

Е.Г.Абрамова, С.В.Генералов, Ж.В.Матвеева, И.М.Жулидов, А.К.Никифоров, А.В.Комиссаров**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВНЕДРЕНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
В ПРОИЗВОДСТВО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

В обзоре представлены основные итоги научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы, выполненной при реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности» (2009–2014) по разработке и внедрению культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина. Освещены основные этапы разработки методологии масштабного культивирования фиксированного вируса бешенства, концентрирования культуральной жидкости, количественного обнаружения вируса бешенства с применением ПЦР, иммунизации продуцентов. Получение пилотных серий усовершенствованного антирабического иммуноглобулина, соответствующего нормативным требованиям на коммерческий препарат, свидетельствовало об эффективности разработанных биотехнологических, методологических приемов, а также разработанного проекта производственно-технологической документации.

Ключевые слова: бешенство, вирус бешенства, антирабический иммуноглобулин, культура клеток, иммунизация, ультрафильтрация, стандартная операционная процедура, производственный регламент, фармакопейная статья.

Корреспондирующий автор: Абрамова Елена Геннадьевна, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

E.G.Abramova, S.V.Generalov, Zh.V.Matveeva, I.M.Zhulidov, A.K.Nikiforov, A.V.Komissarov**Experimental Substantiation of Cultural Technologies Introduction into Manufacturing of Anti-Rabies Immunoglobulin***Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation*

The review provides information on the major outcomes of research and development work, performed within the frames of the Federal Target Program “National system of chemical and biological safety” (2009–2014), aimed at elaboration and introduction of cultural techniques into the manufacturing of anti-rabies immunoglobulin. Described are the key phases in methodology engineering, deployed for the large-scale cultivation of fixed rabies virus, concentration of cultural liquid, quantitation of rabies virus using PCR, and immunization of producers. Obtained pilot batches of the enhanced anti-rabies immunoglobulin, complying with normative requirements to commercial formulations, testify to the effectiveness of the developed biotechnological and methodological procedures, as well as of the designed engineering-manufacturing project documentation.

Key words: rabies, rabies virus, anti-rabies immunoglobulin, cell culture, immunization, ultra-filtration, standard operational procedure, master formula, pharmacopoeial monograph.

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

Corresponding author: Elena G. Abramova, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

Citation: Abramova E.G., Generalov S.V., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K., Komissarov A.V. Experimental Substantiation of Cultural Technologies Introduction into Manufacturing of Anti-Rabies Immunoglobulin. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:95–101. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-95-101

Бешенство относится к группе опасных инфекционных заболеваний человека и животных, характеризуется поражением центральной нервной системы, абсолютной летальностью и является одним из наиболее распространенных зооантропонозов. В Российской Федерации, по данным Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, ежегодно за антирабической помощью обращаются от 430 до 470 тыс. человек, больше половины из них получают специфическое антирабическое лечение [1, 13]. Для специфической профилактики бешенства используют антирабические вакцину и иммуноглобулин, в производстве которых применяют фиксированные штаммы вируса бешенства [11, 15]. Россия на протяжении десятков лет не имела собственной площадки для производства антирабического имму-

ноглобулина, производство препарата было сосредоточено на территории Украины (Харьков). После распада СССР остро встал вопрос производства антирабического иммуноглобулина на территории России. С 2004 г. ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» начал серийный выпуск препарата «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций» (АИГ) по воспроизведенной спиртово-риванольной технологии.

На сегодняшний день гетерологичный АИГ можно считать приемлемой и безопасной альтернативой гомологичному препарату, так как применяемые в производстве современные методы очистки иммуноглобулина позволяют значительно снизить частоту побочных эффектов, проявляющихся в результате применения АИГ животного происхожде-

ния. По данным ВОЗ, нежелательные поствакцинальные реакции наблюдаются в 1–2 % случаев [30]. Для сравнения, в середине прошлого столетия значение данного показателя составляло около 46 %, а в конце восьмидесятых годов – около 6 % [23, 31]. Тем не менее, вопрос дальнейшего усовершенствования гетерологичных препаратов АИГ, даже при такой сравнительно небольшой доле возникновения побочных эффектов, остается актуальным. Важнейшей научно-практической задачей, способствующей повышению качества АИГ, является внедрение культуральных технологий на этапе получения рабического антигена для иммунизации продуцентов. Отказаться от использования органо-тканевого антигена в производстве антирабических препаратов настоятельно рекомендует ВОЗ, поскольку мозговая ткань может индуцировать в организме продуцента выработку антител нейротоксического характера, способных стать причиной поствакцинальных неврологических осложнений [30]. В качестве альтернативного варианта рекомендовано использование культурального антигена на основе вируса бешенства, репродуцированного на клеточных культурах [29, 30].

Использование культурального антигена для получения антирабической сыворотки впервые предложено P.Lepin и P.Atanasiu [9, 10]. Они использовали вирус, полученный в первичнотрипсинизированной культуре ткани почек эмбриона хомяка, однако для иммунизации требовалось либо применение больших доз антигена, что индуцировало образование низкоафинных антител в течение длительного времени, либо введение в организм продуцента живого вируса. К настоящему времени существуют более совершенные схемы иммунизации продуцентов антирабической сыворотки, которые предполагают применение только инактивированного вируса, выращенного на перевиваемых клеточных культурах ВНК [20] и Vero [17, 21, 27]. Использование перевиваемых клеток в качестве клеточного субстрата для репродукции вируса бешенства предпочтительнее по сравнению с первичнотрипсинизированными, что связано с высокой потенцией роста клеток, стандартностью биологических свойств и возможностью крупномасштабного культивирования в ферментерах большого объема. Перевиваемая линия клеток Vero аттестована в России для производства МИБП, она характеризуется отсутствием онкогенных свойств и не представляет опасности для человека. Последнее обстоятельство определило выбор этой линии для использования в качестве субстрата для размножения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», используемого в отечественном производстве антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади.

Целью исследований в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности» (2009–2014) являлась разработка технологии масштабного культивирования производственного штамма фиксиро-

ванного вируса бешенства «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero и получение культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

На первом этапе исследований решалась задача по адаптации производственного штамма вируса бешенства к клеточной культуре. Адаптацию вируса осуществляли с применением как прямого пассирования вируса на клеточной культуре Vero, так и поочередного пассирования через мозг кролика и на клеточной культуре. Для улучшения адсорбции вируса к клеточной мембране к клеточной суспензии предварительно добавляли протамина сульфат в конечной концентрации 0,1 мг/мл. К завершению адаптации вирус стабильно накапливался в клеточной культуре и вызывал деструкцию (85±5) % клеточного монослоя. Одновременно были подобраны оптимальные условия культивирования исследуемого штамма на клеточной культуре Vero в культуральных флаконах стационарным способом. Для заражения клеточной культуры вирусосодержащую субстанцию добавляли к взвеси клеток. Экспериментально выявленная оптимальная заражающая доза для эффективной репродукции вируса составляла 0,1 ЛД₅₀/кл. Культивирование фиксированного вируса бешенства осуществляли при температуре 37 °С от 5 до 7 сут с использованием культуральной среды 199 (рН 7,2–7,4) с добавлением человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в концентрации 0,1 %.

Для увеличения объемов выхода биомассы фиксированного вируса бешенства рассматривали способы культивирования в биореакторе и роллерных бутылках [5]. Использование биореактора позволяет автоматизировать контроль параметров культивирования клеток и вируса и стандартизировать данный технологический процесс. В биореакторе вирус выращивали двумя способами: суспензионным и псевдосуспензионным. При суспензионном способе клетки культивируются во взвешенном состоянии благодаря постоянному перемешиванию среды; при использовании псевдосуспензионного метода клетки растут на специальных сферических микроносителях. С одной стороны, клетки находятся в естественных для роста условиях, с другой стороны, для их выращивания возможно использование процессов и аппаратуры, разработанных для суспензионных культур. Разработанная методология выращивания суспензионным и псевдосуспензионным способами позволяет получать вирусосодержащую жидкость с титром в ИФА соответственно (1:32 – 1:64) и (1:64 – 1:128). В результате экспериментов были отработаны оптимальные параметры культивирования клеток и вируса для каждого из указанных методов.

Культивирование клеток Vero суспензионным методом осуществляли в 2 л питательной ростовой среды Игла MEM с добавлением 10 % фетальной сыворотки КРС при температуре (37±0,5) °С и рН (7,2±0,1). Частоту вращения мешалки поддержи-

вали на уровне от 80 до 100 об/мин. Аэрацию осуществляли периодически: воздух, содержащий 5 % углекислого газа, подавали в биореактор в течение 30 мин, затем подачу воздуха прекращали на 2 ч. Экспериментально определена оптимальная посевная концентрация клеток, равная $(0,7 \pm 0,2) \cdot 10^5$ кл/мл. После 3–4 сут культивирования к клеточной суспензии добавляли вирусодержащую жидкость в концентрации 0,1 ЛД₅₀/кл. Через 30 мин после инокуляции вируса добавляли поддерживающую среду 199, содержащую 0,1 % ЧСА, либо 5 % сыворотку КРС. Культивирование вирусинфицированной культуры осуществляли в течение 5 сут.

При выращивании клеток псевдосуспензионным способом посевную клеточную суспензию добавляли к 2 л ростовой среды, содержащей микроросители Cytodex-3 в концентрации $(2,5 \pm 0,5)$ г/л. Начальная концентрация клеток должна составлять $(0,7 \pm 0,2) \cdot 10^5$ кл/мл. Для прикрепления клеток к частицам Cytodex-3 в течение первых 8 ч выращивания использовали следующий режим перемешивания: 1 мин с частотой 50 об/мин, затем остановка мешалки на 30 мин. Далее в реактор добавляли ростовую среду до конечного объема 5 л и осуществляли культивирование в условиях, аналогичных условиям суспензионного способа. По окончании выращивания клеток ростовую среду удаляли из биореактора, к клеткам добавляли вирусодержащую жидкость в концентрации 0,1 ЛД₅₀/кл и поддерживающую среду. Дальнейшее культивирование осуществляли в течение 5–7 сут.

Процесс масштабного культивирования вируса бешенства *in vitro* был оптимизирован за счет освоения роллерного способа. При культивировании в роллерных бутылках клеточный монослой располагается по всей внутренней цилиндрической поверхности горизонтально вращающихся сосудов и периодически омывается питательной средой. Данный способ позволяет сочетать возможности максимального накопления вируса бешенства на клеточной культуре, простоты и эффективности технологического обслуживания процесса культивирования. Роллерное культивирование клеток Vero осуществляли при 37 °С в 200 мл ростовой среды при частоте вращения бутылки $(0,4 \pm 0,1)$ об/мин в первые 24 ч выращивания, которую затем увеличивали до $(1,25 \pm 0,25)$ об/мин. Через 5 сут выращивания среду удаляли, клеточный монослой промывали раствором Дальбекко, клетки отсоединяли раствором трипсина и версена. Затем к клеткам добавляли вирусодержащую субстанцию в концентрации 0,1 ЛД₅₀/кл и поддерживающую среду. Культивирование вируса осуществляли в объеме (250 ± 25) мл при температуре 32 °С.

При культивировании роллерным способом вирус бешенства накапливается в культуральной жидкости до значения титра в ИФА (1:64 – 1:128). При равнозначном выходе целевой биомассы роллерный способ представляется менее затратным по сравнению с псевдосуспензионным способом из-за исполь-

зования микроросителей, стоимость которых достаточно высока. Следует отметить, что в условиях производства антирабического иммуноглобулина технологическая реализация роллерного способа имеет весомое преимущество, поскольку в данном случае отсутствует необходимость круглосуточного наблюдения за процессом выращивания вируса.

Полученную в результате культивирования биомассу после инактивации использовали в качестве основы для приготовления материала для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки. Инактивацию осуществляли добавлением к вирусодержащей биомассе фенола в концентрации 0,5 % с последующим инкубированием при 37 °С в течение 24 ч согласно методическим указаниям «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства».

Для количественной оценки вируса бешенства в инактивированном материале использовали ИФА и ПЦР. Эффективность применения ИФА для оценки специфической активности культурального вируса бешенства при производстве антирабических вакцин подтверждается в многочисленных исследованиях [18, 19]. В настоящем исследовании использовали «Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа» (ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань, Республика Татарстан).

Альтернативным вариантом количественной оценки количества вирусных частиц в материале для иммунизации является использование полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Данный подход нашел успешное применение для определения концентрации РНК вируса диареи крупного рогатого скота [24]; желтой геморрагической лихорадки, человеческого герпесвируса-6 и цитомегаловируса [28], вируса клещевого энцефалита [12]. Для количественной оценки содержания вируса бешенства штамма «Москва 3253» в вирусном материале в рамках данных исследований разработана ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов с использованием праймеров и зонда формата TaqMan на основе последовательности G-L области вируса бешенства; определены ДНК-калибраторы [8]. Разработанные методические подходы позволили установить концентрацию вирусных частиц в культуральном антигене. В зависимости от способа и сроков культивирования вируса данный показатель находится в пределах от 10^5 до 10^6 копий РНК/мл. Для сравнения, в органотканевом антигене количество вирусных частиц составляет от 10^7 до 10^8 копий РНК/мл.

Одна из основных сложностей в разработке эффективных технологий выделения продуктов культивирования связана с их низкой концентрацией в исходной культуральной жидкости. Для повышения концентрации вирусных частиц и повышения показателей антигенной активности вируса, выращенного в культуре клеток, необходимо было подобрать метод

концентрирования инактивированного вирусного материала. Из многообразия методов концентрирования вирусосодержащих материалов выбор был остановлен на методе тангенциальной или проточной ультрафильтрации, достоинствами которого являются практическое отсутствие инактивирующих воздействий на биологические продукты, высокая селективность, а также низкие энергозатраты на их разделение. В сравнении с традиционным методом «тупиковой» ультрафильтрации, когда разделяемый раствор подают на мембрану перпендикулярно к ее поверхности, при тангенциальной ультрафильтрации направления подачи среды и фильтрации не совпадают: они перпендикулярны друг другу. В результате часть фильтруемой среды проходит через мембраны как фильтрат, а основная часть потока выходит из системы в рабочую емкость, а затем вновь поступает в фильтрующий контур [2]. Для концентрирования инактивированной культуральной жидкости, содержащей вирус бешенства, использовали модуль для тангенциальной ультрафильтрации Vivaflow 200 (Sartorius), снаряженный плоскораменными фильтрующими элементами с площадью фильтрации, равной 20 дм².

В результате исследований отработаны оптимальные условия процесса концентрирования, предусматривающие использование одного ультрафильтрационного модуля с номинальной отсечкой по молекулярной массе, не превышающей 300 кДа, при давлении от 0,24 до 0,26 МПа и температуре (20±2) °С. Далее для получения стерильного антигена подобраны параметры последующей стерилизующей фильтрации. В экспериментах установлено, что оптимальным является последовательное использование микрофильтрационных мембран из ацетата целлюлозы с размерами пор 0,8, 0,45 и 0,22 мкм при температуре (32±1) °С. Предлагаемые способы концентрирования и стерилизующей фильтрации позволили получить культуральный антиген с содержанием вирусной РНК от 10⁷ до 10⁸ копий/мл, что близко по значению к содержанию вирусной РНК в органотканевом антигене.

Эффективность применения культурального рабического антигена для иммунизации животных с целью получения высокоактивных сывороток предварительно была изучена на кроликах. Животных иммунизировали подкожно в объеме 1 мл на 0, 7, 21, 28, 52, 59-е сутки. Титр вируснейтрализующих антител в сыворотке животных определяли на 42-е и 73-е сутки в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах [9, 23]. Одновременно проводили исследования эффективности использования адьювантов при иммунизации животных. Среди большого разнообразия адьювантов были выбраны гидроксид алюминия – адьювант, традиционно применяемый в производстве вакцин, и полиоксидоний – сравнительно новый синтетический отечественный адьювант, официально разрешенный в производстве вакцин [16]. Установлено, что к 73-му дню иммунизации антитела в крови животных накапливались в титре

(1:640 – 1:1280), что соответствовало требованиям ВОЗ [9, 26], согласно которым титр специфических антител в антирабической сыворотке, предназначенной для получения антирабического иммуноглобулина, должен составлять в реакции нейтрализации не менее 1:500. Проведенные исследования показали принципиальную возможность использования культурального антигена для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки. При этом рациональным представляется применение на этапе иммунизации гидроксида алюминия в качестве адьюванта, однако следует отметить и выраженный стимулирующий эффект полиоксидония.

Полученные результаты по изучению антительного ответа на кроликах явились основой для разработки схемы иммунизации более крупных продуцентов – лошадей [4]. В отличие от других крупных животных, применяемых при изготовлении лечебно-профилактических сывороток, лошади отличаются высокой иммунологической реактивностью, от них в короткий срок можно получать сыворотку, содержащую специфические антитела в достаточно высоком титре [10]. Для иммунизации использовали трех клинически здоровых лошадей в возрасте от 3 до 10 лет. Животным внутримышечно вводили по 5 мл рабического антигена с установленной концентрацией вирусных частиц – от 10⁷ до 10⁸ копий РНК в 1 мл. Титр вируса, содержащегося в культуральной жидкости, в ИФА составлял не менее 1:128. Установлено, что для получения высокоактивной сыворотки с титром специфических антител не менее 1:500 целесообразно проводить иммунизацию лошадей с семидневным интервалом в течение 11–14 недель. При этом первые пять инъекций рекомендуется осуществлять с использованием адьюванта: гидроксида алюминия в концентрации 3 мг/мл, либо полиоксидония в конечной концентрации 1 мг/мл. Взятие крови с целью получения антирабической сыворотки следует выполнять через 7–10 дней после последней иммунизации. Через три недели после взятия крови лошадям показана повторная иммунизация. Исследования антирабических сывороток лошадей, иммунизированных культуральным антигеном, позволили выявить их специфическую активность на уровне (1:554 – 1:692) в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах.

В лабораторных условиях из сывороток кроликов и лошадей, иммунизированных культуральным антигеном, были получены экспериментальные образцы антирабического иммуноглобулина. Специфическая активность лабораторных образцов кроличьего АИГ, определенная в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах, составила 332 и 347 МЕ/мл; лабораторные образцы АИГ, полученные из сыворотки крови лошади, показали специфическую активность на уровне 242 и 214 МЕ/мл. Согласно нормативной документации, для применения в практической медицине специфическая активность антирабического иммуноглобулина должна составлять не менее 150 МЕ/мл. Физико-химические свойства (содержа-

ние белка, электрофоретическая чистота, цветность, прозрачность, рН) лабораторных образцов АИГ также удовлетворяли требованиям, предъявляемым к выпускаемому препарату АИГ.

Рабочий цикл по получению пилотных серий антирабического иммуноглобулина с использованием культуральных технологий предварял этап разработки соответствующей производственно-технологической документации. Основными нормативными документами на производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина являются промышленный регламент и фармакопейная статья предприятия. Промышленный регламент устанавливает методы производства, технологические нормативы технические средства, условия и порядок проведения технологического процесса, обеспечивающий получение препарата с показателями качества, отвечающими требованиям фармакопейной статьи предприятия. Регламент также устанавливает безопасность ведения работ и достижение оптимальных технико-экономических показателей производственного процесса. Разработанный проект изменений в настоящий промышленный регламент включал изложение основных этапов изготовления культурального рабического антигена: пассирования клеточной культуры, подготовки клеточной культуры к криоконсервации, восстановления клеточной культуры после криоконсервации, культивирование вируса бешенства на клеточной культуре, концентрирование урожая культуральной биомассы методом тангенциальной ультрафильтрации. Помимо изложения новых технологических этапов, дополнения в действующий регламент описывают требования к используемой для репродукции производственного штамма вируса бешенства «Москва 3253» перевиваемой клеточной линии Vero, а также методы контроля на отсутствие микоплазм.

Требования к качеству выпускаемого препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина устанавливает соответствующая фармакопейная статья предприятия (ФСП). Данный документ содержит перечень показателей и методов контроля качества препарата с учетом технологии производства. Разработанный проект изменений в действующую ФСП на антирабический иммуноглобулин определяет требования к клеточной культуре для репродукции производственного штамма вируса бешенства. В проекте изменений в ФСП также приведено описание процедуры проведения тестирования антирабического иммуноглобулина, полученного с применением культуральных технологий, на отсутствие микоплазм в ПЦР с использованием коммерческой тест-системы для выявления микоплазм PCR Mycoplasma Kit («AppleChem», Германия) с последующей визуализацией продуктов ПЦР в агарозном геле с помощью системы «GelDoc 2000».

Использование новых этапов в технологическом процессе требует их обязательного документального описания непосредственно для самого оператора [7].

Подобное изложение подлежит оформлению в специальных документах – стандартных операционных процедурах (СОП). Целью СОП является стандартизация деятельности сотрудников, повышение их ответственности, а следовательно, обеспечение надлежащего качества выполнения технологической операции и получения качественного продукта. Составлению СОП предшествовала разработка соответствующих методических рекомендаций учрежденческого уровня, которые использовали для первичного обучения персонала выполнению соответствующей СОП и получения объективной оценки применимости требований данного документа и его соответствия требованиям практики. По итогам обучения были предложены рекомендации по оптимизации процессов или текста, согласно которым корректировали финальный вариант СОП. При разработке СОП на новые технологические этапы принимали во внимание рекомендации российских и зарубежных исследователей [3, 7, 14, 22], а также нормативные документы.

В рамках проведенных исследований на каждую производственную операцию с использованием клеточных культур составлен соответствующий проект СОП. Каждый проект СОП содержит следующую информацию: наименование учреждения и подразделения, для которого предназначается данный документ; название документа, которое должно отражать суть проводимой операции, фамилии автора, а также утверждающих должностных лиц и даты утверждения. В документе отражены цель процедуры и область ее применения в соответствии с особенностями деятельности производственного участка, для которого предназначена СОП; указаны материалы, оборудование и инструменты, используемые для выполнения процедуры. Инструкции выполнения СОП содержат всю необходимую информацию, включая ссылки на применяемую при разработке СОП литературу и нормативные документы. При этом в документе также отражены требования к квалификации и ответственности исполнителя данной СОП.

С учетом внесенных изменений в нормативную документацию были выпущены три пилотные серии антирабического иммуноглобулина. Получение антирабического иммуноглобулина осуществляли методом риванол-спиртового фракционирования иммунной сыворотки [6]. Осадок гамма-глобулиновой фракции растворяли в физиологическом растворе до конечной концентрации белка (10 ± 1) %. Очистку белкового раствора от посторонних примесей проводили с помощью разработанной системы каскадной фильтрации. Она состоит из нескольких баромембранных процессов: фильтрация через патронные мембранные элементы с размерами пор 0,80 и 0,45 мкм, ультрафильтрация на диализной колонке FX100 Fresenius Helixone, фильтрация через глубинные фильтры ZetaCarbon и ZetaPlus, конечная стерилизующая фильтрация через ацетатцеллюлозные мембраны 0,22 мкм. Данная система фильтрации позволяет получить стерильный антира-

бический иммуноглобулин, максимально очищенный от риванола, гемпигмента, пирогенов, остатков спирта, что в совокупности с биологическими показателями характеризует высокое качество выпускаемого препарата. Очищенный препарат был разлит в ампулы по 5 см³. Всего получено три пилотные серии общим объемом 8,2 дм³. Специфическая активность пилотных серий в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах составила 151, 160 и 165 МЕ/мл. Физико-химические и биологические свойства полученных пилотных серий антирабического иммуноглобулина, изученные в межлабораторных испытаниях, подтвердили соответствие полученных показателей требованиям нормативной документации на коммерческий препарат антирабического иммуноглобулина. Положительные результаты, полученные при проведении испытаний пилотных серий антирабического иммуноглобулина, подтверждают эффективность разработанной технологии получения культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов.

Таким образом, в результате выполнения исследований при реализации ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности» (2009–2014) по разработке и внедрению культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина достигнуты следующие целевые показатели:

опубликовано пять статей в журналах, рекомендованных ВАК;

разработано шесть методических рекомендаций учрежденческого уровня;

получен патент № 2511440 «Способ количественного определения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» [8];

защищена одна диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук;

разработаны проекты изменений в нормативную документацию на производство препарата «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций»;

разработаны проекты 26 стандартных операционных процедур;

получены три пилотные серии антирабического иммуноглобулина с применением культуральных технологий с учетом разработанных изменений в нормативную документацию.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников П.И., Грязин В.Н., Зайковская А.В. Современные проблемы бешенства животных. М.: КолосС; 2007. 81 с.
2. Брайт К., Каталевский Е.Е., Савельева С.П. Фильтрация кросс-флоу. Фармацевт. технол. и упаковка. 2009; 6: 47–51.
3. Вялков А.И., Воробьев П.А., Сура М.В., Авксентьева М.В. Стандартные операционные процедуры (СОПы) как один из элементов управления качеством медицинской помощи. *Пробл. стандартизации в здравоохран.* 2005; 7: 1–6.
4. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Свинцов Р.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Культуральный антиген в технологии по-

лучения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):65–8.

5. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Свинцов Р.А. Крупномасштабное культивирование фиксированного вируса бешенства штамма Москва 3253 на перевиваемой линии клеток Vero (B): методы и сравнительный анализ. *Биотехнол.* 2014; 5:38–43.

6. Губенко Т.Л., Смирнова В.И. Совершенствование риванол-спиртового метода получения гамма-глобулина. *Укр. биохим. журн.* 1963; 5:747–54.

7. Дьяконова Е.В., Рубан Т.И. Принципы организации документов СМК на предприятии-производителе лекарственных средств. *Сибирский мед. журн. (г. Томск)* 2011; 26(2-2):100–2.

8. Матвеева Ж.В., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Майоров Н.В., Никифоров А.К., Кутырев В.В. Способ количественного определения фиксированного вируса бешенства «Москва 3253». Патент 251177440 РФ. МПК C12Q1/06. Оpubл. 10.04.14. Бюл. № 10.

9. Каплан М.М., Копровский Н., редакторы. Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева: ВОЗ; 1975. 360 с.

10. Карпов С.П., Прегер С.М., Синельников Г.Е., Федоров Ю.В. Гипериммунные сыворотки. Томск; 1976. 380 с.

11. Мовсесянц А.А., Миронов А.Н., Ведерников В.А., Хадарцев О.С., Борисевич С.В. Проблема смертности людей от бешенства в Российской Федерации в 2010–2011 годах. *Ведомости ИЦ ЭСМП.* 2012; 3:48–52.

12. Морозова О.В., Гришечкин А.Е., Бахвалова В.Н., Исаева Е.И., Подчерняева Р.Я. Динамика репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток. *Вопр. вирусол.* 2012; 57(2):40–3.

13. Плеханов В.И., Одиноченко Н.Г., Макаров М.Л., Балашов А.В., Баранович С.Ю., Барабаш В.И., Плеханова Л.А. Лечение больных с укушенными ранами. *Усп. совр. естествознания.* 2006; 12:71–2.

14. Рeutская Л.А., Долголикова А.Н., Александрова Е.Л., Кугач В.В. Порядок разработки рабочих инструкций и операционных процедур. *Вестник фармации.* 2007; 3(37):10–5.

15. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 336 с.

16. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. М.: Библионика; 2007. 524 с.

17. Ситник Н.П., Загидуллин Н.В., Исрафилов А.Г., Еникеева Л.Ф., Мухачева А.В., Шафеева Р.С., Кунцевич Ю.Г., Петрова И.И. Способ получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки. Патент 2322503 РФ. МПК C12P 21/00, A61K 39/42. Оpubл. 20.04.08. Бюл. № 11.

18. Цетлин Е.М., Волкова В.А. Отработка оптимальной схемы учета результатов при применении иммуноферментной тест-системы для определения антигенной активности культуральной антирабической вакцины. *Вопр. вирусол.* 1996; 1:21–4.

19. Чернов С.М., Цетлин Е.М., Ботвинкин А.Д., Романова Л.Н. Результаты использования прямого твердофазного иммуноферментного анализа для оценки специфической активности антирабических вакцин. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1991; 5:30–3.

20. Consoles C.A., Valentini E., Albas A., Mendonca R., Fuches R., Soares M.A., Pereira C.A. The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use. *J. Biol. Stand.* 1988; 16: 27–32. DOI: 10.1016/0092-1157(88)90026-1.

21. Goel S.K., Sharma S., Singh U. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. *Biologicals.* 2003; 31:233–6. DOI: 10.1016/S1045-1056(03)00059-9.

22. Guidance for Preparing Standard Operating Procedures (SOPs). U.S. EPA; 2007. 60 p.

23. Karliner J.S., Belaval G.S. Incidence of reactions following administration of antirabies serum: a study of 526 cases. *JAMA.* 1965; 193: 359–62. DOI: 10.1001/jama.1965.03090050035009.

24. Kosinova E., Psikal I., Robesova B., Kovarcik K. Real-time PCR for quantitation of bovine viral diarrhoeavirus RNA using SYBR Green I fluorimetry. *Veterinarni medicina.* 2007; 52(6): 253–61.

25. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 469 p.

26. Luekrajana T., Wangsai J., Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin. In.: Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. P. 401–4.

27. Ozkan O., Aylan O., Ates C., Celebi B. Production of heterolog anti-rabies immune sera. *Etik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi.* 2004; 15:49–54.

28. Radonic A., Thulke S., Bae H., Müller M., Siebert W., Nitzsche A. Reference gene selection for quantitative realtime PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Cytomegalovirus and Cytomegalovirus infections. *Virol. J.* 2005; 2:7. DOI: 10.1186/1743-422X-2-7.

29. Silva A., Deldago I., Sousa M., Carrondo M., Alves P. Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petis ruminants vaccine. *Vaccine.* 2008; 2:3305–11. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.03.077.

30. WHO Expert Consultation on Rabies: second report. WHO technical report series 982. Geneva: WHO; 2013. 139 p.

31. Wilde H., Chomchey P., Prakongsri S., Puyaratabanhu P., Chutivongse S. Adverse effects of equine rabies immune globulin. *Vaccine*. 1989; 7:10–1. DOI: 10.1016/0264-410X(89)90003-0.

References

- Baryshnikov P.I., Gryazin V.N., Zaikovskaya A.V. [Current problems of rabies in animals]. M.: KolosS; 2007. 81 p.
- Brakht K., Katalevsky E.E., Savel'eva S.P. [Cross-flow filtration]. *Farmatsevt. Tekhnol. Upak.* 2009; 6:47–51.
- Vyal'kov A.I., Vorob'ev P.A., Sura M.V., Avksent'eva M.V. [Standard operational procedures (SOPs) as one of the tools of health care quality management]. *Probl. Standartiz. v Zdravookhran.* 2005; 7:1–6.
- Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Svintsov R.A., Komissarov A.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Cultural antigen in the technology for anti-rabies immunoglobulin obtainment from equine blood serum]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 4:65–8.
- Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Svintsov R.A. [Large-scale cultivation of fixed rabies virus, the strain Moscow 3253, on the finite Vero (B) cell line: methods and comparative analysis]. *Biotehnologiya*. 2014; 5:38–43.
- Gubenko T.L., Smirnova V.I. [Enhancement of rivanol-ethanol method for gamma-globulin obtainment]. *Ukr. Biokhim. Zh.* 1963; 5:747–54.
- D'yakonova E.V., Ruban T.I. [Principles of Quality Management System (QMS) protocol establishment at pharmaceutical product manufacturing enterprise]. *Sibirskii Med. Zh.(Tomsk)* 2011; 26(2-2):100–2.
- Matveeva Zh.V., Osina N.A., Bugorkova T.V., Abramova E.G., Generalov S.V., Mayorov N.V., Nikiforov A.K., Kutyrev V.V. [Method of fixed rabies virus "Moscow 3253" quantitation]. RF Patent 251177440. IPC C12Q1/06. 10.04.14.
- Kaplan M.M., Koprovsky N., editors. [Methods of Laboratory Studies on Rabies]. Geneva: WHO; 1976. 360 p.
- Karpov S.P., Preger S.M., Sinel'nikov G.E., Fedorov Yu.V. [Hyper-Immune Sera]. Tomsk; 1976. 380 p.
- Movsesyants A.A., Mironov A.N., Vedernikov V.A., Khadartsev O.S., Borisevich S.V. [The problem of human mortality from rabies virus in the Russian Federation in 2010–2011]. *Bulletin of the Scientific Center on Expertise of Medical Application Products*. 2012; 3:48–52.
- Morozova O.V., Grishechkin A.E., Bakhvalova V.N., Isaeva E.I., Podchernyaeva R.Ya. [Dynamics of reproduction of tick-borne encephalitis virus in cell cultures]. *Vopr. Virusol.* 2012; 57(2):40–3.
- Plekhanov V.I., Odinochenko N.G., Makarov M.L., Balashov A.V., Baranovich S.Yu., Barabash V.I., Plekhanova L.A. [Treatment of patients with bite wounds]. *Uspekhi Sovr. Estestvoznaniya*. 2006; 12:71–2.
- Reutskaya L.A., Dolgolikova A.N., Aleksandrova E.L., Kugach V.V. [Procedure for the development of operational instructions and operational procedures]. *Vestnik Farmatsii*. 2007; 3(37):10–5.
- Selimov M.A. [Rabies]. M.: Meditsina; 1978. 336 p.
- Sergeev V.A., Nepoklonov E.A., Aliper T.I. [Viruses and Viral Vaccines]. M.: Biblionika; 2007. 524 p.
- Sitnik N.P., Zagidullin N.V., Israfilov A.G., Enikeeva L.F., Mukhacheva A.V., Shafeeva R.S., Kuntsevich Yu.G., Petrova I.I. [Method for production of highly specific heterologous anti-rabies serum]. RF Patent 2322503. IPC C12P 21/00, A61K 39/42. 20.04.08.
- Tsetlin E.M., Volkova V.A. [Validation of the optimum scheme for registration of results on the application of immune-enzymatic test-system for determination of antigenic activity of cultural anti-rabies vaccine]. *Vopr. Virusol.* 1996; 1:21–4.
- Chernov S.M., Tsetlin E.M., Botvinkin A.D., Romanova L.N. [Effect of application of direct enzyme-linked immunoassay for the assessment of specific activity of anti-rabies vaccines]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1991; 5:30–3.
- Consales C.A., Valentini E., Albas A., Mendonca R., Fuches R., Soares M.A., Pereira C.A. The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use. *J. Biol. Stand.* 1988; 16: 27–32. DOI: 10.1016/0092-1157(88)90026-1.
- Goel S.K., Sharma S., Singh U. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. *Biologicals*. 2003; 31:233–6. DOI: 10.1016/S1045-1056(03)00059-9.
- Guidance for Preparing Standard Operating Procedures (SOPs). U.S. EPA; 2007. 60 p.
- Karliner J.S., Belaval G.S. Incidence of reactions following administration of antirabies serum: a study of 526 cases. *JAMA*. 1965;193: 359–62. DOI: 10.1001/jama.1965.03090050035009.
- Kosinova E., Psikal I., Robesova B., Kovarcik K. Real-time PCR for quantitation of bovine viral diarrhoeavirus RNA using SYBR Green I fluorimetry. *Veterinarni medicina*. 2007; 52(6): 253–61.
- Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 469 p.
- Luekrajana T., Wangsai J., Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin. In.: Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. P. 401–4.
- Ozkan O., Aylan O., Ates C., Celebi B. Production of heterolog anti-rabies immune sera. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 2004; 15:49–54.
- Radonic A., Thulke S., Bae H., Müller M., Siegert W., Nitsche A. Reference gene selection for quantitative realtime PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Cytomegalovirus and Cytomegalovirus infections. *Virology*. 2005; 2:7. DOI: 10.1186/1743-422X-2-7.
- Silva A., Deldago I., Sousa M., Carrondo M., Alves P. Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petis ruminants vaccine. *Vaccine*. 2008; 2:3305–11. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.03.077.
- WHO Expert Consultation on Rabies: second report. WHO technical report series 982. Geneva: WHO; 2013. 139 p.
- Wilde H., Chomchey P., Prakongsri S., Puyaratabanhu P., Chutivongse S. Adverse effects of equine rabies immune globulin. *Vaccine*. 1989; 7:10–1. DOI: 10.1016/0264-410X(89)90003-0.

Authors:

Abramova E.G., Generalov S.V., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K., Komissarov A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Комиссаров А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 05.10.15.