikeda, T. Suzuki // *Vox Sang.* – 1986. – № 51. – P. 81–86.

522. Tordo, N. Canine adenovirus based rabies vaccines / N. Tordo, A. Fournier, C. Jallet [et al.] // *Dev. Biol.* – 2008. – Vol. 131. – P. 467–476.

523. Tordo, N. The rabies virus genome: an overview / N. Tordo, A. Kouknetroff // *J. Vet. Res.* – 1993. – Vol. 60. – P. 263–269.

524. Tordo, N. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? / N. Tordo, O. Poch, A. Ermine [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – Vol. 83. – P. 3914–3918.

525. Touihri, L. Design of different strategies of multivalent DNA-based vaccination against rabies and canine distemper in mice and dogs / L. Touihri, S.B. Ahmed, Y. Chtourou // *Virol. J.* – 2012. – Vol. 9. – P. 319.

526. Trabelsi, K. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor / K. Trabelsi, S. Rourou, H. Loukil [et al.] // *J. Biotechnology*. – 2006. – Vol. 121. – P. 261–271.

527. Turki, I. Engineering of a recombinant trivalent single-chain variable fragment antibody directed against rabies virus glycoprotein G with improved neutralizing potency / I. Turki, A. Hammami, H. Kharmachi, M. Mousli // *Mol. Immunol.* – 2014. – № 57 (2). – P. 66–73.

528. Tyagi, S. Multicolor molecular beacons for allele discrimination / S. Tyagi, D.P. Bratu, F.R. Kramer // *Nat. Biotechnology*. – 1998. – Vol. 16. – P. 49–53.

529. Tyagi, S. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization / S. Tyagi, F.R. Kramer // *Nat. Biotechnology*. – 1996. – Vol. 14. – P. 303–308.

530. Ullas, P.T. Rabies DNA vaccines: current status and future / P.T. Ullas, A. Desai, S.N. Madhusudana // *World Journal of Vaccines*. – 2012. – Vol. 2. – P. 36–45.

531. VanGuilder, H.D. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis / H.D. VanGuilder, K.E. Vrana, W.M. Freeman // *Biotechniques*. – 2008. – Vol. 44. – P. 619–626.

532. Vanlandschoot, P. Nanobodies®: new ammunition to battle viruses / P. Vanlandschoot, C. Stortelers, E. Beirnaert [et al.] // *Antiviral Research*. – 2011. – Vol. 92. – P. 389–407.

533. Van Wezel, A.L. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous cultures / A.L. Van Wezel // *Nature*. – 1967. – Vol. 216. – P. 64–65.

534. Varasteh, A.-R. Optimization of anti-Rh D immunoglobulin stability in the lyophilization processes / A.-R. Varasteh, M. Hashemi, N. Baranzadeh [et al.] // *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. – 2008. – Vol. 11, № 1. – P. 55–61.

535. Vera-Cabrera, L. Dot blot assay for detection of antidiacyltrehalose antibodies in tuberculous patients / L. Vera-Cabrera, A. Rendon, M. Diaz-Rodriguez [et al.] // *Clin Diagn. Lab. Immunol.* – 1999. – № 6. – P. 686–689.

536. Wacharapluesadee, S. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus / S. Wacharapluesadee, J. Sutipauya, S. Damrougwatanapokin [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2008. – Vol. 151, № 2. – P. 317–320.

537. Waheley, P.R. Development of a real-time, TaqMan Reverse Transcription PCR assay for detection and differentiation of Lyssavirus genotypes 1,5, and, 6 / P.R. Waheley, N. Johnson, Mc Elhinney [et al.] // *J. Clin. Microbiology*. – 2005. – Vol. 43. – P. 2786–2792.

538. Wang, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals / W. Wang // *Int. J. Pharm.* – 2000. – Vol. 203, № 1–2. – P. 1–60.

539. Wang, X. CpG oligodeoxynucleotide acts as a potent adjuvant for inactivated rabies virus vaccine / X. Wang, M. Bao, M. Wan [et al.] // *Vaccine.* – 2008. – Vol. 26. – P. 1893–1901.

540. Wang, Y.J. Sterile pharmaceutical packaging: compatibility and stability / Y.J. Wang, Y.W. Chien // *Parenteral drug association, Inc., Technical report.* – 1984. – № 5. – P. 283–320.

541. Wei, K. Genetically engineered antibody of anti-rabies virus as well as preparation method and application of genetically engineered antibody / K. Wei, W. Yonge, L. Zhuang // *Patent 2015176068 CN; 02.12.2015.*

542. Welch, R.J. An evaluation of two commercially available ELISAs and one in-house reference laboratory ELISA for the determination of human anti-rabies virus antibodies / R.J. Welch, B.L. Anderson, C.M. Litwin // *J. Med. Microbiol.* – 2009. – Vol. 58, № 6. – P. 806–810.

543. Weyer, J. Poxvirus-vectored vaccines for rabies – a review / J. Weyer, C.E. Rupprecht, L.H. Nel // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 27. – P. 7198–7201.

544. Whitcombe, D. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence / D. Whitcombe, J. Theaker, S.P. Guy [et al.] // *Nat. Biotechnology.* – 1999. – Vol. 17. – P. 804–807.

545. White, L.A. Growth of Vero E-6 cells on microcarriers in a cell bioreactor / L.A. White, E.W. Ades // *J. Clin. Microbiology.* – 1990. – Vol. 28, № 2. – P. 283–286.

546. Wictor, T.J. Antigenic properties of rabies virus components / T.J. Wictor, E. Gyorgy, H.D. Schlumberger [et al.] // *J. Immunology.* – 1973. – Vol. 110. – P. 269–276.

547. Wilde, H. Adverse effects of equine rabies immune globulin / H. Wilde, P. Chomchey, S. Prakongsri [et al.] // *Vaccine.* – 1989. – Vol. 7. – P. 10–11.

548. Wilde, H. Purified equine rabies immune globuline: a safe and affordable alternative to human rabies immune globulin / H. Wilde, P. Chomchey, P. Punyaratabandhu [et al.] // *Bull. of the WHO.* – 1989. – Vol. 67, № 6. – P. 731–738.

549. Wilde, H. Postexposure treatment of rabies infection: can it be done without immunoglobulin? / H. Wilde, P. Khawplod, T. Hemachudha [et al.] // *Clinic. Infectious Diseases.* – 2002. – Vol. 34. – P. 477–480.

550. Wilde, H. Rabies / H. Wilde, S. Wacharapluesadee, T. Hemachudha // International Encyclopedia of Public Health. – 2008. – Vol. 1. – P. 463–470.
551. Willams, J.F. Optimization strategies for the polymerase chain reaction / J.F. Willams // Biotechniques. – 1989. – Vol. 7. – P. 762–776.
552. Willet, M. Preclinical development of inactivated rabies virus-based polyvalent vaccine against rabies and filoviruses / M. Willet, D. Kurup, C. Wirblich [et al.] // Journal of Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 212. – P. 414–424.
553. World Health Organization Expert Consultation on Rabies. WHO technical report Series 824. – Geneva: WHO, 1994. – 124 p.
554. World Health Organization Expert Consultation on Rabies. WHO technical report Series 931. – Geneva: WHO, 2005. – 121 p.
555. World Health Organization Expert Consultation on Rabies. WHO technical report series 982. – Geneva: WHO, 2013. – 139 p.
556. Wunner, W.H. The molecular biology of rabies viruses / W.H. Wunner, J.K. Larson, B. Dietzschold [et al.] // Rev. Infect. Dis. – 1988. – Vol. 10. – P. 1149–1158.
557. Xiang, Z.Q. Protection of non-human primates against rabies with an adenovirus recombinant vaccine / Z.Q. Xiang, L. Greenberg, H.C. Ertl, C.E. Rupprecht. – Virology. – 2014. – Vol. 450–451. – P. 243–249.
558. Xuan, X. Biological and immunogenic properties of rabies virus glycoprotein expressed by canine herpesvirus vector / X. Xuan, K. Tuchiya, I. Sato [et al.] // Vaccine. – 1998. – Vol. 16, № 9–10. – P. 969–976.
559. Yokomizo, A.Y. Rabies virus production in high vero cell density cultures on macroporous microcarriers / A.Y. Yokomizo, M.M. Antoniazzi, P.L. Galdino, C.A. Pereira // Biotechnology and bioengineering. – 2004. – V. 85, № 5. – P. 506–515.
560. Yokota, S. Preparation of colloidal gold particles and conjugation to protein A, IgG, F(ab')(2), and streptavidin / S. Yokota // Methods Mol. Biol. – 2010. – Vol. 657. – P. 109–119.
561. Yusibov, V. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine / V. Yusibov, D.C. Hooper, S.V. Spitsin [et al.] // Vaccine. – 2002. – Vol. 20, № 25–26. – P. 3155–3164.

562. Zhang, J. Endotoxin removal using a synthetic adsorbent of crystalline calcium silicate hydrate / J. Zhang, Q. Wang, T.R. Smith [et al.] // *Biotechnol. Progr.* – 2005. – Vol. 21, № 4. – P. 1220–1225.

563. Zhang, S. Competitive ELISA using a rabies glycoprotein-transformed cell line to semi-quantify rabies neutralizing-related antibodies in dogs / S. Zhang, Y. Liu, F. Zhang [et al.] // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 26, № 27 (15). – P. 2108–2113.

564. Zhen, F.F. Rabies and rabies research: past, present and future / F.F. Zhen // *Vaccine.* – 1997. – Vol. 15. – P. 20–24.

565. Zhu, S. Rabies control and treatment: from prophylaxis to strategies with curative potential / S. Zhu, C. Guo // *Viruses.* – 2016. – Vol. 8, № 11. – P. 279.