

**С.В.Генералов, Е.Г.Абрамова, Ж.В.Матвеева, И.М.Жулидов, О.А.Лобовикова, Л.В.Савицкая, Л.Н.Минаева, М.В.Галкина, Т.А.Михеева, А.В.Комиссаров, М.Н.Киреев, А.К.Никифоров**

### **ПОЛУЧЕНИЕ КРОЛИЧЬЕГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ КУЛЬТУРАЛЬНОГО АНТИГЕНА**

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Показана возможность применения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», репродуцированного на клеточной культуре Vero, в качестве антигена при получении гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Установлено, что наиболее рациональным представляется применение адьюванта – гидроксида алюминия. При этом специфические антитела к 73-му дню иммунизации накапливаются в титре не ниже 1:500 (специфическую активность определяли в реакции нейтрализации на белых мышах и в дот-иммуноанализе). Уровень специфической активности экспериментальных образцов антирабического иммуноглобулина, выделенных из иммунной кроличьей сыворотки, соответствует 332 и 347 МЕ/мл. Физико-химические и биологические свойства антирабического иммуноглобулина, полученного по технологии с использованием культурального антигена, удовлетворяют требованиям нормативной документации на коммерческий препарат гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

*Ключевые слова:* антирабический иммуноглобулин, вирус бешенства, культура клеток.

**S.V.Generalov, E.G.Abramova, Zh.V.Matveeva, I.M.Zhulidov, O.A.Lobovikova, L.V.Savitskaya, L.N.Minaeva, M.V.Galkina, T.A.Mikheeva, A.V.Komissarov, M.N.Kireev, A.K.Nikiforov**

### **Production of Rabbit Anti-Rabies Immunoglobulin Using Cultural Antigen**

*Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov*

Justified is the possibility of application of fixed rabies virus “Moscow 3253”, reproduced on the cell culture Vero, as an antigen for heterologous anti-rabies immunoglobulin production. Application of the adjuvant – aluminium hydrate – is determined to be effective. Herein, by the day 73 post immunization, specific antibodies titer is  $\geq 1:500$  (wherein specific activity has been identified by means of neutralization test, carried out on white mice, and dot-blot immunoassay). The level of specific activity in experimental samples of anti-rabies immunoglobulin, isolated from rabbit immune serum, corresponds to 332 and 347 ME/ml. Physicochemical and biological properties of anti-rabies immunoglobulin, produced with the help of cultural antigen, fully comply with regulatory requirements specified for commercial preparation of heterologous anti-rabies immunoglobulin.

*Key words:* anti-rabies immunoglobulin, rabies virus, cell culture.

Вирус бешенства способен вызвать у человека и животных неизлечимое заболевание, которое, по оценке ВОЗ, входит в группу инфекционных болезней, наносящих значительный ущерб экономике и здравоохранению. В Российской Федерации, по данным Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, ежегодно за антирабической помощью обращаются 430–470 тыс. человек, больше половины из них получают специфическое антирабическое лечение. Для специфической профилактики бешенства используют антирабические вакцины и иммуноглобулин, в производстве которых применяют фиксированные штаммы вируса бешенства. В мировой биотехнологической практике антирабический иммуноглобулин (АИГ) производят из гипериммунной сыворотки человека или животных. В России широкое применение имеет препарат гетерологичного антирабического иммуноглобулина, полученный из лошадиной сыворотки. В настоящее время многие производители гетерологичного АИГ, в том числе и институт «Микроб», в качестве иммунизирующего материала применяют антиген на

основе инактивированного фиксированного вируса бешенства, полученного из мозговой ткани животных [15].

Отрицательной стороной применения подобного антигена является накопление в сыворотке крови продуцентов антител к мозговой ткани, которые могут быть причиной нежелательных явлений [6, 15]. Для их устранения рекомендуется на этапе иммунизации продуцентов использовать фиксированный вирус бешенства, выращенный на культуре животных клеток. К настоящему времени для получения культурального антигена предложены первичнотрипсинизированные и перевиваемые клетки почек сирийского хомяка [9, 11], куриные фибробласты [10], клетки почечного эпителия зеленой мартышки (Vero) [7, 10, 14].

Задачей исследования явилась разработка альтернативного способа получения гетерологичного антирабического иммуноглобулина с использованием антигена, полученного на основе репродуцированного на перевиваемой клеточной линии Vero вируса бешенства «Москва 3253». Выбор субстрата для культивирования вируса обусловлен тем, что данная

клеточная линия безопасна для человека и используется в России для производства МИБП.

### Материалы и методы

Фиксированный вирус бешенства (штамм «Москва 3253») выращивали на перевиваемой клеточной линии Vero суспензионным методом с использованием биореактора BioG-M Plus («BioTron», Корея) вместимостью 5 л. К предварительно выращенной в биореакторе суспензии клеток Vero добавляли вирусосодержащую жидкость, заражающая доза при этом составила 0,2 ЛД<sub>50</sub> на 1 клетку. Для культивирования клеток Vero использовали среду Игла MEM с 10 % содержанием сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», Россия); вируса бешенства – среду 199 («Биолот», Россия) с содержанием человеческого сывороточного альбумина 0,1 % и антибиотиков (пенициллин – 100 ЕД/мл, стрептомицин 0,1 мг/мл). Выращивание проводили при температуре 32 °С и рН 7,2 в течение 72 ч, затем вирусосодержащую суспензию собирали в стерильную посуду и инактивировали фенолом в конечной концентрации 0,5 % при 37 °С в течение 24 ч согласно действующим методическим указаниям МУ 3.3.1.1099-02 «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства». Удаление клеточного дебриса осуществляли предварительным осаждением и фильтрацией жидкости через ацетатцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 и 0,2 мкм. Вирусосодержащую жидкость концентрировали методом тангенциальной ультрафильтрации с помощью фильтрационной установки Vivaflow 200 («Sartorius», Германия), снаряженной полипропиленовой мембраной с номинальной отсечкой по молекулярной массе 300 кДа, с площадью фильтрации 0,2 м<sup>2</sup>.

Полученный концентрат использовали для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки – кроликов *Oryctolagus cuniculus* породы «шиншилла». Животных иммунизировали подкожно в объеме 1 мл на 0, 7, 21, 28, 52, 59-е сутки. Титр вируснейтрализующих антител определяли на 42 и 73-е сутки. Аналогичную схему иммунизации применяли при использовании адъювантов: гидроксида алюминия и полиоксидония.

Фракционирование специфических антител осуществляли риванол-спиртовым методом [4]. Осадок иммуноглобулина растворяли в физиологическом растворе до конечной концентрации 10,0 %. Для получения высокоочищенного раствора иммуноглобулина проводили предварительную фильтрацию через ацетатцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,8 и 0,45 мкм. Для улучшения показателей цветности и прозрачности осуществляли фильтрацию через глубинные фильтры Zeta Plus («CUNO», Франция). Для стерилизации жидкого раствора иммуноглобулина осуществляли его фильтрацию через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Специфическую активность антирабической сыворотки и иммуноглобулина определяли *in vitro* в дот-иммуноанализе [8] и *in vivo* в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах [13]. Подсчет титра нейтрализующих антител проводили по методу Reed и Muench [13]. Физико-химические свойства иммуноглобулина исследовали согласно МУК 4.1/4.2588-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям». Статистический анализ полученных результатов проводили по общепринятым методам [1].

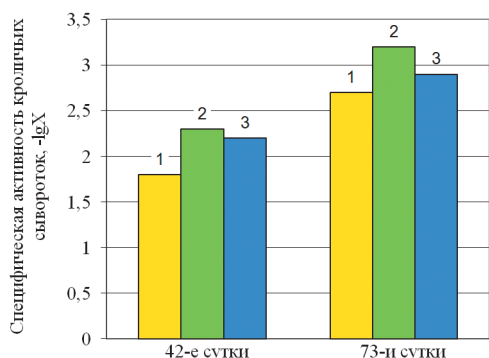
### Результаты и обсуждение

На активность гипериммунной сыворотки существенное влияние оказывают качество и доза вирусного антигена, способ и частота его введения. При расчете иммунизирующей дозы исходили из того, что уровень содержания вирусных частиц в исследуемой культуральной жидкости должен быть близок такому в антигене органо-тканевого происхождения, применяемому в настоящее время в производстве гетерологичного АИГ. Количество вирусных частиц в культуральном антигене оценивали по содержанию в материале вирусной РНК методом количественной ПЦР. В антигене органо-тканевого происхождения содержание вирусной РНК составило 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> копий/мл. Аналогичная концентрация вирусной РНК в культуральном антигене была достигнута в процессе концентрирования вирусосодержащей культуральной жидкости методом тангенциальной ультрафильтрации [3]. Выбор интервала между инъекциями и способ введения антигена обусловлены опытом и рекомендациями как отечественных, так и зарубежных исследователей [6, 7, 10, 12].

Для изучения возможности повышения специфической активности антирабической сыворотки исследовали действие адъювантов: гидроксида алюминия и полиоксидония. Гидроксид алюминия традиционно применяют в производстве вакцин. Благодаря высокой способности к сорбции он выполняет функцию антигенного депо, а также неспецифически усиливает фагоцитоз [5].

Полиоксидоний представляет собой N-оксидированное производное полиэтиленпиперозина с высокой молекулярной массой [5]. Полиоксидоний не обладает антигенными свойствами, не оказывает аллергизирующего, мутагенного и канцерогенного действия. Введение антигена в сочетании с полиоксидонием обеспечивает высокий гуморальный ответ даже у низкореагирующих особей. В настоящее время полиоксидоний применяют в производстве гриппозной вакцины [5]. Сотрудниками ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ФГБУ «НЦ ЭСМП») показан адъювантный эффект полиоксидония при его введении белым мышам совместно с культуральной антирабической вакциной отечественного производства [2].

Уровень антителообразования в ответ на введение рабического антигена изучен на трех груп-



Специфическая активность кроличьих антирабических сывороток, полученных с применением культурального антигена:

1 – группа животных, иммунизированных культуральным рабическим антигеном без адьюванта; 2 – группа животных, иммунизированных культуральным рабическим антигеном с гидроксидом алюминия (3 мг/мл); 3 – группа животных, иммунизированных культуральным рабическим антигеном с полиоксидонием (1,5 мг/мл)

пах животных. Первую группу иммунизировали культуральным антигеном без адьюванта, вторую и третью – культуральным антигеном, содержащим гидроксид алюминия (3 мг/мл) или полиоксидоний (1,5 мг/мл) соответственно. На рисунке показана зависимость изменения титра антител в кроличьей сыворотке от используемого адьюванта.

Анализ *in vitro* специфической активности антирабической сыворотки, полученной на 42-е сутки иммунизации, показал, что оба адьюванта (гидроксид алюминия и полиоксидоний) способствовали усилению продукции антител. При этом у второй группы животных, иммунизированных антигеном с гидроксидом алюминия, наблюдали самый высокий уровень антител – (1:160 – 1:320) или  $-\lg(X \pm x) = (2,3 \pm 0,3)$ . Значения специфической активности сывороток у первой и третьей группы были соответственно равны (1:40 – 1:80), или  $-\lg(X \pm x) = (1,8 \pm 0,3)$ , и 1:160, или  $-\lg(X \pm x) = (2,2 \pm 0,0)$ . К 73-м суткам уровень титра антител возрос во всех опытных группах, наиболее высокую активность также проявляли сыворотки, полученные от второй группы животных – (1:1280 – 1:2560), или  $-\lg(X \pm x) = (3,2 \pm 0,3)$ . У первой и третьей групп значения специфической активности сывороток составили (1:320 – 1:640),

или  $-\lg(X \pm x) = (2,7 \pm 0,3)$ , и (1:640 – 1:1280), или  $-\lg(X \pm x) = (2,9 \pm 0,3)$ . Анализ полученных результатов свидетельствует о возможности использования культурального антигена для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки и целесообразности применения адьювантов. При этом наиболее рациональным представляется использование в качестве адьюванта гидроксида алюминия, хотя следует отметить тенденцию к увеличению образования антител при применении полиоксидония.

Следующим этапом явилось получение экспериментальных образцов антирабического иммуноглобулина из исследованных образцов иммунной кроличьей сыворотки с наиболее высокими титрами. Дополнительно вируснейтрализующая активность данных сывороток была изучена *in vivo*. По данным реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышцах, значения специфической активности иммунных сывороток находилось в пределах 1:513–1:640 (10–13 МЕ/мл). Были получены две экспериментальные серии АИГ.

Экспериментальные серии кроличьего антирабического иммуноглобулина были изучены по основным биологическим и физико-химическим параметрам. Согласно требованиям нормативной документации PN 002639/01-250210 на препарат АИГ, получаемый из лошадиной сыворотки, уровень его специфической активности не должен быть ниже 150 МЕ при исследовании в реакции нейтрализации вируса бешенства в количестве от 100 до 1000 LD<sub>50</sub>/0,03 мл. Уровень специфической активности образцов АИГ, полученных из кроличьей сыворотки, составляет 332 и 347 МЕ/мл (при титре антител соответственно 1:8786 и 1:9190).

Физико-химические показатели: рН, электрофоретическая чистота, прозрачность, цветность также соответствовали требованиям нормативной документации, предъявляемым к коммерческому препарату гетерологичного АИГ (таблица).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получены образцы АИГ из сыворотки кроликов, иммунизированных культуральным рабическим антигеном. Физико-химические свойства и уро-

Характеристика физико-химических и биологических свойств АИГ, полученного из сыворотки кроликов, иммунизированных культуральным антигеном

Показатель	Образец 01	Образец 02	Требования НД PN 002639/01-250210
Специфическая активность в реакции нейтрализации, МЕ/мл	332	347	Не менее 150
Специфическая активность в дот-иммуноанализе	1:5000 – 1:10000	1:5000 – 1:10000	—
Содержание белка, %	10,0	10,0	10,0±1,0
рН	7,2	6,8	7,0±0,4
Электрофоретическая чистота	Фракция γ-глобулина – не менее 90 %; наличие α,β-глобулинов – не более 10 % Альбумин отсутствует	Фракция γ-глобулина – не менее 90 %; наличие α,β-глобулинов – не более 10 % Альбумин отсутствует	Фракция γ-глобулина – не менее 80 %; наличие примесей – α,β-глобулинов – не более 20 % Альбумин отсутствует
Прозрачность	0,05	0,04	Не более 0,05
Цветность	0,14	0,13	Не более 0,15

вень специфической активности исследуемых образцов удовлетворяют требованиям НД РН 002639/01-250210 на коммерческий препарат гетерологического АИГ. Положительный опыт получения АИГ из иммунной сыворотки кроликов свидетельствует о необходимости дальнейших исследований в разработке технологии получения культурального рабического антигена и возможности его применения для иммунизации лошадей – более крупных продуцентов антирабической сыворотки.

Работа выполнена по государственному контракту № 73-Д от 25.07.2011 в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)»

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962. 180 с.
2. Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Акользина С.Е., Медуницын Н.В. Иммуноадьювантный эффект цитокинов. Тихоокеанский медицинский журнал. 2009; 3:19–22.
3. Брахт К., Катаевский Е.Е., Савельев С.П. Фильтрация кросс-флоу. Фармацевтические технологии и упаковка. 2009; 6:47–51.
4. Карпов С.Н., Прегер С.М., Синельников Г.Е., Федорова Ю.В. Гипериммунные сыворотки. Томск; 1976. 380 с.
5. Медуницын Н.В., Покровский В.И. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005. 512 с.
6. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 336 с.
7. Ситник Н.П., Загидуллин Н.В., Исрафилов А.Г., Еникеева Л.Ф., Мухачева А.В., Шафеева Р.С. и др. Способ получения высокоспецифичной гетерологической антирабической сыворотки. Патент РФ 2322503, опубл. 20.04.2008. Бюл. № 11.
8. Шарипова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Михеева Т.А., Галкина М.В., Краснов Я.М. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологического антирабического иммуноглобулина *in vitro* в до-иммуноанализе. Probl. osobo opasnkh inf. 2010; 1(103):63–6.
9. Conales C.A., Valentini E.J.G., Albas A., Mendonca R., Fuches R., Soares M.A. et al. The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use. J. Biol. Stand. 1988; 16:27–32.
10. 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.
11. Lepine P., Atanasiu P. Производство лечебной антирабической сыворотки на животных. Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева: ВОЗ; 1975. С. 295–300.
12. Luekrayan T., Wangsai J., Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. P. 401–4.
13. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowsky H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 469 p.
14. Ozkan O., Aylan O., Ates C., Celebi B. Production of heterolog anti-rabies immune sera. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 2004. 15: 49–54.
15. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO technical report series 931. Geneva: WHO; 2004. 121 p.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: 1962. 180 p.
2. Avdeeva Zh.I., Alpatova N.A., Akol'zina S.E., Medunitsyn N.V. [Immune-adjutant effect of cytokines]. Tikhookeansky Meditsinsky Zhurnal. 2009; 3:19–22.
3. Brakht K., Katalevsky E.E., Savel'ev S.P. [Cross-flow filtration]. Farmatsevt. Tekhnol. Upakovka. 2009; 6:47–51.
4. Karpov S.N., Preger S.M., Sinel'nikov G.E., Fedorova Yu.V. [Hyperimmune Sera]. Tomsk; 1976. 380 p.
5. Medunitsyn N.V., Pokrovsky V.I. [Fundamental Concepts of Immune Prophylaxis and Immune Therapy as Related to Infectious Diseases]. M.: GEOTAR-Media; 2005. 512 p.
6. Selimov M.A. [Rabies]. M.: Meditsina; 1978. 336 p.
7. Sitnik N.P., Zagidullin N.V., Israfilov A.G., Enikeeva L.F., Mukhacheva A.V., Shafееva R.S. et al. [Method of preparation of heterologous anti-rabies serum]. RF Patent 2322503.
8. Sharapova N.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Kireev M.N., Savitskaya L.V., Minaeva L.N., Mikheeva T.A., Galkina M.V., Krasnov Ya.M. [Activity test for anti-rabies sera and heterologous anti-rabies immunoglobulin preparation *in vitro* using dot-blot immunoassay]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 103:63–6.

#### Authors:

Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Savitskaya L.V., Minaeva L.N., Galkina M.V., Mikheeva T.A., Komissarov A.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Михеева Т.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 10.11.11.