

DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-163-171

УДК 615.012:616.912

С.А. Мельников, С.В. Борисевич, Д.А. Кутаев, Е.В. Рождественский, А.Е. Бабичев, А.Л. Хмелев,
Н.К. Черникова, С.А. Нимирская, Е.Е. Попадюк, Г.А. Ананьина, С.В. Назаров, Л.Ф. Стомба

Получение хроматографически очищенного противооспенного иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей

48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации,
Сергиев Посад, Российская Федерация

Цель работы – получить хроматографически очищенный противооспенный иммуноглобулин из сыворотки крови лошадей и оценить его свойства. **Материалы и методы.** В работе использована сыворотка крови лошадей, содержащая антитела к вирусу вакцины, штамм Л-ИВП. Хроматографическую очистку сыворотки проводили на препаративном хроматографе Akta Avant (GE HealthCare, Швеция), контроль молекулярных параметров на стадиях получения иммуноглобулина осуществляли на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии LC-20ad (Shimadzu, Япония). Биологические свойства иммуноглобулина оценивали на кроликах, белых мышах, морских свинках. Уровень специфических вируснейтрализующих антител определяли в реакции нейтрализации на хорионаллантоисной оболочке (ХАО) 12-суточных куриных эмбрионов. **Результаты и обсуждение.** Разработана технология получения хроматографически очищенного противооспенного иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. На начальном этапе иммунную сыворотку крови лошадей очищали фильтрованием через стекловолоконные фильтры кассетного типа от фибринового осадка, остаточного количества липидов и липопротеинов, а затем осаждали иммуноглобулиновую фракцию насыщенным раствором сульфата аммония. На следующем этапе с помощью ионообменной хроматографической очистки из рабочего раствора удаляли соли аммония, низкомолекулярные фракции, остаточные количества альбуминов и эуглобулины. На заключительном этапе, используя гель-фильтрацию, избавлялись от димеров, полимеров и агрегатов иммуноглобулинов. Приготовленные по разработанной технологии опытные серии иммуноглобулина характеризовались высокой степенью очистки. Содержание мономеров в готовом препарате составляло не менее 99 %, а специфическая активность по уровню специфических вируснейтрализующих антител – не менее 1:16000.

Ключевые слова: противооспенный иммуноглобулин, иммуноглобулин G, вирус оспы обезьян, вирус вакцины, ортопоксвирусы, хроматографическая очистка.

Корреспондирующий автор: Борисевич Сергей Владимирович, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Для цитирования: Мельников С.А., Борисевич С.В., Кутаев Д.А., Рождественский Е.В., Бабичев А.Е., Хмелев А.Л., Черникова Н.К., Нимирская С.А., Попадюк Е.Е., Ананьина Г.А., Назаров С.В., Стомба Л.Ф. Получение хроматографически очищенного противооспенного иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2026; 2:163–171. DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-163-171

Поступила 26.08.2025. Отправлена на доработку 01.11.2025. Принята к публикации 13.03.2026.

S.A. Mel'nikov, S.V. Borisevich, D.A. Kutaev, E.V. Rozhdestvensky, A.E. Babichev, A.L. Khmelev,
N.K. Chernikova, S.A. Nimirskaya, E.E. Popadyuk, G.A. Anan'ina, S.V. Nazarov, L.F. Stovba

The Preparation of Chromatographically Purified Anti-Smallpox Immunoglobulin from Equine Blood Serum

48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to obtain chromatographically purified anti-smallpox immunoglobulin from equine blood serum and evaluate its properties. **Materials and methods.** The horse blood serum containing antibodies to the vaccine virus, L-IVP strain, was used. Chromatographic purification of serum was carried out on Akta Avant preparative chromatograph (GE HealthCare, Sweden), molecular parameter control at the stages of immunoglobulin production was conducted on the LC-20ad HPLC system (Shimadzu, Japan). The biological properties of immunoglobulin were evaluated in rabbits, white mice, and guinea pigs. The level of specific virus neutralizing antibodies was determined in the neutralization reaction on the chorionallantoic membrane (CAM) of 12-day chicken embryos. **Results and discussion.** The technology for obtaining chromatographically purified anti-smallpox immunoglobulin from equine blood serum has been developed. At the initial stage, the immune blood serum of horses was purified by filtration through glass fiber cassette-type filters from fibrin sediment, residual quantity of lipids and lipoproteins, and then the immunoglobulin fraction was precipitated with a saturated solution of ammonium sulfate. At the next stage, ammonium salts, low molecular weight fractions, residual quantity of albumins and euglobulins were removed using ion exchange chromatographic purification. At the final stage, dimers, polymers, and aggregates of immunoglobulins were eliminated using gel filtration. The experimental series of immunoglobulin prepared using the developed technology is characterized by a high degree of purification. The monomer content in the finished product is at least 99 %, and the specific activity by titer of specific neutralizing antibodies – at least 1:16000.

Key words: anti-smallpox immunoglobulin, immunoglobulin G, mpox virus, vaccine virus, orthopoxviruses, chromatographic purification.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Bioethics: All tests on animal were approved by the Bioethics Committee of the 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation (Protocol No. 4, dated May 23, 2017) and conducted in accordance with national and international guidelines for the care and humane use of animals.

Corresponding author: Sergey V. Borisevich, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Citation: Mel'nikov S.A., Borisevich S.V., Kutaev D.A., Rozhdestvensky E.V., Babichev A.E., Khmelev A.L., Chernikova N.K., Nimirskaia S.A., Popadyuk E.E., Anan'ina G.A., Nazarov S.V., Stovba L.F. The Preparation of Chromatographically Purified Anti-Smallpox Immunoglobulin from Equine Blood Serum. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2026; 2:163–171. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-163-171

Received 26.08.2025. *Revised* 01.11.2025. *Accepted* 13.03.2026.

Mel'nikov S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3497-5829>
Borisevich S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-39190>
Kutaev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4236-1368>
Rozhdestvensky E.V., ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-7287-2488>
Babichev A.E., ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3145-9989>
Khmelev A.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6686-320X>

Chernikova N.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1491-6293>
Nimirskaia S.A., ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-0895-1533>
Popadyuk E.E., ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-1667-7485>
Anan'ina G.A., ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-3703-9237>
Nazarov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-2163-4776>
Stovba L.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7985-5516>

Отмена обязательного оспопрививания привела к падению коллективного иммунитета, и человечество стало уязвимым к таким давно известным инфекциям, как оспа обезьян (тпрох), коров, буйолов и верблюдов. Наблюдается устойчивая тенденция к увеличению количества заболеваний людей указанными ортопоксвирусными инфекциями, что ярко подтверждает последняя вспышка оспы обезьян, начавшаяся в 2022 г. и продолжающаяся до настоящего времени. Общее количество заболевших в 110 странах мира на февраль 2025 г. составило более 127 тыс. человек [1, 2].

Кроме того, выявляются новые ортопоксвирусы, патогенность которых для человека неизвестна. Так, в 2015 г. в Фербенксе (штат Аляска, США) впервые зарегистрировано кожное заболевание у женщины, от которой выделили ортопоксвирус, получивший название вирус Аляска [3, 4].

Следует отметить низкую готовность мировой системы здравоохранения к возникновению чрезвычайной ситуации при появлении вируса, сходного по свойствам с вирусом натуральной оспы. Поэтому актуальной задачей обеспечения биологической безопасности населения Российской Федерации в отношении патогенных для человека ортопоксвирусов является создание новых и совершенствование разработанных ранее лекарственных препаратов, которые могут быть использованы для профилактики и лечения ортопоксвирусных инфекций в современных условиях.

Одним из важных элементов, обеспечивающих эффективное лечение тяжелых форм ортопоксвирусных инфекций, являются сывороточные препараты, включая гетерологичные иммуноглобулины, актуальность которых предопределена отсутствием достаточного количества доноров, имеющих в сыворотке крови специфические противооспепные антитела. Иммуноглобулины, полученные из иммунной сыворотки крови лошадей, высокоэффективны благодаря высокому содержанию вируснейтрализующих антител, объем их выпуска не ограничен количеством донорской крови и производство не сопряжено с риском контаминации гемоконтактными инфекциями [5].

Гетерологичные иммуноглобулины, получаемые традиционным способом спиртового осаждения

на холоду [6], хотя и освобождены от наиболее аллергенных фракций сывороточных белков – альбуминов, альфа- и бета-глобулинов, состоят в основном из нативных молекул иммуноглобулинов с примесью агрегированных форм, с наличием которых связывают реактогенность препаратов [7–9]. Кроме того, они содержат посторонние белки сыворотки крови (до 18 %) и остаточное количество этилового спирта. Указанные выше особенности могут стать причиной развития анафилактических реакций, что существенно снижает сферу применения гетерологичных иммуноглобулинов в медицинской практике [10, 11].

Современные способы выделения и очистки позволяют решить проблему уменьшения количества примесных компонентов, вплоть до полного освобождения от них. При этом для сохранения противовирусного эффекта необходимо щадящее выделение специфических антител и очистка их от балластных белков и агрегатов [12, 13].

Одним из широко используемых в практике методов выделения сывороточных глобулинов является осаждение сульфатом аммония [14]. Ранее данный метод был неприемлем ввиду невозможности существовавшими методами полностью избавиться от собственно осадителя – сульфата аммония – без значительных потерь целевых белков. Однако при использовании дополнительных стадий очистки данный метод осаждения является наиболее технологичным и дешевым, так как не требует высококвалифицированного персонала, специального оборудования и строгого соблюдения технологических параметров фракционирования (температурный режим, процент содержания спирта, поддержание pH и др.). Кроме того, значительно сокращается время стадии осаждения (от нескольких дней до 2–3 часов) и исключаются пожаро- и взрывоопасные операции.

Наиболее широко внедряемым в практику способом производства иммунобиологических лекарственных препаратов является жидкостная хроматография. В последние годы получило развитие масштабирование хроматографического процесса для производства препаратов иммуноглобулинов. Очистку иммуноглобулинов проводят либо одним хроматографическим методом, либо их комбинацией.

Основными современными методами очистки иммуноглобулинов за рубежом являются аффинная хроматография на сорбентах, содержащих в качестве лиганда Protein G и Protein A, ионообменная и гель-фильтрационная хроматографии. Зачастую в пределах лаборатории высокоочищенные белки получают сочетанием этих методов хроматографии, однако для дальнейшего масштабирования процесса аффинные сорбенты в экономическом и технологическом плане невыгодны вследствие их небольшой динамической емкости по белку и высокой стоимости [15].

Метод ионообменной хроматографии основан на способности сорбентов-ионообменников адсорбировать белки сыворотки крови с определенным зарядом молекулы в зависимости от pH среды. Таким методом можно эффективно удалить низкомолекулярные белки крови. Для промышленных целей чаще используют сорбенты на основе четвертичного аммония, которые обеспечивают сорбцию нецелевых белков сыворотки крови на ионообменнике, в то время как иммуноглобулины остаются в растворе («проскоке») и собираются как продукт [16].

Использование гель-фильтрации на следующем этапе очистки иммуноглобулина позволяет удалить из раствора агрегаты и высокомолекулярные фрагменты иммуноглобулина, неизбежно образующиеся на предыдущих стадиях получения препарата, а также перевести продукт в конечный буферный раствор [17].

Целью данной работы явилось получение хроматографически очищенного противооспенного иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей и изучение его свойств.

На основании результатов анализа современных способов получения и очистки антител специалистами ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России предложено использовать для приготовления противооспенного иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей комбинированную безаффинную технологию, которая включает в себя: делипидацию сыворотки крови фильтрацией через стекловолоконную мембрану, осаждение иммуноглобулиновой фракции крови сульфатом аммония, ионообменную хроматографию на сорбенте Q Sepharose FF (основная стадия очистки), позволяющую выделить фракцию IgG, и получение мономерной фракции иммуноглобулина на сорбенте Superdex 200 pg (дополнительная стадия очистки) [18].

Материалы и методы

Сыворотка крови лошади. В работе использовали иммунную сыворотку крови лошадей, многократно иммунизированных вирусом вакцины, штамм Л-ИВП (инв. № СКВ-129), полученным из коллекции музея вакцинных штаммов вирусов и риккетсий ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Уровень противооспенных вируснейтрализующих антител (ВНА) в различных сериях сыворотки составлял от 1:4000 до 1:8000.

Животные. В экспериментах использовали кроликов породы советская шиншилла массой 2,5–3,0 кг, морских свинок массой 200–250 г и белых беспородных мышей массой 18–20 г, полученных из питомника ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

Животные имели неограниченный доступ к воде, кормление осуществлялось в соответствии с существующими нормами. Акклиматизация к условиям эксперимента проводилась в течение 7 суток. Температура в помещениях, где содержались животные, составляла 22–24 °С, относительная влажность – 40–55 %.

Все эксперименты на животных одобрены Биоэтическим комитетом ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (протокол от 23.05.2017 № 4) и проводились в соответствии с национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных.

Выделение иммуноглобулина из иммунной сыворотки крови лошади

Выделение осаждением сульфатом аммония и хроматографическая очистка. Делипидацию сыворотки крови проводили фильтрацией через стекловолоконные фильтры кассетного типа Sartoguard (Sartorius, Германия) с диаметром пор 0,65 мкм, при скорости потока не более 100 мл/мин.

В отфильтрованную лошадиную сыворотку добавляли 10% (по объему) 20 мМ раствор (гидроксиметил)-аминометана (ТРИС) при pH=8,0. К полученному раствору при постоянном перемешивании на магнитной мешалке по каплям добавляли 4,32 М раствор сульфата аммония из расчета 50% насыщения раствора (1:1 по объему). Осаждение иммуноглобулина проводили центрифугированием при скорости вращения ротора 7400 g в течение 20 мин. Полученный осадок растворяли в 20 мМ растворе ТРИС в объеме, равном начальному количеству взятой сыворотки, после чего раствор иммуноглобулина обессоливали от остаточных количеств сульфата аммония с помощью сорбента Sephadex G-25.

Затем проводили ионообменную хроматографию раствора иммуноглобулина на колонке BPG 140/500 (GE HealthCare, Швеция) с сорбентом Q Sepharose FF (GE HealthCare, Швеция) при температуре 20 °С и линейной скорости подачи образца 150 см/ч с последующей градиентной элюцией фракции IgG от 0 до 100 % раствором 20 мМ ТРИС с 1 М раствором NaCl (pH=8,0) при той же скорости потока.

Полученный после ионообменной хроматографии полупродукт очищали гель-фильтрационной хроматографией на колонке с сорбентом Superdex 200 pg (GE HealthCare, Швеция), уравновешенной фосфатно-глициновым буферным раствором (0,02 М фосфат натрия с 2 % глицина, pH=7,2) при линейной скорости потока 13 см/ч в изократическом режиме элюирования при той же скорости.

Концентрировали раствор иммуноглобулина на лабораторной установке «АСФ-009» (АО «Владисарт», Россия) методом тангенциальной фильтра-

ции с использованием кассеты с пределом эксклюзии 50 кДа при скорости потока 500 мл/мин, входном давлении не более 3 бар и выходном давлении не более 2 бар до значения показателя содержания белка до 30 мг/мл.

Метод спиртового осаждения на холоду по Кону. Метод использован для приготовления препарата сравнения при оценке молекулярных параметров готового очищенного противооспенного иммуноглобулина. Выделение иммуноглобулина из сыворотки крови проводили в реакторе РД-60 (оригинальная конструкция, ООО «Арт-Лайт», Россия) фракционированием сывороточных белков с помощью этанола при температуре ниже нуля, которое включало в себя три последовательных осаждения. Первое осаждение проводили путем медленного добавления в разведенную очищенной водой (1:1) сыворотку крови лошади 53% раствора этилового спирта до его конечной концентрации в растворе, равной 26 %, при температуре от минус 5 до минус 7 °С и непрерывной работе мешалки при скорости вращения от 100 до 105 об/мин. В течение 1–2 ч из реакционной смеси глобулины выпадали в виде осадка, который центрифугировали при 5000 g в течение 30 мин при охлаждающем режиме от минус 5 до минус 7 °С.

Осадок разводили охлажденной до 0 °С очищенной водой до исходного объема иммунной сыворотки. Второе осаждение проводили при соблюдении следующих условий: концентрация этилового спирта – 13 %; температура – от минус 3 до минус 5 °С; величина pH – от 5,0 до 5,1; ионная сила – 0,02.

Смесь выдерживали от 1 до 2 ч, после чего отделяли осадок центрифугированием при 5000 g в течение 30 мин при охлаждающем режиме от минус 5 до минус 7 °С.

Надосадочную жидкость фильтровали и использовали для третьего осаждения, которое проводили при концентрации этилового спирта – 26 %; температуре – от минус 5 до минус 7 °С; величине pH – от 7,0 до 7,2; ионной силе – 0,05.

Смесь отстаивали от 12 до 18 ч и отделяли осадок иммуноглобулина центрифугированием при 5000 g в течение 30 мин при охлаждающем режиме от минус 5 до минус 7 °С.

Полученный осадок использовали для приготовления раствора иммуноглобулина.

Определение молекулярных параметров. Молекулярные параметры раствора иммуноглобулина определяли в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0005.15 с помощью хроматографа на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) LC-20ad (Shimadzu, Япония). Автоматическую обработку полученных значений хроматографических характеристик проводили с помощью программного обеспечения LabSolution. В качестве контрольного образца использовали коммерческий нормальный иммуноглобулин из сыворотки крови лошадей (Rockland Antibodies&Assays, США).

Определение общего белка. Количественное определение общего белка на стадиях приготовления иммуноглобулина проводили в соответствии с ОФС.1.2.3.0012.15 колориметрическим методом по Бредфорду на спектрофотометре GeneQuant 1300 (GE HealthCare, Швеция).

Определение физико-химических и биологических показателей. Физико-химические показатели иммуноглобулина определяли в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0004.15, ОФС.1.2.1.0006.15, ОФС.1.8.1.0007.15, биологические – в соответствии с ОФС.1.2.4.0003.15, ОФС.1.2.4.0004.15, ОФС.1.2.4.0005.15.

Определение уровня противооспенных вируснейтрализующих антител. Уровень противооспенных вируснейтрализующих антител (титр) определяли в реакции нейтрализации на хорионаллантоисной оболочке (ХАО) 12-суточных куриных эмбрионов (КЭ).

В качестве антигена (АГ) использовали культуру вируса вакцины, штамм Л-ИВП (инв. № СКВ-129), полученного из коллекции музея вакцинных штаммов вирусов и риккетсий ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Рабочее разведение АГ готовили на цитратно-белковом растворе (ЦБР) из расчета, чтобы после его внесения на ХАО КЭ образовывалось от 30 до 50 оспин.

Положительным контролем служила сыворотка крови лошади с заведомо известным титром ВНА, отрицательным – сыворотка с отсутствием специфических антител.

На ЦБР готовили пятикратные разведения исследуемых проб иммуноглобулина: 1:5, 1:25, 1:125 и т.д. Затем в каждую пробирку с 0,8 мл пятикратного разведения исследуемой пробы иммуноглобулина добавляли равный объем (0,8 мл) рабочего разведения АГ. По 0,8 мл рабочего разведения АГ добавляли также и в контрольные сыворотки.

Смеси исследуемых проб иммуноглобулина, положительной и отрицательной сывороток с антигеном после инкубации от 35,5 до 36,5 °С в течение 60–90 мин с помощью шприца вносили через отверстие в скорлупе по 0,2 мл на предварительно отслоенные ХАО 12-суточных КЭ. На каждое разведение использовали по 4–6 КЭ. Отверстие на поверхности яйца заклеивали расплавленным парафином. После инфицирования ХАО КЭ инкубировали при температуре от 35,5 до 36,5 °С и относительной влажности от 50 до 60 %.

Через 48 ч КЭ вскрывали, подсчитывали количество оспин на каждой ХАО и определяли их среднее арифметическое значение для контрольного разведения АГ, отрицательного и положительного контролей, пятикратных разведений иммуноглобулина (сывороток). Результаты реакции учитывали при наличии в контрольном разведении АГ от 30 до 50 оспин, совпадении полученного значения титра антител в положительной контрольной сыворотке с ранее определенным значением и отсутствии по-

давления образования оспин сывороткой, не содержащей противооспенные антитела (отрицательный контроль). За титр сыворотки принимали ее конечное разведение, подавляющее рост 50 % оспин по сравнению с контролем рабочего разведения АГ.

Результаты и обсуждение

В качестве исходного материала использовали сыворотку крови лошадей, подкожно иммунизированных вирусом вакцины, штамм Л-ИВП. В результате анализа иммунной сыворотки крови лошади методом ВЭЖХ-анализа установлено, что содержание в ней иммуноглобулинов составляет 18–20 %, сывороточного альбумина – 65–70 %, прочих белковых компонентов – 15–20 %.

Для удаления осадка белка (остаточный фибрин), образующегося при хранении сыворотки крови лошадей, а также липидов и липопротеинов, ее фильтровали через стекловолоконные фильтры Sartoguard.

Затем глобулины из сыворотки осадили сульфатом аммония, остатки которого удалили с помощью сорбента Sephadex G-25, с заменой буфера на 20 мМ раствор ТРИС.

На следующем этапе провели ионообменную хроматографию раствора иммуноглобулина, в ходе которой фракцию целевого продукта собирали с начала выхода первого хроматографического пика и до его схода (рис. 1).

Анализ фракции целевого белка – противооспенного иммуноглобулина проводили методом ВЭЖХ, по результатам которого основную долю белков полуфабриката после ионообменной хроматографической очистки (около 94 %) составил иммуноглобулин G. Время выхода его пика совпадало со временем выхода стандартного коммерческого образца иммуноглобулина G. Наряду с основной

фракцией в препарате присутствовали фракции нежелательных высокомолекулярных примесей – до 16 % агрегатов.

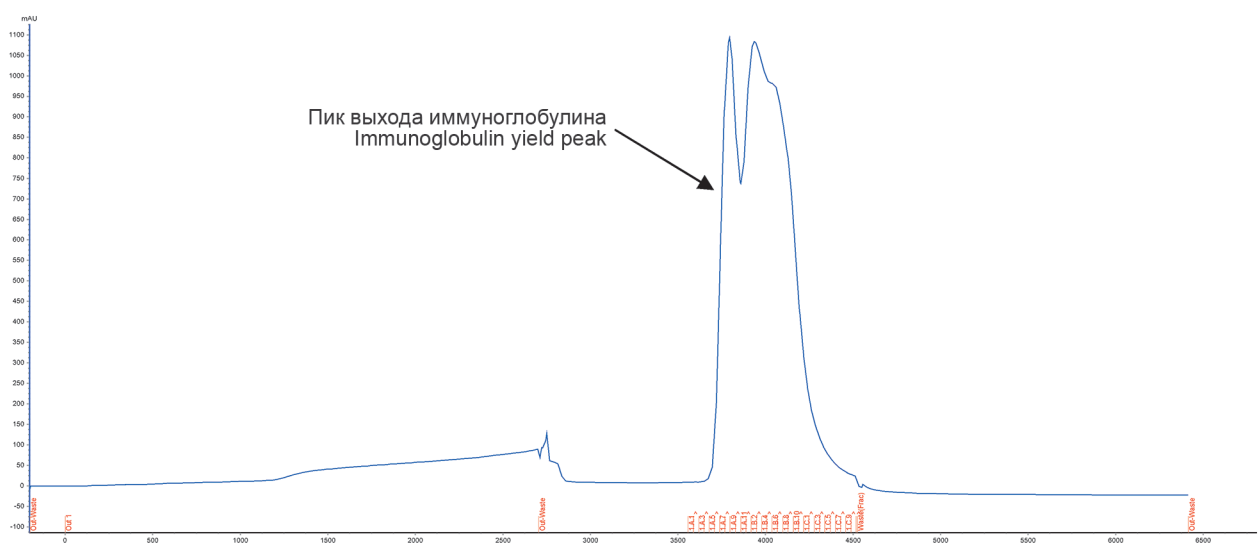
Для удаления высокомолекулярных примесей полупродукт, полученный после ионообменной хроматографии, очищали гель-фильтрационной хроматографией на колонке с сорбентом Superdex 200 pg. Процесс очистки на стадии гель-фильтрации представлен на рис. 2.

Для получения необходимой концентрации иммуноглобулина до расчетного значения 30 мг/мл раствор сконцентрировали на установке для тангенциальной фильтрации.

Результаты ВЭЖХ-анализа свидетельствовали о высокой степени очистки противооспенного иммуноглобулина после двух этапов хроматографии. Содержание мономерной фракции иммуноглобулинов G в противооспенном иммуноглобулине составляет в среднем 99,6 %, а количество димеров, полимеров и агрегатов не превышает в среднем 0,4 %. При этом время удержания основных фракций иммуноглобулинов G противооспенного хроматографически очищенного иммуноглобулина и коммерческого препарата совпадает.

После гель-фильтрации очищенный раствор иммуноглобулина стерилизовали методом фильтрации под давлением путем последовательного пропускания через патронные фильтры с размером пор 1,2 мкм и кассетные фильтры с размером пор 0,22 мкм.

Свойства полученного образца иммуноглобулина оценивали по следующим показателям: прозрачность, цветность, белок, молекулярные параметры, индекс анафилаксии по Вейглу, пирогенность, аномальная токсичность и специфическая активность. Полученные результаты анализа трех серий противооспенного хроматографически очищенного иммуноглобулина представлены в табл. 1.



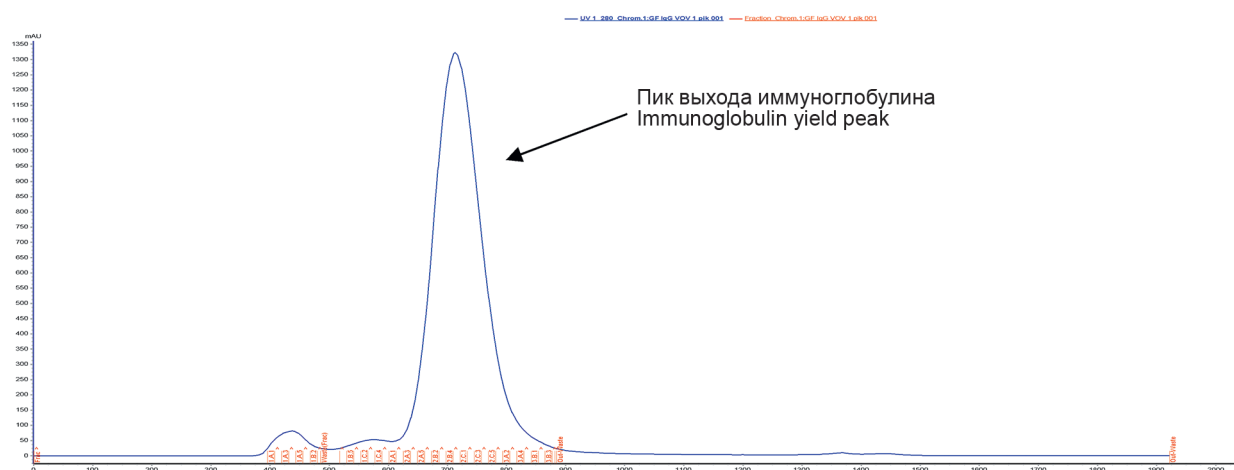


Рис. 2. Хроматограмма препаративной гель-фильтрационной очистки на сорбенте Superdex 200 pg полуфабриката лошадиного противооспенного IgG после стадии ионообменной хроматографии

Fig. 2. Chromatogram of preparative gel filtration purification on sorbent Superdex 200 pg of semi-finished equine anti-smallpox IgG after ion exchange chromatography

Таблица 1 / Table 1

Характеристика хроматографически очищенного противооспенного иммуноглобулина (n=3)

Characteristics of chromatographically purified anti-smallpox immunoglobulin (n=3)

Показатель Indicator	Значение показателя, X_{cp} (минимальное-максимальное значение) Indicator value, X_m (minimum-maximum value)	Требования нормативной документации Regulatory documentation requirements
Уровень противооспенных ВНА к вирусу вакцины, штамм Л-ИВП, титр Level of anti-smallpox VNA to vaccine virus, L-IVP strain, titer	1:16000	Не менее 1:4000 Not less than 1:4000
Прозрачность (оптическая плотность при длине волны 450 нм) Clarity (absorbance at wave length of 450 nm)	0,03 (0,03–0,03)	Не более 0,05 Not more than 0.05
Цветность (оптическая плотность при длине волны 540 нм) Chromaticity (absorbance at wave length of 540 nm)	0,01 (0,01–0,01)	Не более 0,15 Not more than 0.15
pH	6,95 (6,94–6,96)	От 6,8 до 7,2 From 6.8 to 7.2
Белок, % Protein, %	3,1 (3,0–3,2)	От 2,7 до 3,3 From 2.7 to 3.3
Молекулярные параметры: Molecular parameters:		
– содержание мономеров, % – monomer content, %	99,6 (99,42–99,9)	Не менее 95 Not less than 95
– содержание агрегатов, % – aggregates content, %	0,36 (0,1–0,58)	Не более 5 Not more than 5
Индекс анафилаксии по Вейглу Weigl anaphylaxis index	1,5 (1,0–2,0)	Не более 3,0 Not more than 3.0
Стерильность Sterility	Стерилен Sterile	Должен быть стерилен Must be sterile
Пирогенность Pyrogenicity	Непирогенен Non-pyrogenic	Должен быть апиогенным Must be pyrogen-free
Аномальная токсичность Abnormal toxicity	Нетоксичен Non-toxic	Должен быть нетоксичным Must be non-toxic

Примечание: ВНА – вируснейтрализующие антитела.

Note: VNA – virus neutralizing antibodies.

Таблица 2 / Table 2

Сравнительная характеристика хроматографически очищенного противооспенного иммуноглобулина и противооспенного иммуноглобулина, полученного методом спиртового осаждения по Кону (n=3)

Characterization of chromatographically purified anti-smallpox immunoglobulin and anti-smallpox immunoglobulin produced by Cohn alcohol precipitation method (n=3)

Показатель Indicator	Значение показателя для противооспенного иммуноглобулина, X _{cp} (минимальное-максимальное значение) Indicator value for anti-smallpox immunoglobulin, X _m (minimum-maximum value)	
	хроматографически очищенного chromatographically purified	полученного методом спиртового осаждения obtained by the method of alcohol precipitation
Белок, % / Protein, %	3,1 (3,0–3,2)	10,0 (9,8–10,2)
Молекулярные параметры: Molecular parameters:		
– содержание мономеров, % – monomer content, %	99,6 (99,42–99,9)	88 (86,0–90,0)
– содержание агрегатов, % – content of aggregates, %	0,36 (0,1–0,58)	12 (10,0–14,0)
Индекс анафилаксии по Вейглу Weigl anaphylaxis index	1,5 (1,0–2,0)	2,5 (2,0–3,0)

Основные показатели, которые влияют на анафилактогенность иммуноглобулинов, представлены в табл. 2.

Результаты сравнительной оценки характеристики хроматографически очищенного противооспенного иммуноглобулина и противооспенного, полученного спиртовым осаждением по Кону, свидетельствовали, что хроматографическая очистка позволила существенно улучшить значения ряда показателей, характеризующих анафилактогенность. В первую очередь, снизилось содержание агрегатов в среднем с 12,0 до 0,4 % и, соответственно, увеличилась доля мономеров до 99,6 %. Высокий уровень ВНА в полуфабрикате позволил снизить содержание общего белка в среднем с 10,0 до 3,1 % в готовой форме препарата. За счет этого индекс анафилаксии по Вейглу уменьшился в среднем с 2,5 до 1,5. Также удалось полностью избавиться от остаточного спирта, содержание которого составляло до 4,0 %.

Таким образом, предложена технология приготовления очищенного противооспенного иммуноглобулина из иммунной сыворотки крови лошадей, которая включает в себя осаждение глобулинов G из сыворотки раствором сульфата аммония и двухстадийную хроматографическую очистку.

Анализ молекулярных параметров показал, что на стадии ионообменной хроматографической очистки основную долю белков полуфабриката составляет иммуноглобулин G (около 94 %), а доля нежелательных димеров, полимеров и агрегатов составляет около 6 %.

Гель-фильтрационная хроматография на колонке с сорбентом Superdex 200 pg на второй стадии очистки обеспечила получение высокоочищенной мономерной фракции IgG без следов примесных фракций и агрегатов, со степенью очистки не менее 99 % по результатам ВЭЖХ-анализа.

Самым существенным недостатком иммуноглобулинов из сыворотки крови лошадей, ограни-

чивающим сферу их применения, является высокий уровень анафилактогенности. Хроматографически очищенный противооспенный иммуноглобулин содержит меньшее количество примесей и характеризуется более слабой анафилактогенностью в сравнении с препаратом, приготовленным спиртовым осаждением на холоду по Кону.

Наработка экспериментальных серий хроматографически очищенного противооспенного иммуноглобулина проводилась на лабораторной базе, которая позволяет максимально перерабатывать не более 10 литров сыворотки крови лошади и получать до 950 мл готового препарата.

Предложенный способ получения иммуноглобулина позволяет легко масштабировать технологический процесс на этапах:

- получения гипериммунной плазмы крови за счет увеличения поголовья лошадей-продуцентов;
- выделения за счет увеличения объема емкости, позволяющей осуществлять равномерное перемешивание и дозирование раствора сульфата аммония;
- очистки за счет применения промышленных хроматографических систем, позволяющих использовать большие (до 100 литров) объемы сорбентов.

В результате проведенного исследования получен хроматографически очищенный противооспенный иммуноглобулин из сыворотки крови лошадей, который характеризуется содержанием мономерной фракции иммуноглобулина не менее 99 %, содержанием белка от 2,8 до 3,2 %, титром ВНА не менее 1:16000, апиrogenностью, нетоксичностью и стерильностью. Применение хроматографической очистки существенно снизило содержание примесей в противооспенном иммуноглобулине из сыворотки крови лошадей. Очищенный противооспенный иммуноглобулин в сравнении с иммуноглобулином, полученным спиртовым осаждением по Кону, характеризуется значительно меньшим содержанием агрегатов, отсутствием остаточного количества эти-

лового спирта, что, соответственно, позволит уменьшить риск развития анафилактических реакций при введении препарата людям.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Биоэтика. Все эксперименты на животных одобрены Биоэтическим комитетом ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (протокол от 23.05.2017 № 4) и проводились в соответствии с национальными и международными руководящими принципами по уходу и гуманному использованию животных.

Список литературы

1. ВОЗ: Оспа обезьян. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/mpox> (дата обращения: 16.11.2025).
2. ВОЗ сняла статус чрезвычайной ситуации в мире по оспе обезьян. [Электронный ресурс]. URL: <https://ria.ru/20250905/ospa-2040058865.html> (дата обращения: 16.11.2025).
3. Springer Y.P., Hsu C.H., Werle Z.R., Olson E., Cooper M.P., Castrodale L.J., Fowler N., McCollum A.M., Goldsmith C.S., Emerson G.L., Wilkins K., Doty J.B., Burgado J., Gao J., Patel N., Mauldin M.R., Reynolds M.G., Satheshkumar P.S., Davidson W., Li Y., McLaughlin J.B. Novel orthopoxvirus infection in an Alaska resident. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64(12):1737–41. DOI: 10.1093/cid/cix2019.
4. Oliveira Silva N.I., de Oliveira J.S., Kroon E.G., de Souza Trindade G., Drumond B.P. Here, there, and everywhere: the wide host range and geographic distribution of zoonotic orthopoxviruses. *Viruses*. 2021; 13(1):43. DOI: 10.3390/v13010043.
5. Борисевич И.В., Маркин В.А., Фирсова И.В., Хамитов Р.А., Максимов В.А., Евсеев А.А. Эпидемиология, профилактика, клиника и лечение геморрагических лихорадок (Марбург, Эбола, Ласса и Боливийской). *Вопросы вирусологии*. 2006; 51(5):8–16.
6. Cohn E.J., Strong L.E., Hughes W.L. Jr, Mulford D.J., Ashworth J.N., Melin M., Taylor H.L. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* 1946; 68(3):459–75. DOI: 10.1021/ja01207a034.
7. Супотницкий М.В., Елапов А.А., Борисевич И.В., Кудашева Э.Ю., Климов В.И., Лебединская Е.В., Корсун Л.В., Горбунова Е.В., Слободян В.Г., Меркулов В.А., Олифер Ю.В. Препараты, полученные из крови человека и животных, в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015; (3):33–48.
8. Перельгина О.В., Комаровская Е.И., Мухачева А.В., Саяпина Л.В., Обухов Ю.И., Бондарев В.П. Гетерологичные сырьевые препараты в практике современной медицины. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017; 17(1):41–7.
9. Онищенко Г.Г., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Поспелова В.В., редакторы. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии. М.: ВУНМЦ; 2002. 608 с.
10. Jones R.G.A., Landon J. Enhanced pepsin digestion: a novel process for purifying antibody F(ab')₂ fragments in high yield from serum. *J. Immunol. Methods*. 2002; 263(1–2):57–74. DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00031-5.
11. Kazatchkine M.D., Kaveri S.V. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345(10):747–55. DOI: 10.1056/NEJMra993360.
12. Ghorbani J., Kompany-Zareh M., Tahmasebi E. Antibodies purification from human plasma using fractionation, chromatography and gel electrophoresis assisted by multivariate analysis of complementary absorption and fluorescence spectra. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2021; 1167:122526. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122526.
13. Зубкова Н.В. Биотехнологические аспекты эффективной и безопасной переработки донорской плазмы: проблемы и перспективы. *Биопрепараты*. 2014; 1(49):4–10.

14. Kuhlmann W.D. Purification of antibodies by use of biochemical and immunochemical techniques. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.kuhlmann-biomed.de/en/purification-of-antibodies/>.

15. Hober S., Nord K., Linholt M. Protein A chromatography for antibody purification. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 848(1):40–7. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.09.030.

16. Grodzki A.C., Berenstein E. Antibody purification: ion-exchange chromatography. *Methods Mol. Biol.* 2010; 588:27–32. DOI: 10.1007/978-1-59745-324-0_4.

17. Генералов И.И., Моисеева А.М., Жерулик С.В., Генералова А.Г., Железняк Н.В. Получение высокоочищенных иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови человека. *Вестник фармации*. 2009; 4(46):52–60.

18. Борисевич С.В., Кутаев Д.А., Рождественский Е.В., Гордеев Е.В., Хмелев А.Л., Назаров С.В., Мельников С.А., Нимирская С.А., Черникова Н.К., Подкуйко В.Н. Способ получения иммуноглобулина противооспенного из сыворотки крови лошадей. Патент РФ № 2770425 от 18.04.2022, приоритет от 15.06.2020. Бюл. № 11 от 20.04.2022.

References

1. [WHO: Smallpox of monkeys]. (Cited 16 Nov 2025). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/mpox>.
2. [WHO has lifted the status of a global emergency for monkeypox]. (Cited 16 Nov 2025) [Internet]. Available from: <https://ria.ru/20250905/ospa-2040058865.html>.
3. Springer Y.P., Hsu C.H., Werle Z.R., Olson E., Cooper M.P., Castrodale L.J., Fowler N., McCollum A.M., Goldsmith C.S., Emerson G.L., Wilkins K., Doty J.B., Burgado J., Gao J., Patel N., Mauldin M.R., Reynolds M.G., Satheshkumar P.S., Davidson W., Li Y., McLaughlin J.B. Novel orthopoxvirus infection in an Alaska resident. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64(12):1737–41. DOI: 10.1093/cid/cix2019.
4. Oliveira Silva N.I., de Oliveira J.S., Kroon E.G., de Souza Trindade G., Drumond B.P. Here, there, and everywhere: the wide host range and geographic distribution of zoonotic orthopoxviruses. *Viruses*. 2021; 13(1):43. DOI: 10.3390/v13010043.
5. Borisevich I.V., Markin V.A., Firsova I.V., Khamitov R.A., Maksimov V.A., Evseev A.A. [Epidemiology, prevention, clinical presentation and treatment of hemorrhagic fevers (Marburg, Ebola, Lassa and Bolivian)]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2006; 51(5):8–16.
6. Cohn E.J., Strong L.E., Hughes W.L. Jr, Mulford D.J., Ashworth J.N., Melin M., Taylor H.L. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* 1946; 68(3):459–75. DOI: 10.1021/ja01207a034.
7. Supotnitsky M.V., Elapov A.A., Borisevich I.V., Kudasheva E.Yu., Klimov V.I., Lebedinskaya E.V., Korsun L.V., Gorbunova E.V., Slobodyan V.G., Merkulov V.A., Olfier Yu.V. [Preparations obtained from human and animal blood in terms of their quality, efficacy and safety]. *Biopreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2015; (3):33–48.
8. Perelygina O.V., Komarovskaya E.I., Mukhacheva A.V., Sayapina L.V., Obukhov Yu.I., Bondarev V.P. [Heterologous serum preparations in the practice of modern medicine]. *Biopreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2017; 17(1):41–7.
9. Onishchenko G.G., Aleshkin V.A., Afanasyev S.S., Pospelova V.V., editors. [Immunobiological Drugs and Prospects for Their Use in Infectology]. Moscow: VUNMC; 2002. 608 p.
10. Jones R.G.A., Landon J. Enhanced pepsin digestion: a novel process for purifying antibody F(ab')₂ fragments in high yield from serum. *J. Immunol. Methods*. 2002; 263(1–2):57–74. DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00031-5.
11. Kazatchkine M.D., Kaveri S.V. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345(10):747–55. DOI: 10.1056/NEJMra993360.
12. Ghorbani J., Kompany-Zareh M., Tahmasebi E. Antibodies purification from human plasma using fractionation, chromatography and gel electrophoresis assisted by multivariate analysis of complementary absorption and fluorescence spectra. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2021; 1167:122526. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122526.
13. Zubkova N.V. [Biotechnological aspects of efficient and safe processing of donor plasma: problems and prospects]. *Biopreparaty [Biopreparations]*. 2014; 1(49):4–10.
14. Kuhlmann W.D. Purification of antibodies by use of biochemical and immunochemical techniques. [Internet]. Available from: <https://www.kuhlmann-biomed.de/en/purification-of-antibodies/>.

15. Hober S., Nord K., Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 848(1):40–7. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.09.030.

16. Grodzki A.C., Berenstein E. Antibody purification: ion-exchange chromatography. *Methods Mol. Biol.* 2010; 588:27–32. DOI: 10.1007/978-1-59745-324-0_4.

17. Generalov I.I., Moiseeva A.M., Zherulik S.V., Generalova A.G., Zheleznyak N.V. [Production of highly purified class G immunoglobulins from human blood serum]. *Vestnik Farmatsii [Bulletin of Pharmacy]*. 2009; 4(46):52–60.

18. Borisevich S.V., Kutaev D.A., Rozhdestvensky E.V., Gordeev E.V., Khmelev A.L., Nazarov S.V., Melnikov S.A., Nimirskaya S.A., Chernikova N.K., Podkuiko V.N. [Method of obtaining anti-inflammatory immunoglobulin from blood serum of horses]. Patent of the Russian Federation No. 2770425 dated 04/18/2022, priority dated 06/15/2020. Bull. No. 11 dated 04/20/2022.

Authors:

Mel'nikov S.A., Borisevich S.V., Kutaev D.A., Rozhdestvensky E.V., Babichev A.E., Khmelev A.L., Chernikova N.K., Nimirskaya S.A., Popadyuk E.E., Anan'ina G.A., Nazarov S.V., Stovba L.F. 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. 11, Oktyabrskaya St., Sergiev Possad-6, Moscow Region, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mail.ru

Об авторах:

Мельников С.А., Борисевич С.В., Кутаев Д.А., Рождественский Е.В., Бабичев А.Е., Хмелев А.Л., Черникова Н.К., Нимирская С.А., Попадюк Е.Е., Ананьина Г.А., Назаров С.В., Стомба Л.Ф. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 141306, Московская обл., Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11. E-mail: 48cnii@mail.ru.