

На правах рукописи

ДОЛМАТОВ Владимир Юрьевич

**ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТИВОСИБИРЕЯЗВЕННЫХ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ЧЕЛОВЕКА
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

03.00.23 – биотехнология
14.00.29 – гематология и переливание крови

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Киров - 2008

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи»

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор С.Л. Шарьгин

доктор биологических наук А.Г. Лютов

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор В.Н. Мигунов

доктор медицинских наук, профессор А.В. Степанов

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека»

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2008 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 Федерального государственного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора»

Автореферат разослан «_____» _____ 2008 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

С.Ю. Комбарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Сибирская язва – тяжёлое инфекционное заболевание, внимание к которому и в России, и во всем мире в последнее время значительно возросло, что связано, в первую очередь, с угрозой биотерроризма, уже нашедшей практическое воплощение на территории США [Jernigan J.A. et al., 2001, Pittman P.P. et al., 2005]. Споры возбудителя сибирской язвы – *Bacillus anthracis* - с точки зрения большинства представителей военных ведомств и антитеррористических организаций, на сегодняшний день представляют собой наиболее опасное самостоятельное биологическое оружие [Рубинштейн Э., 2001]. Кроме того, остаётся высокой вероятность возникновения эпидемий инфекции в результате активизации широко распространённых почвенных резервуаров сибиреязвенного микроба [Пименов Е.В. с соавт., 2000].

Основным средством лечения сибирской язвы у людей в настоящее время являются антибактериальные препараты [Онищенко Г.Г. с соавт., 1999]. Однако даже при использовании антибиотиков последнего поколения, передовых методов диагностики и высокотехнологичного оборудования смертность при лёгочной форме инфекции достигает 45 % [Spencer R.C., 2003]. Проведение интенсивной химиотерапии может вызывать ряд неблагоприятных побочных эффектов вплоть до летального исхода вследствие масштабного высвобождения токсина при разрушении клеток возбудителя [Hanna P., 1999, Collier R.J. et al., 2003]. Единственный производимый в настоящее время антитоксический препарат – «Глобулин противосибиреязвенный лошадиный жидкий» - предназначен для внутримышечного введения, поэтому его применение не позволяет достичь быстрого нарастания антител в крови реципиента до защитного уровня. Современная научная разработка, направленная на ферментативное расщепление молекул иммуноглобулина, содержащихся в препарате, и выделение иммунохимически чистых (Fab)₂-фрагментов, может привести к созданию антитоксического лекарственного средства, пригодного для внутривенного введения [Маринин Л.И. и соавт., 1999]. Однако любые гетерогенные

сывороточные препараты обладают сенсibiliзирующими свойствами и способны вызывать у людей анафилактические реакции [Шарыгин С.Л., 1997].

Мировой опыт разработки и применения специфичных внутривенных иммуноглобулинов человека (ВВИГ) свидетельствует об их высокой эффективности и ареактогенности при лечении тяжёлых инфекционных заболеваний различной этиологии [Сапожникова В.С., 1990, Мальцева О.В., 2002, Шкуратова О.В., 2002, Arnon S.S. et al., 2006], поэтому актуальность создания аллогенного антитоксического противосибирезвенного иммуноглобулина, пригодного для внутривенного введения, не вызывает сомнений. Основой нового препарата могут стать антитела к протективному антигену (ПА) *B. anthracis* – единственной антигенной детерминанте сибирезвенного микроба, иммуногенные свойства которой однозначно доказаны [Cote С.К. et al., 2003]. Определённый интерес представляет также разработка комплексного препарата для энтерального применения, содержащего иммуноглобулины трёх основных классов с антительной активностью в отношении ПА.

Цель исследования - получение экспериментальных образцов противосибирезвенных иммуноглобулиновых препаратов из плазмы крови человека и изучение их биологических свойств.

Задачи исследования

1. Оценить возможность выделения антител человека к протективному антигену *B. anthracis* из донорской плазмы, определить минимальную специфическую активность иммунного сырья, достаточную для получения противосибирезвенных препаратов.

2. Изучить динамику гуморального ответа доноров на иммунизацию комбинированной сибирезвенной вакциной и ревакцинацию живой вакциной, установить возможный период заготовки и условия хранения иммунной плазмы.

3. Получить из иммунной плазмы по трём различным технологическим схемам концентраты иммуноглобулинов, пригодные для внутривенного и энтерального применения, и определить их биохимические параметры.

4. Изучить спектр антител к различным антигенным детерминантам сибиреязвенного токсина и оценить токсиннейтрализующую активность полученных экспериментальных образцов препаратов *in vitro*.

5. Определить профилактическую и лечебную эффективность внутривенного иммуноглобулина в эксперименте на животных.

Основные этапы работы выполнены в рамках договора № 10-д-2002 от 01.07.02 г. между ФГУ «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий» (КНИИГиПК) и ФГУ «48 Центральный НИИ Минобороны России» (ЦНИИ МО) о совместном научном исследовании «Разработка технологий и создание аппаратурно-технических линий по производству препаратов против сибирской язвы», а также в рамках научно-исследовательской работы КНИИГиПК по созданию специфичных иммуноглобулинов человека для внутривенного введения (номер государственной регистрации комплексной темы 01200604343).

Научная новизна

Впервые показана возможность получения аллогенного противосибиреязвенного иммуноглобулина, пригодного для внутривенного введения, из плазмы иммунизированных доноров. По материалам исследования подана заявка на патент Российской Федерации «Иммуноглобулин человека противосибиреязвенный для внутривенного введения» № 2006129089/20/03/608, приоритет от 10.08.06 г.

Установлен минимальный уровень антител к протективному антигену *B. anthracis* в сырье для получения препарата. Охарактеризована динамика содержания антител в крови доноров, иммунизированных сибиреязвенными вакцинами. Оценена стабильность специфической активности плазмы при хранении.

Показано, что экспериментальные образцы иммуноглобулинов содержат антитела к различным антигенным детерминантам сибиреязвенного токсина. В опыте на культуре клеток определена токсиннейтрализующая активность препаратов.

Доказана профилактическая и лечебная эффективность внутривенного

иммуноглобулина в эксперименте.

Практическая значимость работы

Определены требования к иммунному сырью и условия его хранения. Показана возможность использования трёх технологических схем выделения антител из донорской плазмы для получения противосибирезвенных иммуноглобулиновых препаратов для внутривенного и энтерального применения.

Внедрение результатов исследования в практику

Отработана технология получения иммуноглобулина для внутривенного введения с применением метода инкубации в кислой среде, утверждён производственный регламент ПР-18756307-02-06.

Укомплектована технологическая линия производства специфичных внутривенных иммуноглобулинов человека в отделе препаратов крови ФГУ «КНИИГиПК Росмедтехнологий».

Проведено аппаратное оснащение экспериментально-производственной лаборатории фракционирования плазмы ЗАО «Иммуно-Гем», сформирована линия по выпуску «Иммуноглобулинового комплексного препарата» (ПР-18756307-03-06) и налажено его промышленное производство.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Однократная вакцинация доноров комбинированной сибирезвенной вакциной обеспечивает образование антител к протективному антигену *B. anthracis* в титре не менее 1:400 у 69 % людей. Заготовку иммунной плазмы целесообразно начинать с пятой недели после иммунизации.

2. Технология этанольного фракционирования донорской плазмы с последующим пепсинолизом полупродукта или его инкубацией в кислой среде позволяет получать иммуноглобулиновые препараты, пригодные для внутривенного введения и содержащие антитела к третьему, четвёртому доменам протективного антигена, а также к летальному фактору сибирезвенного микроба.

3. Образцы внутривенного иммуноглобулина при профилактическом и лечебном применении в эксперименте обладают защитным эффектом, сравнимым с действием гипериммунного лошадиного противосибирезвенного препарата.

Апробация работы

Диссертация апробирована на расширенной научно-лабораторной конференции ФГУ «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий» 22.05.08 г.

Основные результаты работы доложены на научной конференции «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины» (г. Киров, 2005 г.), научно-практической конференции молодых учёных «Вопросы трансфузиологии и клинической медицины» (г. Киров, 2007 г.), Российской научно-практической конференции «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (г. Санкт-Петербург, 2007 г.) и Всероссийском совещании «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины (Епифановские чтения)» (г. Киров, 2008 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 работ.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 105 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, трёх глав с изложением результатов собственных исследований, заключения и выводов. Список литературы включает 119 источников, из них 75 отечественных и 44 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 22 рисунками и 21 таблицей.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Иммунизация доноров коммерческими сибиреязвенными вакцинами разрешена Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (письмо № 81-07/47 от 12.03.01 г.). Кадровым донорам станции переливания крови КНИИГиПК, давшим письменное информированное согласие на вакцинацию и прошедшим медицинский осмотр, вводили «Вакцину сибиреязвенную комбинированную сухую и жидкую для подкожного применения» серии 1/02 или 5/02 производства ЦНИИ МО. Всего иммунизирован

61 донор. При ревакцинации использовали «Вакцину сибиреязвенную живую сухую для подкожного и скарификационного применения» серии 185 производства ЦНИИ МО. Всего было ревакцинировано 8 доноров. Вакцины вводили однократно подкожно в объёме 0,5 мл.

Содержание антител в сыворотке крови людей, а также в технологических белковых растворах, концентратах иммуноглобулинов и в иммуноглобулиновых препаратах определяли методом непрямого гетерогенного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением «Тест-системы иммуноферментной для определения титров антител к протективному антигену сибиреязвенного микроба в сыворотке крови человека», разработанной сотрудниками ЦНИИ МО. Доноров допускали к плазмодаче на основании приказа Минздрава РФ № 364 от 14.09.01 г. Плазму заготавливали методом плазмафереза. Хранение плазмы осуществляли в соответствии с приказами Минздрава РФ № 193 от 07.05.03 г. и Минздравсоцразвития РФ № 147 от 21.02.05 г.

В лабораторном опыте фракционировали 9 порций иммунной плазмы общим объёмом 2745 мл по технологии, описанной в «Типовом комплексном регламенте производства белковых препаратов плазмы донорской крови» (утв. зам. министра здравоохранения ССР 21.12.79 г.). Фракцию В растворяли в 0,9 % водном растворе хлорида натрия, диализовали и стерилизовали фильтрацией. В результате эксперимента получено 40 мл концентратов иммуноглобулинов. Экспериментально-производственные серии ВВИГ получены из 172 л иммунной плазмы: 2 серии общим объёмом 1,7 л по технологии пепсинолиза [Сапожникова В.С., Шарыгин С.Л., 1996 г.] (серии № 1 и № 2) и одна серия объёмом 1,8 л по технологии инкубации в кислой среде [Алёшкин В.А., Лютов А.Г., 1998 г.] (серия № 3). Из 400 г фракции Б, выделенной при производстве серий № 1 и № 2, получены две экспериментальные серии комплексного иммуноглобулинового препарата (КИП) общим объёмом 250 мл по технологии извлечения иммуноглобулинов из фракции Б [Алёшкин В.А. и соавт., 1997 г.] (серии № 4 и № 5). Пять образцов препарата серии № 3 лиофилизировали.

Физико-химические, химические, биохимические, иммунохимические и биологические параметры концентратов иммуноглобулинов и

иммуноглобулиновых препаратов определяли, в основном, в соответствии с МУК 4.1/4.2.588-96. Концентрацию мальтозы устанавливали по методике, описанной в Государственной фармакопее (ГФ XI). Анализ молекулярных параметров проводили методом эксклюзионной колоночной хроматографии с использованием сефакрила S-300. Антикомплементарную активность (АКА) серий № 1 и № 2 определяли в соответствии с МУК 3.3.2.1063-01, серии № 3 – по ФСП 42-0194488403. Содержание IgG, IgA, IgM оценивали методом радиальной иммунодиффузии в геле. Контроль на наличие HBsAg, антител к ВИЧ, вирусу гепатита С и возбудителю сифилиса проводили методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем.

С целью изучения спектра антител в иммуноблоттинге осуществляли электрофорез антигенных детерминант, полученных сотрудниками ФГУН «Государственный научный центр прикладной биотехнологии и микробиологии» (ГНЦ ПМБ), в 10 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. После электрофореза разделённые фракции переносили на нитроцеллюлозную мембрану «Hybond-ECL» («Amersham», США). Антитела визуализировали с помощью пероксидазы и диаминобензидина.

Спектр антител в непрямом гетерогенном ИФА оценивали по стандартной методике с использованием антигенных детерминант, полученных сотрудниками ГНЦ ПМБ, пероксидазы и орто-фенилендиамина.

Токсиннейтрализующую активность иммуноглобулиновых препаратов определяли в стандартном МТТ-тесте на культуре клеток J774A.1 с использованием антигенных детерминант *B. anthracis*, полученных сотрудниками ГНЦ ПМБ.

Индекс превентивных свойств (ПС) концентрата иммуноглобулинов изучали в эксперименте на 31 молодой белой беспородной мыши обоего пола массой от 10 до 12 г. Животным опытной группы вводили внутривенно по 0,5 мл исследуемого раствора, первой контрольной группы – по 0,5 мл стерильного 0,9 % водного раствора хлорида натрия. Животных второй контрольной группы оставляли интактными. Через 3 - 3,5 часа осуществляли подкожное заражение животных опытной и второй контрольной групп тест-дозой спор штамма СТИ-1

B. anthracis в объёме 0,2 мл. Результаты учитывали через 4 суток.

Профилактическую эффективность ВВИГ оценивали на 18 беспородных морских свинках обоего пола массой от 250 до 300 г. Животным опытной группы вводили подкожно по 4 мл исследуемого образца, группы сравнения – по 2 мл «Глобулина противосибирезвенного лошадиного жидкого» серии 33 производства ЦНИИ МО. Животных контрольной группы оставляли интактными. Через 24 часа осуществляли подкожное заражение животных всех трёх групп 50 LD₅₀ культуры тест-штамма 71/12 *B. anthracis* в объёме 1 мл. За животными наблюдали в течение 10 суток от момента заражения. Специфичность гибели животных в течение срока наблюдения определяли путём высева отпечатков паренхиматозных органов (печени, селезенки) на чашки с плотной питательной средой Хоттингера с последующей микроскопической оценкой выросших колоний.

Терапевтическую эффективность ВВИГ изучали в остром опыте на 38 кроликах. В экспериментах использовали животных массой от 2,0 до 2,5 кг, беспородных, обоего пола. Для подкожного заражения животных применяли дозы 10 и 100 LD₅₀ тест-штамма Ч-7 *B. anthracis* в объёме 1 мл. Лечение животных начинали через 24 ч после заражения. Количество вводимых препаратов рассчитывали на основании максимальных рекомендованных для человека терапевтических доз и коэффициента отношения массы и поверхности тела человека и кролика. Иммуноглобулин человека вводили внутривенно 1 раз в сутки, «Глобулин противосибирезвенный лошадиный жидкий» серии 33 производства ЦНИИ МО – внутримышечно 1 раз в сутки, антибиотик – внутримышечно 2 раза в сутки. Лечение продолжали в течение 5 суток. Специфичность гибели животных определяли, как описано выше.

Статистический анализ проводили с использованием программ «Excel» («Microsoft», США) и «Biostat» (McGraw Hill). Принятое значение уровня значимости равно 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установление достаточного уровня антител в противосибирезвенном внутривенном иммуноглобулине и иммунной плазме

В связи с отсутствием сведений о выделении антител человека к ПА *B. anthracis* из плазмы был проведён лабораторный опыт фракционирования иммунного сырья. Для опыта случайным образом было отобрано 9 порций плазмы общим объёмом 2745 мл, заготовленной от пяти доноров, иммунизированных сухой формой комбинированной сибирезвенной вакцины. Целевые антитела в ходе предварительных исследований специфической активности крови доноров были выявлены в титре не ниже 1:400.

На каждой стадии фракционирования отбирали образцы технологических растворов, в которых определяли содержание целевых антител и концентрацию белка. Усреднённые результаты исследования представлены в табл. 1. В связи с вариабельностью концентрации белка в образцах, с целью корректного сравнения специфической активности, был вычислен удельный показатель – приведённый титр - частное обратного титра раствора и концентрации белка в процентах.

Таблица 1

Специфическая активность технологических растворов на этапах фракционирования иммунной плазмы

Технологический раствор	Средний обратный титр	Средняя концентрация белка, %	Средний приведённый титр
Фильтрат плазмы	467	4,1	112
Супернатант А ₈	429	3,6	122
Супернатант А	нет	2,4	нет
Супернатант А ₁	нет	0,3	нет
Супернатант Б	нет	0,4	нет
Супернатант В	нет	0,0	нет

Концентрация белка при осаждении фракции А₈ уменьшалась в среднем на 12,2 %, при этом приведённый титр растворов увеличивался на 9 %, что свидетельствует о почти полном переходе антител к ПА в полупродукт супернатант А₈. Целевые антитела в супернатанте А не были обнаружены, несмотря на значимую концентрацию белка в образцах, что является

доказательством их полного осаждения в полупродукте фракции А. В полупродукте супернатанте Б, а также в отходах супернатантах А₁ и В антитела не удалось обнаружить, по-видимому, вследствие предельно низкой концентрации белка.

Полученные концентраты иммуноглобулинов визуально были оценены как бесцветные, слабо опалесцирующие. В иммуноэлектрофорезе (ИЭФ) выявлена интенсивная дуга преципитации IgG и дополнительная дуга преципитации альбумина, в электрофорезе (ЭФ) – в среднем 94,4 % фракции γ -глобулинов и 5,6 % фракции альбумина. Средний приведённый титр образцов в 2,3 раза превышал аналогичный показатель исходной плазмы. Результаты опыта позволяют сделать заключение о стабильности антител к ПА *B. anthracis* в процессе фракционирования.

Высоким уровнем противосибиреязвенного иммунитета является 75 % выживаемость, что соответствует индексу ПС 0,4 [Бургасов П.Н. и соавт., 1965, Бургасов П.Н. и соавт., 1972]. При этом существует строгая корреляция между ПС и уровнем антител к ПА: индекс 0,4 соответствует титру 1:1600 5 % белкового раствора [Елагин Г.Д. и соавт., 1997]. Следовательно, минимальным содержанием антител в противосибиреязвенном ВВИГ, номинальная концентрация белка в котором равна 5 %, можно считать титр 1:1600.

В эксперименте на мышах был определён индекс ПС одного из концентратов иммуноглобулинов, полученных в лабораторном опыте фракционирования иммунной плазмы. Образец содержал 9,9 % белка и антитела к ПА *B. anthracis* в титре 1:3200, что эквивалентно титру 1:1600 5 % раствора. Индекс его ПС составил 0,4. Таким образом, проведённое исследование продемонстрировало наличие принципиальной возможности получения эффективного противосибиреязвенного ВВИГ.

Опыт разработки ВВИГ различной специфичности свидетельствует, что целевые антитела в процессе производства концентрируются не менее чем в 4 раза [Шарыгин С.Л., 1997, Мальцева О.В., 2002]. Следовательно, минимальным уровнем антител к ПА в иммунной плазме, содержание белка в которой также примерно равно 5 %, следует считать титр 1:400.

Определение биохимических параметров экспериментальных серий противосибирезвенных иммуноглобулиновых препаратов человека

Из иммунной плазмы с применением 3 различных технологических приёмов получено 5 экспериментальных серий противосибирезвенных иммуноглобулиновых препаратов человека. Их основные параметры представлены в табл. 2.

Таблица 2

Основные параметры противосибирезвенных иммуноглобулиновых препаратов человека

Параметр	Серия № 1	Серия № 2	Серия № 3	Серия № 4	Серия № 5
Концентрация белка, %	5,3	5,4	4,5	6,9	7,4
Содержание антител к ПА <i>B. anthracis</i> в титре	1:1600	1:1600	1:3200	1:1600	1:800
Фракционный состав в ИЭФ	Интенсивная дуга преципитации IgG с расщеплением		IgG, IgA	-	-
Фракционный состав в ЭФ, %:					
- α ₂ -глобулины;	0	0	0	2,5	8,5
- β-глобулины;	0	0	0	24,8	24,5
- γ-глобулины.	100	100	100	72,7	67,0
Молекулярные параметры, %:					
- полимеры;	0,0	0,0	0,0	-	-
- димеры;	5,8	3,3	4,9	-	-
- мономеры;	79,7	84,9	94,7	-	-
- фрагменты.	14,5	11,8	0,4	-	-
АКА	1 мг белка потребляет 0 CH ₅₀	1 мг белка потребляет 0 CH ₅₀	2 CH ₅₀ сохраняют активность в присутствии 10 мг белка	-	-
Содержание иммуноглобулинов, мг/мл:					
- IgG;	-	-	-	31,3	10,5
- IgM;	-	-	-	8,8	18,5
- IgA.	-	-	-	7,5	6,1

Препараты серий № 1, № 2 и № 3 представляют собой бесцветные, прозрачные, стерильные, апиrogenные, нетоксичные растворы со сниженной

АКА, свободные от маркёров основных гемотрансмиссивных инфекций. Белковых примесей по результатам ИЭФ (рис. 1) и ЭФ не выявлено, полимеры не обнаружены (рис. 2). Таким образом, параметры серий № 1, № 2 и № 3 удовлетворяют требованиям, предъявляемым к ВВИГ. Специфическая активность препаратов достигла эффективного уровня.

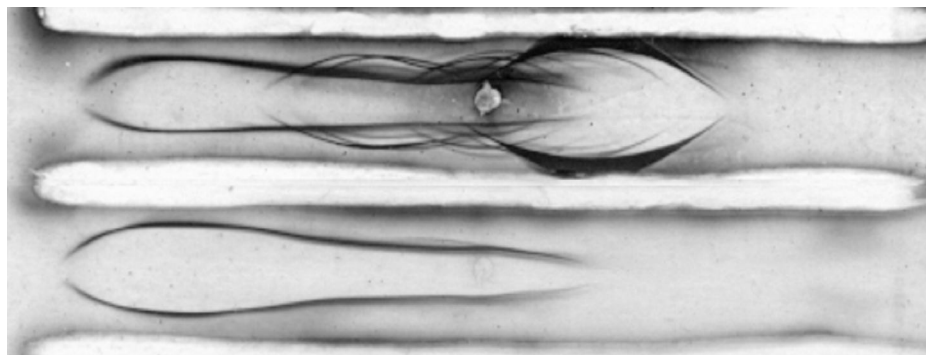


Рисунок 1. Иммуноэлектрофореграмма иммуноглобулинового препарата серии № 1
Примечание.

Катод слева, анод справа.

В траншеях антисыворотка кролика к белкам сыворотки крови человека.

В лунках:

1 – сыворотка крови человека;

2 – иммуноглобулиновый препарат серии № 1.

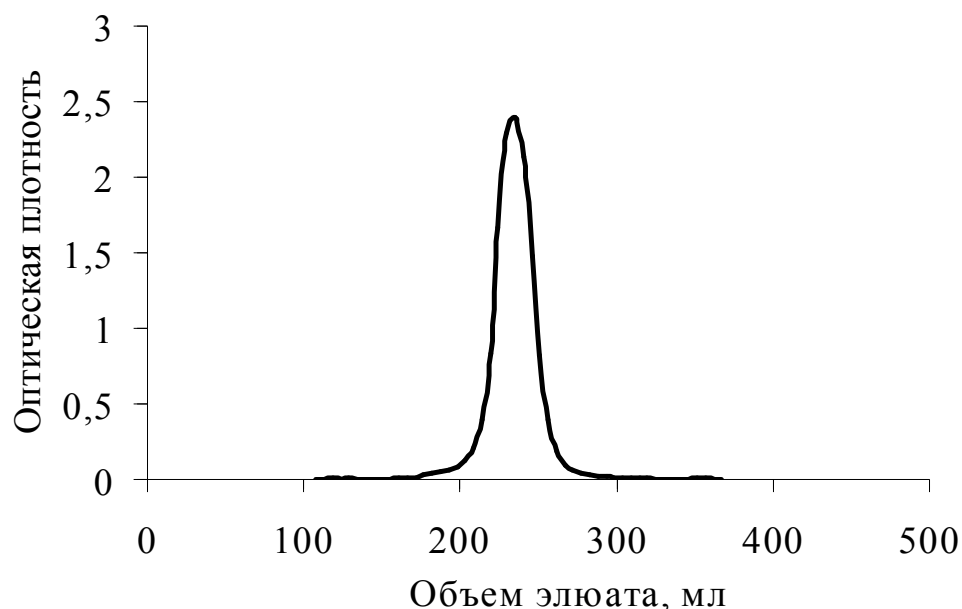


Рисунок 2. Хроматограмма иммуноглобулинового препарата серии № 3

Препараты серий № 4 и № 5 представляют собой стерильные растворы, свободные от маркёров основных гемотрансмиссивных инфекций. Соотношение

иммуноглобулинов трёх основных классов (IgG : IgM : IgA) примерно равно 4 : 1 : 1 в серии № 4 и 1,5 : 3 : 1 в серии № 5. Основные параметры препаратов удовлетворяют требованиям, предъявляемым к иммуноглобулинам для энтерального применения.

Хранение образцов ВВИГ более 30 месяцев при температуре от 2 до 6 °С не вызвало снижения специфической активности, что свидетельствует о высокой стабильности антител к ПА. В процессе лиофилизации внутривенного иммуноглобулина содержание целевых антител изменений также не претерпело. Это указывает на наличие принципиальной возможности получения препарата в сухой лекарственной форме.

Определение условий заготовки и хранения иммунного сырья

Комбинированная вакцина была выбрана для иммунизации доноров как наиболее иммуногенная и наименее реактогенная из всех типов вакцин, выпускаемых в настоящее время. Доноры по мере прохождения медицинского осмотра были разделены на две группы численностью 38 и 23 человека. В первой группе применяли сухую форму вакцины, во второй – жидкую. Срок наблюдения составил 20 недель. Целевые антитела не выявлены у 8 доноров (13 %). В крови ещё 11 иммунизированных лиц (18 %) антитела к ПА зарегистрированы на уровне, не достаточном для получения иммунной плазмы. Характеристика специфической активности сыворотки крови доноров, ответивших целевой антителопродукцией, представлена в табл. 3.

Суммарная продолжительность и средний срок первой регистрации антител к ПА *B. anthracis* в титре 1:400 или выше были сопоставимы в обеих группах. На основании расчёта критерия z различие относительного количества доноров с достаточным содержанием целевых антител в крови является статистически незначимым ($p = 0,446$). Различия в гуморальном иммунном ответе лиц разного пола на основании расчёта критерия χ^2 также статистически незначимы ($p = 0,497$). Продолжительность циркуляции антител к ПА в крови и доля иммунологически активных доноров достаточны для организации заготовки иммунного сырья. Таким образом, с целью получения плазмы для изготовления противосибиреязвенных иммуноглобулиновых препаратов человека рационально

иммунизировать доноров любой формой комбинированной сибирезвенной вакцины, а первую явку для исследования специфической активности крови назначать через 5 недель после вакцинации.

Таблица 3

Характеристика специфической активности сыворотки крови доноров, ответивших целевой антителопродукцией на вакцинацию комбинированной сибирезвенной вакциной

Показатель	Сухая форма вакцины	Жидкая форма вакцины
Первая регистрация антител к ПА в титре 1:400, недели после вакцинации	5	6
Суммарная продолжительность регистрации титра 1:400 или более высокого, недели	10	10
Относительное количество доноров, содержание антител к ПА в крови которых достигло титра 1:400, %	74	61

Восемь доноров первой группы через 13 - 14 месяцев после первичной иммунизации были ревакцинированы. Уже через неделю целевые антитела были зарегистрированы в титре 1:800. Динамику специфической активности крови можно описать как постепенное снижение титров. Суммарная продолжительность циркуляции антител на достаточном уровне составила 35 недель. Следовательно, ревакцинация доноров позволяет значительно расширить сырьевую базу для получения противосибирезвенных иммуноглобулиновых препаратов.

С целью определения стабильности антител к ПА в процессе хранения плазмы образцы сыворотки иммунизированных доноров со значимой специфической активностью замораживали и выдерживали при температуре не выше минус 30 °С. По истечении 6, 9, 12 или 20 месяцев сыворотку размораживали и определяли в ней содержание целевых антител. Всего исследовано 28 образцов, из них 21 с исходным титром 1:800 и 7 с исходным титром 1:400. Через 6, 9 и 12 месяцев среднее содержание целевых антител сохранялось на исходном уровне. Снижение специфической активности зарегистрировано через 20 месяцев хранения сыворотки, причём во всех случаях падение титров было равно одному шагу разведения в ИФА. Путём расчёта

парного критерия Стьюдента уменьшение содержания антител к ПА через 20 месяцев признано статистически значимым ($p = 0,016$ для исходного титра 1:800 и $p = 0,000$ для исходного титра 1:400). Следовательно, срок хранения иммунного сырья не должен превышать 1 год после заготовки при температуре не выше минус 30 °С.

Изучение биологических свойств противосибиреязвенных иммуноглобулиновых препаратов человека

Методом иммуноблоттинга в препаратах всех серий выявлены антитела к ПА, а также к его третьему и четвёртому доменам (рис. 3). В ИФА дополнительно показано наличие антител к летальному фактору *B. anthracis*.

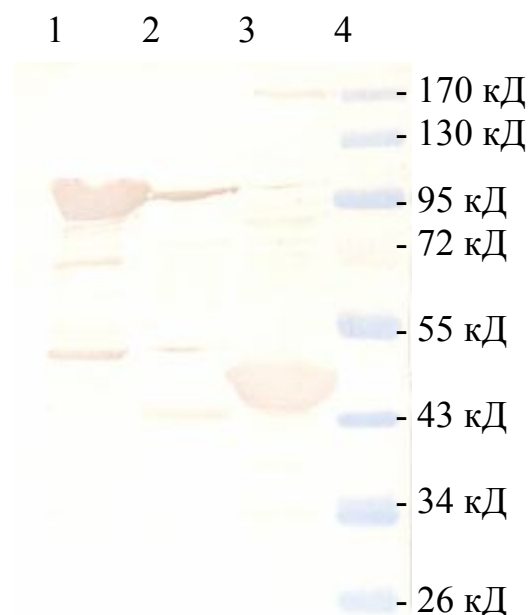


Рисунок 3. Иммуноблот противосибиреязвенного иммуноглобулинового препарата человека

Примечание.

Дорожки:

1 – ПА;

2 – третий домен ПА;

3 – четвёртый домен ПА;

4 – маркёры молекулярной массы. Справа указаны величины молекулярных масс маркерных белков.

Токсиннейтрализующей активностью *in vitro* также обладали все экспериментальные образцы препаратов (рис. 4). В разведении 1:5 серии № 1, № 2 и № 4 нейтрализовали летальный токсин практически полностью, а серии № 3 и

№ 5 - примерно на 140 %. Данный феномен можно объяснить активацией или ингибированием клеточных процессов по Fc-рецепторному механизму. Связываясь с рецепторами типа FcγRII, специфичными к иммунным комплексам, кластер молекул «антиген – антитело» мог интенсифицировать, например, синтез и экскрецию цитокинов или, напротив, блокировать реакции апоптоза, повышая тем самым процент выживших клеток. Серии № 1, № 2 и № 4 аналогичного влияния не оказывали, видимо, вследствие частичного нарушения эффекторных функций молекул IgG.

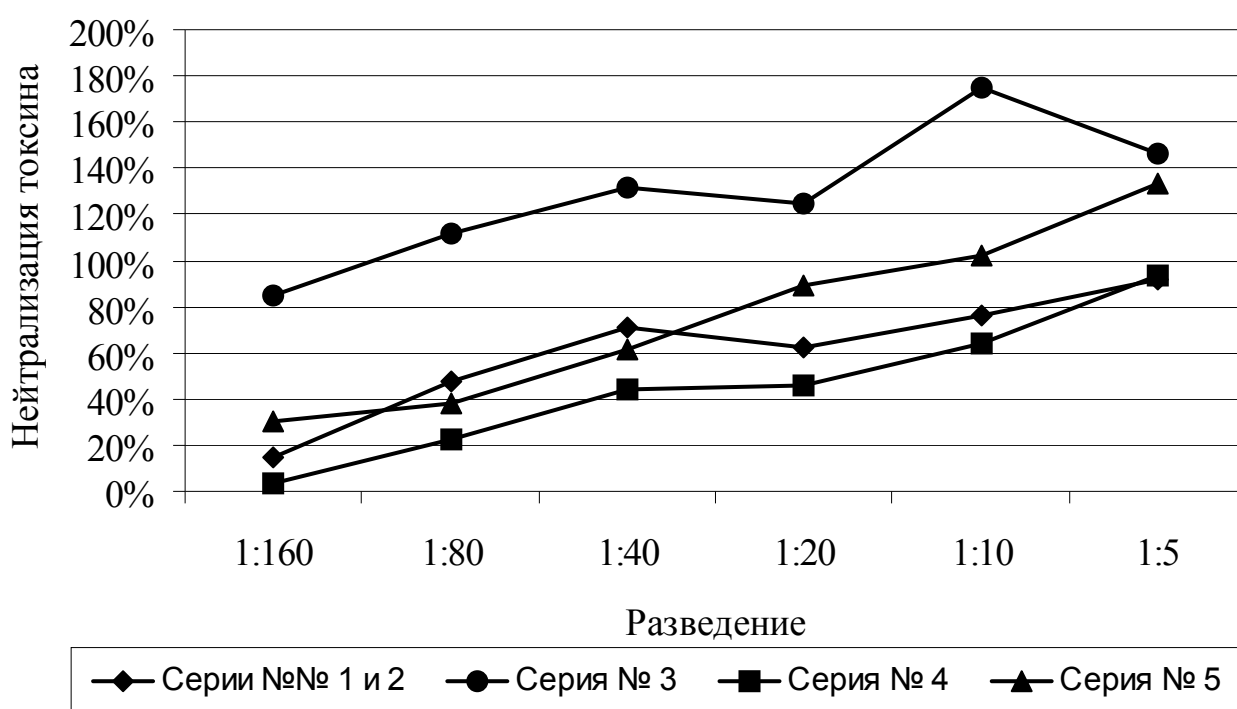


Рисунок 4. Кривые нейтрализации летального токсина противосибирезвенными иммуноглобулиновыми препаратами человека

В табл. 4 представлены результаты оценки профилактической эффективности противосибирезвенного ВВИГ на морских свинках. Номинальная концентрация белка в лошадином глобулине составляет 10 %, а в иммуноглобулине человека – 5 %, поэтому последний был применён в удвоенной дозировке. Его эффективность была несколько ниже, чем у препарата сравнения, однако расчёт точного критерия Фишера позволил сделать заключение, что зарегистрированные различия активности препаратов статистически незначимы ($p = 1,000$).

Профилактическая эффективность противосибирязвенного внутривенного иммуноглобулина человека

Группа животных	Количество морских свинок			Относительное количество выживших животных через 10 суток после заражения, %
	взятых в опыт	павших	выживших	
Опытная (4 мл ВВИГ подкожно, через 24 ч 50 LD ₅₀ штамма 71/12 в 1 мл подкожно)	6	3	3	50
Сравнения (2 мл лошадиного глобулина подкожно, через 24 ч 50 LD ₅₀ штамма 71/12 в 1 мл подкожно)	6	2	4	67
Контрольная (50 LD ₅₀ штамма 71/12 в 1 мл подкожно)	6	6	0	0

Сходные результаты были получены при экспериментальной оценке эффективности применения ВВИГ в качестве средства монотерапии на кроликах (табл. 5). Введённая доза сибирязвенного микроба моделировала инфекционный процесс средней степени тяжести, приводящий к 100 % гибели животных в течение 15 суток. Курс лечения иммуноглобулином для внутривенного введения снизил смертность на 67 % (относительное количество выживших животных составило 33 %), а применение лошадиного глобулина – на 50 %. На основании расчёта точного критерия Фишера различия в смертности кроликов также признаны статистически незначимыми ($p = 1,000$).

Применение ВВИГ в комплексе с антибиотиком было более эффективно, чем использование комбинации внутримышечного лошадиного ИП с антибактериальным препаратом (табл. 6). Заражающая доза моделировала тяжёлую форму сибирязвенной инфекции, вызывающую летальный исход у 100 % кроликов в течение 5 суток. На 30 сутки после заражения относительное

количество выживших животных в опытной группе составило 60 %. Такой же результат был зарегистрирован в первой группе сравнения. Во второй группе сравнения выжило 20 % животных. По-видимому, более выраженная эффективность комбинации иммуноглобулина для внутривенного введения с ампициллином обусловлена хорошо известным и применяемым на практике синергизмом действия ВВИГ и антибиотиков [Козлов В.К., 2006]. Наблюдаемые различия в смертности кроликов опытной группы и первой группы сравнения статистически незначимы на основании расчёта точного критерия Фишера ($p = 1,000$).

Таблица 5

Лечебная монотерапевтическая эффективность противосибирезвенного внутривенного иммуноглобулина человека

Группа животных	Количество кроликов			Относительное количество выживших животных через 15 суток после заражения, %
	взятых в опыт	павших	выживших	
Опытная (10 LD ₅₀ штамма Ч-7 в 1 мл подкожно, через 24, 48, 72, 96, 120 ч 2,4 мл ВВИГ внутривенно)	6	4	2	33
Сравнения (10 LD ₅₀ штамма Ч-7 в 1 мл подкожно, через 24, 48, 72, 96, 120 ч 1,2 мл лошадиного глобулина внутримышечно)	6	3	3	50
Контрольная (10 LD ₅₀ штамма Ч-7 в 1 мл подкожно)	6	6	0	0

Результаты проведённых исследований свидетельствуют о достаточно высокой эффективности экспериментальных образцов противосибирезвенного ВВИГ, сопоставимой с защитными свойствами лошадиного глобулина. Вместе с тем, потенциал аллогенного препарата значительно выше, чем гетерогенного: максимальная разовая доза ВВИГ составляет 2 г белка на 1 кг массы тела, то есть

в среднем около 2800 мл 5 % раствора, в то время как допустимый объём инъекции лошадиного глобулина, лимитированный способом введения и, главным образом, гетерогенной природой препарата, может составлять не более 100 мл 10 % белкового раствора. Максимальная курсовая доза ВВИГ достигает 14 л в пересчёте на 10 % белка, в то время как лошадиного глобулина – только 400 мл. Таким образом, перспективность противосибирязвенного иммуноглобулина человека, не обладающего, в отличие от лошадиного глобулина, сенсibiliзирующими свойствами, сомнений не вызывает.

Таблица 6

Лечебная эффективность противосибирязвенного внутривенного иммуноглобулина человека в комплексной терапии с антибиотиком

Группа животных	Количество кроликов			Относительное количество выживших животных через 30 суток после заражения, %
	взятых в опыт	павших	выживших	
Опытная (100 LD ₅₀ штамма Ч-7 в 1 мл подкожно, через 24, 48, 72, 96, 120 ч 2,4 мл ВВИГ внутривенно, через 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 ч 560 мг ампициллина внутримышечно)	5	2	3	60
Первая сравнения (100 LD ₅₀ штамма Ч-7 в 1 мл подкожно, через 24, 48, 72, 96, 120 ч 1,2 мл лошадиного глобулина внутримышечно, через 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 ч 560 мг ампициллина внутримышечно)	5	2	3	60
Вторая сравнения (100 LD ₅₀ штамма Ч-7 в 1 мл подкожно, через 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 ч 560 мг ампициллина внутримышечно)	5	4	1	20
Контрольная (100 LD ₅₀ штамма Ч-7 в 1 мл подкожно)	5	5	0	0

ВЫВОДЫ

1. Впервые показана принципиальная возможность концентрации антител человека к протективному антигену *B. anthracis* (заявка на патент РФ № 2006129089/20/03/608). Минимальным защитным уровнем антител во внутривенном иммуноглобулине является титр 1:1600 по результатам иммуноферментного анализа, а в исходной плазме - 1:400.
2. Однократная иммунизация доноров сухой или жидкой формой комбинированной сибиреязвенной вакцины обеспечивает циркуляцию антител к протективному антигену на значимом уровне у 69 % людей. Заготовка иммунной плазмы возможна с 5 недели после вакцинации. Антитела стабильны в процессе хранения сырья в течение 12 месяцев при температуре не выше минус 30 °С.
3. По технологии этанольного фракционирования донорской плазмы получены экспериментальные образцы противосибиреязвенных иммуноглобулинов человека. Препараты, произведённые с применением пепсинолиза и инкубации в кислой среде, содержат антитела к протективному антигену *B. anthracis* в титре 1:1600 и 1:3200 соответственно и отвечают требованиям, предъявляемым к внутривенным иммуноглобулинам. Препарат для энтерального применения, полученный с применением метода извлечения иммуноглобулинов из фракции Б, содержит целевые антитела в титре не менее 1:800.
4. Экспериментальные серии иммуноглобулинов, полученные с применением 3 различных технологических приёмов, содержат антитела к третьему и четвёртому доменам протективного антигена и к летальному фактору сибиреязвенного микроба. Препараты обладают токсиннейтрализующей противосибиреязвенной активностью *in vitro*.
5. В экспериментах на животных доказана высокая профилактическая и лечебная эффективность внутривенного иммуноглобулина, сопоставимая с защитным эффектом, оказываемым гипериммунным лошадиным глобулином.

Автор благодарен всем сотрудникам лаборатории препаратов крови КНИИГиПК (руководитель – к.б.н. А.В. Дробкова), станции переливания крови КНИИГиПК (главный врач – В.К. Куноф), сотрудникам ЦНИИ МО (начальник – д.м.н. И.В. Борисевич), с.н.с. ФГУН «ГНЦ прикладной биотехнологии и микробиологии» к.б.н. Е.В. Беловой, с.н.с. ФГУН «МНИИ эпидемиологии и микробиологии» д.б.н. А.Г. Лютову за участие в работе.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Долматов В.Ю., Блинова Е.А., Дробкова А.В., Карпова М.В. Изучение влияния процесса фракционирования плазмы на специфическую активность антител человека к протективному антигену сибиреязвенного микроба: Материалы научно-практической конференции молодых учёных «Вопросы трансфузиологии и клинической медицины». – Киров, 2007. – С. 30 – 31.
2. Долматов В.Ю., Блинова Е.А., Дробкова А.В., Карпова М.В., Шевцов А.Н., Боровской Д.В. Опыт выделения иммуноглобулинов из донорской плазмы, содержащей антитела к протективному антигену сибиреязвенного микроба: Сборник научно-практических работ «Производственная и клиническая трансфузиология: реальность и перспективы». – Воронеж, 2007. – С. 85 – 86.
3. Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Карпова М.В., Мальцева О.В., Шевцов А.Н., Боровской Д.В. Гуморальный иммунный ответ доноров плазмы на комбинированную сибиреязвенную вакцину // Трансфузиология. - 2007. – Т.8, № 1 – 2. – С. 41 – 42.
4. Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Карпова М.В., Шевцов А.Н., Боровской Д.В. Гуморальный иммунный ответ доноров на комбинированную сибиреязвенную вакцину // Проблемы гематологии и переливания крови. - 2005. - № 3. – С. 43 – 44.
5. Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Карпова М.В., Шевцов А.Н., Боровской Д.В. Изучение стабильности содержания антител к протективному антигену *Bac. anthracis* в сыворотке крови доноров: Сборник «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины». – Киров, 2005. – С. 152 – 153.
6. Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Лютов А.Г., Мальцева О.В., Шевцов А.Н., Боровской Д.В., Елагин Г.Д., Карпова М.В., Вершинина О.А., Блинова Е.А., Шарыгин С.Л. Возможность получения противосибиреязвенного иммуноглобулина человека для внутривенного введения // Проблемы особо опасных инфекций. - 2008. - № 2.
7. Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Мальцева О.В., Блинова Е.А., Шарыгин С.Л., Лютов А.Г., Вершинина О.А., Карпова М.В., Князев М.Г., Шалагинова Т.Д., Гребенева Г.А., Шевцов А.Н., Боровской Д.В. Противосибиреязвенный внутривенный иммуноглобулин человека: Сборник «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины». – Киров, 2008. – С. 27 – 28.

8. Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Мальцева О.В., Вершинина О.А., Карпова М.В., Шалагинова Т.Д., Шевцов А.Н., Боровской Д.В. Влияние ревакцинации на содержание антител к протективному антигену *Bac. anthracis* в сыворотке крови иммунизированных доноров: Сборник трудов юбилейной научно-практической конференции «Специализированная медицинская помощь», посвящённой 75-летию медицинской службы и 10-летию госпиталя ГУВД Свердловской области. – Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2005. – С. 620 – 622.
9. Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Мальцева О.В., Вершинина О.А., Карпова М.В., Шалагинова Т.Д., Шевцов А.Н., Боровской Д.В. Изучение содержания антител к протективному антигену *Bac. anthracis* в сыворотке крови иммунизированных доноров: Сборник «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины». – Киров, 2005. – С. 148 – 151.
10. Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Мальцева О.В., Карпова М.В., Вершинина О.А., Шалагинова Т.Д., Шевцов А.Н., Елагин Г.Д., Боровской Д.В., Лютов А.Г., Шарыгин С.Л. Тактика заготовки сырья для получения внутривенного противосибиреязвенного иммуноглобулина человека // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. - 2007. - № 3. – С. 124 – 131.
11. Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Мальцева О.В., Шарыгин С.Л. Изучение стабильности основных параметров противосибиреязвенного внутривенного иммуноглобулина человека: Сборник «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины». – Киров, 2008. – С. 26 – 27.
12. Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Погорельский И.П., Мальцева О.В., Шевцов А.Н., Елагин Г.Д., Белова Е.В., Боровской Д.В., Карпова М.В., Вершинина О.А., Блинова Е.А., Лютов А.Г., Шарыгин С.Л. Фармацевтическая разработка противосибиреязвенного внутривенного иммуноглобулина человека // Успехи современного естествознания. - 2008. - № 5. – С. 96 – 98.
13. Долматов В.Ю., Карпова М.В. Оценка возможности определения содержания антител человека к протективному антигену *Bacillus anthracis* в концентрированных белковых растворах методом иммуноферментного анализа // Трансфузиология. - 2007. – Т.8, № 1 – 2. – С. 42 – 43.
14. Дробкова А.В., Мальцева О.В., Блинова Е.А., Шалагинова Т.Д., Шарыгин С.Л., Долматов В.Ю., Дармов И.В., Шевцов А.Н., Боровской Д.В. Получение и оценка протективных свойств противосибиреязвенного концентрата иммуноглобулина человека // Трансфузиология. - 2007. – Т.8, № 1 – 2. – С. 43.
15. Мостовская Е.В., Лютов А.Г., Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Соловьёв А.Ф., Карпова М.В., Мальцева О.В., Блинова Е.А., Бочкарёва С.С., Тюриков Ю.М. Габриглобин как основа создания специфических иммуноглобулинов для внутривенного введения: Материалы научно-практической конференции молодых учёных «Вопросы трансфузиологии и клинической медицины». – Киров, 2007. – С. 39 – 41.

