

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ПРОТИВОСИБИРЕЯЗВЕННОГО ВНУТРИВЕННОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКАДолматов В.Ю.¹, Дробкова А.В.¹,Погорельский И.П.², Мальцева О.В.¹,Шевцов А.Н.², Елагин Г.Д.², Белова Е.В.³,Боровской Д.В.², Карпова М.В.¹,Вершинина О.А.¹, Блинова Е.А.¹, Лютов А.Г.⁴, Шарыгин С.Л.¹¹ФГУ «Кировский НИИ гематологии и переливания крови», Киров, Россия²ФГУ «48 Центральный НИИ Министерства обороны РФ», Киров, Россия³ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Россия⁴ЗАО «Иммуно-Гем», Москва, Россия

Одной из научных проблем современной инфектологии является совершенствование медицинской помощи людям, заражённым сибирской язвой. С целью её решения начата фармацевтическая разработка патогенетического лекарственного препарата – противосибирезвеного внутривенного иммуноглобулина человека (ВВИГ). Многолетний опыт создания и применения специфичных ВВИГ различной направленности, требования к эффективности и безопасности современных иммуноглобулинов, сведения о патогенезе сибирской язвы позволили сформулировать **дизайн разработки**: иммунологически активная белковая фракция, выделенная из плазмы крови доноров, содержащая терапевтически значимое количество антител к протективному антигену (ПА) сибирезвеного микроба, безопасная в плане передачи гемотрансмиссивных инфекций и пригодная для внутривенного введения.

Кадровых доноров, давших письменное информированное согласие на участие в исследовании, по мере прохождения медицинского осмотра делили на две группы и иммунизировали однократно подкожно в объеме 0,5 мл «Вакциной сибирезвеной комбинированной сухой и жидкой для подкожного применения» производства ФГУ «48 Центральный НИИ Министерства обороны РФ» (ЦНИИ МО). Донорам первой группы (38 человек) вводили вакцину серии 1/02 (сухая форма), донорам второй группы (23 человека) – вакцину серии 5/02 (жидкая форма). Уровень антител к ПА *Bacillus anthracis* в сыворотке крови иммунизированных людей определяли методом непрямого гетерогенного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением «Тест-системы иммуноферментной для определения титров антител к протективному антигену сибирезвеного микроба в сыворотке крови человека», разработанной сотрудниками ЦНИИ МО. После регистрации целевых антител в титре не менее 1:200 осуществляли заготовку плазмы методом плазмафереза; плазму немедленно замораживали и хранили при температуре не выше минус 20 °С.

Из 12 порций иммунной плазмы, выбранных случайным образом, этанольным методом в лабораторных условиях были получены 6 образцов раствора иммуноглобулинов, содержащего антитела к ПА *B. anthracis*. Изучение уровня целевых антител в технологических растворах на всех стадиях фракционирования, а также определение основных биохимических параметров конечного раствора иммуноглобулинов позволили сделать заключение о стабильности целевых антител в условиях технологического процесса и возможности их концентрации этанольным методом. На основании данных литературы и результатов определения превентивных свойств полученного раствора иммуноглобулинов в эксперименте на мышах установлено минимальное и достаточное содержание антител к ПА *B. anthracis* в разрабатываемом противосибирезвеном ВВИГ и иммунной плазме. Готовый препарат должен содержать целевые антитела в титре не менее 1:1600, а исходная плазма – не менее 1:400 в ИФА.

Антитела к ПА *B. anthracis* в титре 1:400 или выше, то есть на значимом уровне, были выявлены у 70 % иммунизированных доноров. Средняя суммарная продолжительность регистрации целевых антител в титре не менее 1:400 составила 8 недель, при этом динамика их содержания по результатам 20-недельного мониторинга имела амплитудно-затухающий характер. Ввиду того, что уровень целевых антител периодически снижался до незначимых титров, с целью облегчения определения сроков, благоприятных для заготовки иммунной плазмы, был разработан алгоритмизированный график обследования доноров. График позволяет минимизировать количество предварительных исследований специфической активности крови доноров и заготовить максимально возможный объём иммунной плазмы. Следуя графику, можно дифференцировать доноров в зависимости от их иммунореактивности в отношении первичной иммунизации комбинированной сибирезвеной вакциной на четыре категории. Относительное количество доноров каждой категории, а также средняя продолжительность регистрации целевых антител на значимом уровне в первой и второй группах доноров были попарно сопоставимы, что указывает на отсутствие существенных различий между применением для иммунизации сухой и жидкой форм вакцины.

Рациональность категорирования доноров была подтверждена результатами ревакцинации, проведённой не менее чем через 13 месяцев после первичной иммунизации. «Вакцину сибирезвеною живую сухую для подкожного и скарификационного

применения» серии 185 производства ЦНИИ МО вводили однократно подкожно в объёме 0,5 мл. На протяжении 36 недель (срок наблюдения) содержание антител к ПА *B. anthracis* в крови доноров с ранним ответом было равно или превышало аналогичной показатель в категории доноров с поздним ответом и ни разу не опустилось ниже значимого уровня. В то же время уровень целевых антител в крови доноров с поздним ответом периодически снижался до незначимых титров, а средняя суммарная продолжительность регистрации титров 1:400 или выше составила лишь 23 недели.

Изучение изменения специфической активности в процессе хранения образцов сыворотки, заготовленных при предварительных осмотрах иммунизированных доноров, позволило сделать заключение о стабильности антител к ПА *B. anthracis* в течение 12 месяцев при температуре не выше минус 30 °С.

Из 172 л иммунной плазмы методом этанольного фракционирования были получены 3 экспериментально-производственные серии препарата: серии №№ 1 и 2 - с применением пепсинолиза, серия № 3 - с применением инкубации раствора иммуноглобулинов в кислой среде. Параметры всех серий, в том числе показатели внутривенной толерантности и вирусбезопасности, соответствовали общепринятым нормам качества ВВИГ. По результатам ИФА серии №№ 1 и 2 содержали антитела к ПА *B. anthracis* в титре 1:1600, серия № 3 - в титре 1:3200. Уровень антител был стабилен в течение 31 месяца (срок наблюдения) при температуре от 2 до 6 °С. По результатам иммуноблоттинга и непрямого гетерогенного ИФА с использованием рекомбинантных антигенных детерминант сибиреязвенного микроба, полученных сотрудниками ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ГНЦ ПМБ), все серии содержали антитела к третьему и четвёртому доменам ПА, а также к летальному фактору (ЛФ) *B. anthracis*. Изучение изменения специфической активности в процессе лиофилизации экспериментальных образцов позволило сделать предварительное заключение о возможности получения сухой лекарственной формы препарата.

Противосибиреязвенная антитоксическая активность ВВИГ была оценена в МТТ-тесте на культуре клеток J774A.1, чувствительных к летальному токсину *B. anthracis*. Летальный токсин конструировали из полноразмерных рекомбинантных ПА и ЛФ, полученных сотрудниками ГНЦ ПМБ. Серии препарата №№ 1 и 2 нейтрализовали токсин в разведении 1:5, серия № 3 - в разведении 1:80.

Лечебную и профилактическую эффективность препарата изучали в экспериментах на животных (морских свинках и кроликах). Препаратом сравнения служил «Глобулин противосибиреязвенный лошадиный жидкий» серии 33 производства ЦНИИ МО. Морским свинкам вводили подкожно по 4 мл противосибиреязвенного ВВИГ или по 2 мл препарата сравнения. Через 24 ч животных заражали подкожным введением 50 LD₅₀ штамма 71/12 *B. anthracis* в объёме 1 мл. На 10 сутки в опытной группе выжило 50 % животных, в группе сравнения - 67 %. Животные контрольной группы пали. Кроликов заражали подкожным введением 10 LD₅₀ штамма Ч-7 *B. anthracis* в объёме 1 мл. Через 24 ч животным опытной группы вводили внутривенно по 2,4 мл исследуемого препарата, животным группы сравнения - по 1,2 мл препарата сравнения внутримышечно. Препараты в указанных дозах вводили ежедневно в течение 5 суток. На 15 сутки в опытной группе выжило 33 % животных, в группе сравнения - 50 %. Животные контрольной группы пали.

Эффективность противосибиреязвенного ВВИГ в комплексной терапии была изучена в опыте на кроликах. Животных заражали подкожным введением 50 LD₅₀ штамма Ч-7 *B. anthracis* в объёме 1 мл. Через 24 ч животным опытной группы вводили внутривенно по 2,4 мл исследуемого препарата и по 560 мг ампициллина внутримышечно, животным первой группы сравнения - по 1,2 мл препарата сравнения и по 560 мг ампициллина внутримышечно, животным второй группы сравнения - по 560 мг ампициллина внутримышечно. Препараты в указанных дозах вводили 2 раза в сутки в течение 5 дней. На 30 сутки в опытной группе выжило 60 % животных, в первой группе сравнения - 60 %, во второй группе сравнения - 20 %. Животные контрольной группы пали.

Таким образом, в результате проведённых исследований получены экспериментальные образцы нового антитоксического лекарственного средства - противосибиреязвенного ВВИГ, обладающего лечебной и профилактической эффективностью; начато формирование регистрационного досье препарата.