



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006126555/13, 21.07.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.07.2006

(45) Опубликовано: 20.04.2008 Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2196607 C2, 20.01.2003. RU
2004101284 A, 27.06.2005. RU 2191600 C1,
27.10.2002. RU 2166961 C2, 20.05.2001.

Адрес для переписки:

450014, г.Уфа, ул. Новороссийская, 105, ФГУП
"НПО "Микроген" МЗ РФ филиал
"Иммунопрепарат", отдел промышленной
собственности

(72) Автор(ы):

Ситник Наталья Павловна (RU),
Загидуллин Наиль Виленович (RU),
Исрафилов Азамат Габдельхатович (RU),
Еникеева Лилия Фаридовна (RU),
Мухачева Анастасия Вячеславовна (RU),
Шافеева Римма Сабировна (RU),
Кунцевич Юрий Геннадьевич (RU),
Петрова Ирина Ивановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное унитарное
предприятие "Научно-производственное
объединение по медицинским
иммунобиологическим препаратам "Микроген"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНОЙ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ АНТИРАБИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии.
Способ включает гипериммунизацию животных-
продуцентов инактивированным, очищенным и
концентрированным вирусом бешенства с
адъювантом фосфатом алюминия и/или
нуклеинатом натрия. Полученный на культуре
перевиваемых клеток Vero и на первичной культуре
клеток почек сирийского хомяка вирус
концентрируют адсорбцией на геле фосфата
алюминия или ультрацентрифугированием, или
методами ультрафильтрации и очищают через
пористые кремнеземы или ионообменной
хроматографией. Для иммунизации используют
антиген с индексом иммуногенности не менее 9,5
МЕ/мл, содержанием белка менее 200 мкг/мл,
бычьего сывороточного альбумина менее 0,5

мкг/мл, клеток РСХ и Vero менее 0,5 мкг/мл,
клеточной ДНК 5,0-10,0 мг/мл, концентрацией ионов
алюминия в антигене 0,2-1,25 мкг/мл, нуклеината
натрия 0,002-0,5 мг/мл. Схема грундиммунизации -
1-3 инъекции антигена дозой 3-15 мл с интервалом
14-30 дней, на 45-60 день - основной цикл
иммунизации из 10-15 инъекций с интервалом 5-15
дней дозой антигена 5-70 мл. Далее продуцентов
иммунизируют один раз в месяц дозой 20-70 мл,
один раз в полгода проводят укороченный цикл
иммунизации из 2-4 инъекций антигена с
интервалом 5-15 дней дозой 20-70 мл. Способ
позволяет получать гетерологичную
антирабическую сыворотку с высокой
специфической активностью. 2 н. и 10 з.п. ф-лы, 1
табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12P 21/00 (2006.01)**A61K 39/42** (2006.01)**C07K 16/08** (2006.01)**A61P 31/12** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006126555/13, 21.07.2006**(24) Effective date for property rights: **21.07.2006**(45) Date of publication: **20.04.2008 Bull. 11**

Mail address:

**450014, g.Ufa, ul. Novorossijskaja, 105, FGUP
"NPO "Mikrogen" MZ RF filial
"Immunopreparat", otdel promyshlennoj
sobstvennosti**

(72) Inventor(s):

**Sitnik Natal'ja Pavlovna (RU),
Zagidullin Nail' Vilenovich (RU),
Israfilov Azamat Gabdel'akhatovich (RU),
Enikeeva Lilija Faridovna (RU),
Mukhacheva Anastasija Vjacheslavovna (RU),
Shafeeva Rimma Sabirovna (RU),
Kuntsevich Jurij Gennad'evich (RU),
Petrova Irina Ivanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe
predpriatie "Nauchno-proizvodstvennoe
ob"edinenie po meditsinskim
immunobiologicheskim preparatam "Mikrogen"
Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj
Federatsii (RU)**

(54) **METHOD FOR PREPARING HIGHLY SPECIFIC HETEROLOGOUS ANTIRABIES SERUM**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, preparative biochemistry.

SUBSTANCE: method involves hyperimmunization of animal-producers with inactivated, purified and concentrated rabies virus with aluminum phosphate and/or sodium nucleinate as an adjuvant. Virus obtained in culture transplantable cells VERO and in primary culture of Syrian hamster kidney cells is concentrated by adsorption of aluminum phosphate gel or centrifugation, or ultrafiltration methods and purified passing through porous silica, or by ion-exchange chromatography. For immunization antigen with the immunogenicity index 9.5 IU/ml, not less, is used and with the content of protein less 200 mcg/ml, bovine serum albumin less 0.5 mcg/ml Syrian hamster kidney cells and VERO cells less 0.5 mcg/ml, cellular DNA 5.0-10.0 ng/ml,

aluminum ions concentration in antigen 0.2-1.25 mcg/ml, and sodium nucleinate 0.002-0.5 mg/ml. Scheme of grund-immunization - 1-3 injections of antigen in the dose 3-15 ml with interval for 14-30 days, the main immunization cycle - on 45-60 day involving 10-15 injections with interval for 5-15 days and in the antigen dose 5-70 ml. Then producers are immunized once per a month with the dose 20-70 ml, and once per 6 month the shortened cycle of immunization is carried out involving 2-4 injections of antigen with interval for 5-15 days in the dose 20-70 ml. Method provides preparing heterologous antirabies serum of high specific activity.

EFFECT: improved preparing method, improved and valuable properties of serum.

12 cl, 1 tbl, 4 ex

Изобретение относится к биотехнологии и иммунологии, в частности к способу получения гипериммунной гетерологичной антирабической сыворотки, и может быть использовано для получения гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

Бешенство до сих пор остается значимой медицинской и экономической проблемой. Это обусловлено тем, что сохраняется постоянная угроза заражения людей вирусом бешенства в связи с существованием природных очагов заболевания и распространением этой инфекции среди диких и домашних животных [1, 2, 3]. По данным ВОЗ, в мире в среднем каждый год регистрируется 500000 случаев активно-пассивной обработки и 35000-50000 смертей от бешенства [4, 5, 6].

Бешенство - острая нейроинфекция теплокровных животных, вызываемая рабдовирусом бешенства, без специального лечения приводит к смерти. В комплексе мероприятий профилактики и лечения гидрофобии ведущее место занимает специфическая активно-пассивная иммунизация. Комитет ВОЗ по бешенству рекомендовал местное применение антител во всех случаях заражения гидрофобией, в особенности при тяжелых заражениях [7].

Поскольку существующие методы очистки и концентрации гетерологичных сывороток еще не позволяют добиться высокой степени очистки и концентрации антител, важное значение имеет разработка способов получения исходных высокоспецифичных иммунных сывороток.

Исследования по получению антирабической сыворотки были начаты еще в 1889 г., когда Babes и Lepp обнаружили в крови иммунизированных собак нейтрализующие вирус бешенства антитела, с тех пор многие работы были направлены на получение сыворотки, обладающей высокой активностью.

Получение нативных сывороток с высокой концентрацией антител добиваются гипериммунизацией животных, т.е. применением интенсивных схем иммунизации, состоящих из многих циклов и инъекций антигена. Количество циклов, число инъекций в каждом цикле, дозы и способы введения антигенов определяются в каждом конкретном случае, исходя из особенностей антигена, его состояния, вида животных-продуцентов и целевого назначения сывороточного препарата. Существует прямая связь между силой антигенного раздражения и качеством антигена с уровнем накопления специфических антител в крови животных. В то же время качество антигена в значительной мере зависит от штамма вируса, методов его культивирования и очистки.

Известны способы получения антирабической сыворотки путем иммунизации животных-продуцентов мозговой взвесью фиксированного вируса бешенства, где в качестве субстрата репродукции вируса бешенства используют мозг жеребят, собак, овцы, крупного рогатого скота (КРС) и т.д. Недостатком использования инфицированной мозговой взвеси различных видов животных является образование и накопление в крови продуцентов антител к мозговой ткани (цитотоксинов), которые при введении человеку могут вызвать серьезные побочные реакции [8]. Известно, что антирабические вакцины, изготовленные из мозга новорожденных и взрослых животных, могут вызывать у привитых осложнения со стороны нервной системы [9]. Доказано, что мозговая ткань обладает не только энцефалитогенной активностью, но и снижает защитные свойства организма. Кроме того, очистка вируса от балластных мозговых веществ химическими (фреоном, протамином) и физическими методами (центрифугированием) оказались не пригодными для практического применения. Уменьшение содержания мозгового вещества путем разведения антирабической вакцины тоже не дало положительных результатов. Было показано, что антирабическая вакцина иммуногенна при пороговой концентрации мозгового вещества 2,5%, ниже этой концентрации вакцина не создавала в организме иммунизированных животных иммунитета достаточной напряженности [10].

М.А.Селимов с соавторами предложил для иммунизации лошадей-продуцентов применять фиксированный вирус бешенства, выращенный в культуре первичных клеток почки сирийских хомяков (ПСХ) или новорожденных морских свинок [11].

В известном способе не раскрыта очистка антигена от бычьей сыворотки и клеточного

детрита, использование адъюванта и схема иммунизации. Балластные белки и другие антигенные вещества, имеющие источником происхождения питательную среду, на которой происходил рост вируса, являясь часто полноценными антигенами, вызывают при иммунизации образование соответствующих неспецифических по отношению к антигену вакцины антител, чем усиливают реактогенность препарата и их сенсибилизирующие свойства [12].

На культуре ткани почек сирийских хомяков вирус накапливается в меньшем титре и обладает меньшей иммуногенностью, чем полученный на мозговом субстрате, что требует применения больших доз антигена или использования адъюванта. Большие дозы антигена индуцируют образование низкоафинных антител, синтез которых продолжается длительный период времени.

Известен способ получения антирабической сыворотки, предложенный T.Luekrajang с соавторами [13]. Инактивированный антиген вируса бешенства на протяжении 105 дней вводят подкожно с интервалом 7 дней, первую инъекцию делают с полным адъювантом Фрейнда. Недостатком данного способа является то, что при подкожном пути введения вирус бешенства меньше контактирует с сетью нервных рецепторов и вызывает меньший иммунитет, чем при внутрикожном и внутримышечном пути введения [14, 15].

Прототипом настоящего изобретения является способ, заключающийся в 5-кратной иммунизации овец инактивированным антигеном вируса бешенства с 14-дневным интервалом, используя внутрикожное и внутримышечное введение антигена с адъювантами (адъюванты Фрейнда и 0,3% гидроокись алюминия) в 3-42 точки животного [16]. В качестве антигена применяют 5%-ную суспензию мозга овец, инфицированных вирусом бешенства референс-штаммом CVS, инактивированную β -пропиолактоном.

Недостатком указанного способа является использование для иммунизации неочищенной 5% мозговой суспензии овец. Использование мозговой ткани приводит к образованию и накоплению цитотоксических антимозговых антител в сыворотке овец. Кроме того, мозговая субстанция обладает тромбокиназной активностью и может вызвать шок у животных-продуцентов. Попадая в кровоток, она вызывает тромбоз сосудов внутренних органов и мозга [8, 9]. Следует также отметить, что применяемый для иммунизации антиген не оттитрован и не очищен от балластных белков.

Другим недостатком прототипа является использование адъюванта Фрейнда, который имеет невысокую сорбционную емкость, и нестандартность эмульсионной смеси антигена и адъюванта. Адъювант Фрейнда обладает высокой реактогенностью и возможностью аллергизации и аутоаллергизации. По данным А.Х.Канчурина [17] микробные компоненты водно-масляных адъювантов типа Фрейнда, независимо от их природы, могут вызывать у сенсибилизированных животных клинические проявления, имеющие специфическую аллергическую природу. Применение адъювантов типа смесей Фрейнда, по мнению экспертов ВОЗ (18), таит в себе потенциальную опасность индуцирования опухолей. Используемая в качестве адъюванта гидроокись алюминия не обладает высоким иммуномодулирующим действием [19, 20]. Высокое содержание 0,3% гидроокиси алюминия в сорбированном антигене увеличивает площадь патолого-анатомического очага на месте инъекции [21]. По рекомендации ВОЗ в сорбированных препаратах, предназначенных для людей, должно содержаться не более 1,25 мг/мл ионов алюминия (в 1 мл геля может содержаться от 6 до 22 мг гидроокиси алюминия).

Кроме того, данный способ получения антирабической сыворотки предусматривает использование кратковременной схемы иммунизации и позволяет получить невысокий титр специфических антител, поэтому рекомендуется для получения диагностических сывороток. Недостатком метода является и кратковременное использование продуцентов, в результате чего появляется необходимость в частом приобретении новых животных, их карантинировании и дополнительном расходовании антигена, что делает данный метод нерентабельным. Использование овец в качестве доноров антирабической плазмы не позволяет получить большого количества иммунной сыворотки, к тому же их кровь может быть контаминирована вирусами скрепи.

Таким образом, проблема использования очищенного вируса бешенства для иммунизации животных-продуцентов не разрешена до сих пор. Содержащиеся в неочищенном вирусе посторонние белковые компоненты способны вызывать у продуцентов развитие шоковых, анафилактикоидных и пирогенных реакций. Качество антигена вируса бешенства должно оцениваться не только по иммуногенности, но и по его потенциальной опасности. Известные схемы иммунизации не безопасны и не позволяют получить антирабическую сыворотку с высокой специфичностью.

Задачей, на решение которой направлено изобретение, является получение гетерологичной антирабической сыворотки с высокой специфической активностью.

Технический результат предлагаемого способа заключается в разработке в промышленных масштабах эффективного и безопасного способа гипериммунизации животных-продуцентов очищенным, высокоиммуногенным антигеном вируса бешенства с низким содержанием примесных белковых компонентов и получение больших объемов гипериммунной высокоспецифичной антирабической сыворотки с высоким содержанием γ -глобулиновой фракции и минимальным содержанием неспецифических антител.

Сущность изобретения заключается в следующем: для получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки в качестве антигена используют вирус бешенства штамм Внуково-32, полученный на культуре перевиваемых клеток Vero и/или на первичной культуре клеток ПСХ, фильтрованный, инактивированный, очищенный и концентрированный адсорбцией на геле фосфата алюминия при pH=5,0-8,0 с концентрацией ионов алюминия 0,2-1,25 мкг/мл или ультрацентрифугированием или методами ультрафильтрации с последующей очисткой через пористые кремнеземы или ионообменной хроматографии. В качестве адъюванта используют гель фосфата алюминия с концентрацией ионов алюминия 0,2-1,25 мкг/мл и/или нуклеинат натрия в количестве 0,002-0,5 мг/мл. Для иммунизации используют антиген с индексом иммуногенности не менее 9,5 МЕ/мл, содержащий белок меньше 200 мкг/мл, бычий сывороточный альбумин - менее 0,5 мкг/мл, клетки ПСХ и Vero - менее 0,5 мкг/мл, клеточную ДНК в вирусе, полученном на культуре перевиваемых клеток Vero, - 5,0-10,0 нг/мл. В качестве животных-продуцентов используют лошадей или КРС. Грундинмунизация состоит из 1-3 внутрикожных и/или внутримышечных инъекций антигена дозой 3-15 мл с интервалом 14-30 дней, после завершения которой, на 45-60 день, начинается основной цикл иммунизации, состоящий из 10-15 инъекций антигена дозой 5-70 мл с интервалом 5-15 дней, внутрикожно и/или внутримышечно в несколько точек. Основной цикл завершается кровопусканием с последующим предоставлением отдыха в течение месяца. После чего продуцентов иммунизируют раз в месяц дозой 20-70 мл, в зависимости от иммуногенности вакцины, внутрикожно и/или внутримышечно. Раз в полгода проводят укороченный цикл иммунизации, состоящий из 2-4 внутрикожных и/или внутримышечных инъекций антигена дозой 20-70 мл с интервалом 5-15 дней и вновь производят крововзятие. Кровопускание делают на 7-30-е сутки после завершения каждого цикла. В полученной антирабической плазме определяют специфическую активность в тесте протективной защиты *in vivo* на белых беспородных мышах.

Данный способ позволяет получить высокоспецифичную гетерологичную антирабическую сыворотку с минимальным содержанием антител к примесным компонентам антигена, в которой специфическая активность составляет не менее 75 МЕ/мл, γ -фракция - не менее 40%, антитела к клеткам Vero и ПСХ - менее 0,5 мкг/мл.

В отличие от прототипа в заявляемом способе для иммунизации используют вирус бешенства, выращенный на культуре перевиваемых клеток Vero (22) и/или на первичной культуре клеток ПСХ. Вирус концентрируют и очищают сорбцией на геле фосфата алюминия при pH=5,0-8,0 с концентрацией ионов алюминия 0,2-1,25 мкг/мл или ультрацентрифугированием или методами ультрафильтрации с последующей очисткой через пористые кремнеземы или ионообменной хроматографии. В качестве адъюванта используют гель фосфата алюминия с концентрацией ионов алюминия 0,2-1,25 мкг/мл

и/или нуклеинат натрия 0,002-0,5 г/мл. Введены методы контроля иммуногенности вируса и содержания примесных веществ в антигене. Индекс иммуногенности составляет не менее 9,5 МЕ/мл, белок - менее 200 мкг/мл, бычий сывороточный альбумин - менее 0,5 мкг/мл, клетки ПСХ и Vero - менее 0,5 мкг/мл, клеточная ДНК - 5,0-10,0 нг/мл. Продуктом антирабической плазмы являются лошадь и КРС. Схема иммунизации, состоящая из 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 грундиммунизации, основного, поддерживающего и укороченного циклов, позволяет длительное время эксплуатировать одних и тех же животных-продуцентов и получать от них высокоспецифичную гетерологичную антирабическую сыворотку, свободную от цитотоксинов, с титром протективных антител не менее 75 МЕ/мл, фракцией γ -глобулинов - не менее 40%, в которой антитела к клеткам Vero и ПСХ - менее 0,5 мкг/мл, пригодную для получения антирабического гетерологичного иммуноглобулина. Заявляемый способ безопасен и высокоэффективен.

Совокупность отличительных признаков заявляемого способа позволила получить следующие преимущества: культивирование вируса бешенства на культуре перевиваемых 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 клеток Vero и на первичной культуре клеток ПСХ, позволяет получить безопасный и эффективный антиген. Клетки Vero экономичны в получении, стандартны и стабильны, воспроизводство культуры клеток осуществляется при постоянных условиях с контролируруемыми параметрами. Перевиваемые гетероплоидные клетки Vero могут выращиваться в больших объемах и позволяют получать вирус с высоким титром за достаточно короткий срок. Использование методов концентрирования и очистки позволяют получить безопасный, высокоочищенный и концентрированный вирус бешенства. Метод концентрации и очистки адсорбцией вируса на геле фосфата алюминия прост в исполнении и экономичен, сорбция вируса на гель с концентрацией ионов алюминия 0,2-1,25 мкг/мл при pH=5,0-8,0 позволяет полностью адсорбировать и стабилизировать неустойчивый вирус. Используемые в качестве адъюванта фосфат алюминия и нуклеинат натрия, стимулируя напряженность иммунного ответа, значительно повышает иммуногенность очищенного вируса. Нуклеинат натрия нетоксичен и неаллергенен [23]. Полученный антиген может быть лиофилизирован для получения сухой формы, более устойчивой к воздействию физических и химических факторов, что увеличивает срок его использования. Антиген контролируют на иммуногенность и содержание примесных компонентов, что 30
 35
 40
 45
 50
 позволяет получить высокоактивную и высокоспецифичную антирабическую сыворотку с минимальным содержанием неспецифичных антител. Грундиммунизация позволяет повысить не только специфическую активность антирабической сыворотки, но и выход иммунологически реактивных продуцентов. Введение 1-3 инъекций антигена с интервалом 14-30 дней в период грундиммунизации и начало ревакцинации на 45-60 день позволяет организму продуцента полностью перестроиться и в достаточной мере стимулировать антителообразование. Длительное введение антигена и возрастающая антигенная нагрузка в период основного цикла позволяет получить максимальное количество специфических антител, при этом повторное введение антигена осуществляется через оптимальный интервал времени с учетом динамики формирования антител. Комбинированное введение антигена, внутрикожное и внутримышечное, способствует получению большего титра антирабических антител вследствие большего контакта вируса с сетью нервных рецепторов. Предоставление продуцентам отдыха в течение месяца, когда животных не подвергают никаким манипуляциям, ведет к восстановлению иммунологической реактивности организма, его гематологических и биохимических показателей крови. Однократная ежемесячная ревакцинация небольшой дозой антигена способствует повышению специфической активности антирабической сыворотки. Укороченный цикл гипериммунизации, который проводится раз в полгода и состоит из 2-4 внутримышечных и/или внутрикожных инъекций с увеличением антигенной нагрузки с интервалом 5-15 дней, способствует поддержанию и повышению титра специфических антител на достаточном уровне в течение продолжительного времени. При иммунизации учитывается, что доза вводимого антигена зависит от его иммуногенности. Маленькие дозы высокоиммуногенного антигена позволяют получить высокоактивную сыворотку, содержащую высокоаavidные

антитела, и не вызывают рефракторность организма, что удлиняет срок эксплуатации продуцента. Использование лошадей и крупного рогатого скота в качестве продуцентов антирабической сыворотки позволяет получить большие количества крови, от 160 до 200 литров, от одного животного в год. Кроме того, антирабическая сыворотка, полученная

от крупного рогатого скота, является хорошей альтернативой для реципиентов, сенсibilизированных к лошадиному белку. Следует отметить, что специфическая активность антирабической сыворотки определяется в тесте биологической протективной защиты *in vivo*. Кроме этого, полученная антирабическая сыворотка контролируется на наличие антител к клеткам ПСХ и Vero, т.е. субстрату, на котором происходил рост вируса.

Антигены вируса бешенства контролировались по следующим методикам.

Антигенную активность вируса бешенства исследовали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Иммуногенную активность определяли в тесте NIH (США) в волуметрической модификации на белых беспородных мышах массой (11 ± 1) г с отраслевым стандартным образцом (ОСО) иммуногенной активности концентрированной очищенной культуральной антирабической вакцины. Бычий сывороточный альбумин контролировали методом ракетного иммуноэлектрофореза (по ФС 42-3874-99, с.46). Клетки почек сирийского хомячка и клетки Vero контролировали методом ракетного иммуноэлектрофореза, чувствительность метода 0,5 мкг/мл. Содержание белка в антигене определяли по методу Лоури (по ФС 42-3874-99, с.7). Содержание клеточной ДНК в вирусном материале, полученном на культуре перевиваемых клеток Vero - методом дот-гибридизации (по МУК 4.1/4.2.588-96, с.15). Содержание ионов алюминия определяли с помощью реакции комплексообразования ионов алюминия с трилоном-Б и последующем обратном титровании избытка трилона-Б (по ФС 42-3874-99, с.61).

Антирабическую сыворотку контролировали на специфическую активность в тесте протективной защиты *in vivo* на белых беспородных мышах массой (10 ± 1) г с фиксированным вирусом бешенства штамм CVS против 100-1000 LD₅₀ относительно отраслевого стандартного образца специфической активности антирабического гаммаглобулина (ОСО 42-28-200-92). Электрофоретическую однородность методом электрофореза на пленках из ацетат целлюлозы (по ФС 42-3874-99, с.20). Содержание антител к ПСХ и клеткам Vero в полученной антирабической плазме контролировали методом ракетного иммуноэлектрофореза, чувствительность метода 0,5 мкг/мл.

Примеры конкретного выполнения

Пример 1. В качестве антигена используют вирус бешенства штамм Внуково-32 адаптированный к перевиваемым гетероплоидным клеткам Vero, который добавляют из расчета 0,1 ЛД₅₀/кл к культуре клеток Vero в концентрации 100 тыс. кл/мл. Зараженные вирусом клетки соединяют с ростовой средой и культивируют в биореакторе с использованием микроносителей. После смены ростовой среды на поддерживающую среду делают сборы вирусосодержащей жидкости. Полученные сборы фильтруют через фильтр Кулагина с диаметром пор 0,45 мкм и инактивируют с помощью аппарата-иррадиатора ультрафиолетовых лучей. В полученной вирусосодержащей жидкости индекс иммуногенности составил - 1,13 МЕ/мл, количество белка - 300 мкг/мл, бычий сывороточный альбумин - 1,2 мг/мл. Концентрацию вируса и очистку от балластных белков осуществляют сорбцией вируса на геле фосфата алюминия при pH=7,3 с концентрацией ионов алюминия 1,0 мг/мл. Экспозицию ведут 3 ч при температуре 4°C и постоянном перемешивании. Сорбированный вирус промывают буфером для адсорбции с pH=7,3. В полученном антигене индекс иммуногенности составляет 16,6 МЕ/мл, белок - 170 мкг/мл, бычий сывороточный альбумин - 0,4 мкг/мл, клеточная ДНК - 5 нг/мл, клетки Vero - 0,2 мкг/мл. Этим антигеном иммунизируют лошадь массой (325 ± 25) кг. Грундиниммунизация состоит из двух внутрикожных инъекций антигена дозой 5 и 10 мл с интервалом 20 дней. Основной цикл начинается на 50 день и состоит из пяти инъекций антигена с интервалом 14 дней и восьми инъекций с интервалом 7 дней, с увеличением вводимой дозы антигена от 5 до 70 мл. Антиген вводят внутрикожно и внутримышечно, в несколько точек на шее и крупе лошади. Затем в течение полугода лошадь иммунизируют с интервалом 30 дней

дозой 30-50 мл внутривенно и внутримышечно, после чего проводят укороченный цикл иммунизации, состоящий из четырех инъекций антигена дозой 20, 30, 40, 50 мл с интервалом 7 дней. Антиген вводят в несколько точек внутривенно и внутримышечно. Забор крови делают на 14 день после завершения основного цикла и на 14 день после

ревакцинации. Специфическую активность полученной антирабической сыворотки определяют в тесте протективной защиты *in vivo* на белых беспородных мышах.

На 140-й день после завершения основного цикла иммунизации в полученной антирабической сыворотке специфическая активность была 133,7 МЕ/мл, γ -фракция - 44,5%, антитела к клеткам Vero не выявлялись. На 230-й день ревакцинации, после трех однократных ежемесячных инъекций антигена, титр специфических антител составил 168,2 МЕ/мл, γ -фракция - 48,7%, антитела к клеткам Vero не выявлены. На 348 день иммунизации, после укороченного цикла иммунизации, специфическая активность составила 177,9 МЕ/мл, γ -фракция - 52,5%, антитела к клеткам Vero - менее 0,5 мкг/мл. Полученные результаты представлены в таблице.

Пример 2. Получают вирусосодержащую жидкость с использованием штамма вируса бешенства Внуково-32 на культуре перевиваемых клеток Vero, как описано в примере 1. Полученная вирусосодержащая жидкость содержит белок в количестве 570 мкг/мл, бычий сывороточный альбумин - 1,6 мг/мл, индекс иммуногенности составляет - 2,01 МЕ/мл. Концентрацию и очистку вируса проводят ультрафильтрацией с последующей очисткой на колонке с пористым кремнеземом в трис-фосфатном буфере с pH=7,8. К очищенному вирусу добавляют фосфат алюминия с концентрацией ионов алюминия 0,6 мг/мл и стабилизаторы: лошадиный сывороточный альбумин в конечной концентрации 0,5%, сахарозу 7,5%, желатозу 1% и лиофильно высушивают. Перед использованием антиген разводят в воде для инъекций. В полученном антигене индекс иммуногенности составил 19,8 МЕ/мл, количество белка - 98 мкг/мл, бычий сывороточный альбумин - 0,2 мкг/мл, клеточная ДНК - 3 нг/мл. Этим антигеном иммунизируют лошадь массой (330 $\pm$ 25) кг.

Грундиниммунизация состоит из двух внутривенных и внутримышечных инъекций антигена дозой 5 и 10 мл с интервалом 30 дней. Основной цикл начинается на 45 день и состоит из трех внутривенных инъекций антигена дозой 5, 10, 15 мл с интервалом 14 дней и семи инъекций с интервалом 7 дней с увеличением вводимой дозы антигена от 20 до 50 мл, который вводят внутривенно и внутримышечно. Затем в течение полугода лошадь иммунизируют раз в месяц дозой 20-30 мл внутривенно и внутримышечно, после чего проводят укороченный цикл иммунизации, состоящий из трех инъекций антигена дозой 20, 25, 30 мл с интервалом 14 дней внутривенно и внутримышечно. Кровь брали на 20-й день после каждого цикла иммунизации. На 110-й день после завершения основного цикла в полученной антирабической сыворотке специфическая активность была 120,1 МЕ/мл, γ -фракция - 43,8%, антитела к клеткам Vero отсутствовали. На 230-й день ревакцинации, после четырех однократных ежемесячных инъекций антигена, титр специфических антител составил 172,1 МЕ/мл, γ -фракция - 50,6%, антитела к клеткам Vero не выявлены. На 333 день иммунизации, после укороченного цикла иммунизации, специфическая активность составила 183,0 МЕ/мл, γ -фракция - 56,3%, антитела к клеткам Vero - около 0,2 мкг/мл. Полученные результаты представлены в таблице.

Пример 3. Получают вирусосодержащую жидкость с использованием штамма вируса бешенства Внуково-32 на культуре перевиваемых клеток Vero, как описано в примере 1. Полученная вирусосодержащая жидкость с индексом иммуногенности 5,0 МЕ/мл содержит белок в количестве 430 мкг/мл и бычий сывороточный альбумин - 1,3 мг/мл. Отделенную от клеток вирусосодержащую жидкость концентрируют ультрацентрифугированием при 50000 *g* в течение 60 мин при температуре +4°C. Осадок ресуспендируют на магнитной мешалке в течение 20 мин с последующим воздействием ультразвуком 1 МГц в течение 60 сек и осветляют центрифугированием при 700 *g* в течение 15 мин. К очищенному вирусу добавляют фосфат алюминия с концентрацией ионов алюминия 0,3 мг/мл. Сорбированный вирус инактивируют ультрафиолетовыми лучами. Добавляют стабилизаторы и лиофильно

высушивают. Перед использованием к антигену добавляют нуклеинат натрия в количестве 0,25 мг/мл и разводят в воде для инъекций. В полученном антигене индекс иммуногенности составил 25,2 МЕ/мл, количество белка - 70 мкг/мл, бычий сывороточный альбумин - 0,2 мкг/мл, клеточная ДНК - 2,5 нг/мл. Этим антигеном иммунизируют лошадь массой (330±25) кг. Грундиниммунизация состоит из одной внутрикожной инъекции антигена дозой 10 мл. Основной цикл начинается на 60-й день и состоит из десяти инъекций антигена с интервалом 14 дней с увеличением дозы антигена от 5 до 50 мл и трех инъекций с интервалом 7 дней дозой антигена 30 мл, который вводят внутрикожно и внутримышечно. Затем в течение полугода лошадь иммунизируют раз в месяц дозой 20-25 мл внутрикожно и внутримышечно, после чего проводят укороченный цикл иммунизации, состоящий из двух инъекций антигена дозой 20-30 мл с интервалом 14 дней внутрикожно и внутримышечно. На 175-й день после завершения основного цикла специфическая активность в полученной антирабической сыворотке составила 149,7 МЕ/мл, γ -глобулиновая фракция - 46,6%, антитела к клеткам Vero отсутствовали. На 268-й день ревакцинации, после четырех однократных ежемесячных инъекций антигена, титр специфических антител составил 192,3 МЕ/мл, γ -фракция - 57,2%, антитела к клеткам Vero не выявлялись. На 383-й день иммунизации, после укороченного цикла иммунизации, специфическая активность составила 211,2 МЕ/мл, γ -фракция - 58,0%, антитела к клеткам Vero - около 0,2 мкг/мл. Полученные результаты представлены в таблице.

Пример 4. Штаммом вируса бешенства Внуково-32, с множественностью заражения 0,01 ЛД₅₀/кл заражают трипсинизированные клетки почек сирийского хомяка в концентрации 500±100 тыс. кл/мл. Зараженные вирусом клетки соединяют с ростовой средой и культивируют в биореакторе с использованием микроносителей. После смены ростовой среды на поддерживающую делают сборы вирусосодержащей жидкости. Полученные сборы фильтруют и инактивируют. В исходной вирусосодержащей жидкости иммуногенная активность составляет 0,55 МЕ/мл, белка - 500 мкг/мл, бычьего сывороточного альбумина - 1,8 мкг/мл. Концентрацию и очистку вируса осуществляют методом ультрафильтрации с последующей очисткой ионообменной хроматографией на анионите ДЭАЭ-целлюлозе. Добавляют нуклеинат натрия в количестве 0,5 мг/мл, стабилизаторы и подвергают лиофильной сушке. В полученном антигене индекс иммуногенности составил 10,3 МЕ/мл, белок - 100 мкг/мл, бычий сывороточный альбумин - 0,3 мкг/мл, клетки ПСХ - 0,1 мкг/мл. Этим антигеном, разведенным в воде для инъекций, иммунизируют быка массой (335±25) кг. Грундиниммунизация состоит из трех внутрикожных и внутримышечных инъекций антигена дозой 5, 10 и 15 мл с интервалом 20 дней. На 45 день начинают основной цикл иммунизации, состоящий из 10 инъекций антигена с интервалом 7 дней с увеличением вводимой дозы от 5 до 50 мл и 5-ти инъекций антигена дозой 50 мл с интервалом 14 дней. Антиген вводят внутрикожно и/или внутримышечно, в несколько точек на шею и крупе. В течение полугода быка иммунизируют раз в месяц дозой 25-45 мл внутрикожно и внутримышечно, затем проводят укороченный цикл иммунизации, состоящий из трех внутрикожных и внутримышечных инъекций антигена дозой 20, 30 и 40 мл с интервалом 14 дней.

На 150-й день после завершения основного цикла иммунизации получили антирабическую сыворотку со специфической активностью 83,1 МЕ/мл, в которой γ -фракция составляла 40,8%, антитела к клеткам ПСХ не выявлялись. На 240-й день ревакцинации, после трех ежемесячных инъекций антигена, титр специфических антител составил 114,0 МЕ/мл, γ -фракция - 42,9%, антитела к клеткам Vero не выявлены. На 375 день иммунизации, после укороченного цикла иммунизации, специфическая активность составила 119,6 МЕ/мл, γ -фракция глобулина - 43,2%, антитела к ПСХ - менее 0,5 мкг/мл. Полученные результаты представлены в таблице.

Таким образом, предлагаемый способ иммунизации позволяет в производственных условиях получить высокоспецифичную гетерологичную антирабическую сыворотку со специфической активностью не менее 75 МЕ/мл, в которой γ -глобулиновая фракция

составляет не менее 40%, антитела к клеткам субстрата, на котором происходил рост вируса, - менее 0,5 мкг/мл, пригодную для получения гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Предлагаемый способ безопасен и высокоэффективен.

5

10

15

Таблица Характеристика антирабической сыворотки, полученной заявляемым способом				
Примеры	День иммунизации	Специфическая активность, /мл	γ-глобулин. фракция, %	АТ к субстрату, мкг/мл
1	140	133,7	44,5	-
	230	168,2	48,7	-
	348	177,9	52,5	0,2
2	110	120,1	43,8	-
	230	172,1	50,6	-
	333	183,0	56,3	0,1
3	175	149,7	46,6	-
	268	192,3	57,2	-
	383	211,2	58,0	0,2
4	150	83,1	40,8	-
	240	114,0	42,9	-
	375	119,6	43,2	0,3

Источники информации

1. Величко М.А. Бешенство - актуальная проблема здравоохранения // Воен. - мед. журн. - 1994. - № 2. - С.47-49.
2. Селимов М.А. Современная эпизоотическая ситуация и перспектива элиминации бешенства // Вопросы вирусологии. Москва, 1998, - № 5. - С.196-198.
3. Черкасский Б.Л., Кноп А.Г., Ведерников В.А. и др. Эпидемиология и эпизоотология бешенства на территории бывшего СССР // Журн. микробиол. - 1995. - № 1. - С.21-26.
4. Baer, G.M. In: Kurstares Control of Virus Diseases. - New York, Marcel Dekker, - 1984. - P.86.
5. Connolly K.P. Pets and pests: Misconceptions about Zoonotic infections. // Infect Med. - 2004. - 21(11). - P.557-65.
6. Hashmi A, Parviz S, Moosvi B, Rehman A, Luby S. Rabies deaths in Karach // Proceeding of the 2nd National Symposium on Basic and Applied Resarch in Health Care and Social Developmet, Karachi: Aga Khan University, 1995. - P.151.
7. World Health Organization (WHO). Recommendations on rabies postexposure treatment and the correct technique of intradermal immunization against rabies. Geneva: WHO.EMC.ZOO 96.6. - 1996.
8. Селимов М.А. Материалы к ликвидации заболеваемости гидрофобией // Дисс. докт. М., 1962.
9. Буковская С.Н. О частоте случаев шока при введении кроличьей и овечьей антирабических вакцин // Журнал Микробиол., Эпидемиол. и Иммунобиол. - М., 1965. - № 6. - С.134-136.
10. Мамаладзе А.И., Курашвили В.Е. Сравнительное изучение эффективности сухой антирабической вакцины из мозга овец и новорожденных кроликов с различным содержанием мозгового вещества // Материалы к всесоюзной конференции по проблеме «Научные основы производства бактериальных и вирусных препаратов» Уфа, 1969. - С.179-180.
11. Авторское свидетельство СССР № 200743. Способ производства антирабического гаммаглобулина. А 61 К 37/06. Оpubл. 05.04.1977.
12. Воробьев А.А. // Журнал Микробиол., Эпидемиол. и Иммунобиол. - 1954. - № 8. - С.59.
13. Luekrajang T., Wangsar. T., Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin // Laboratory techniques in rabies. - 1996. - P.401-403.
14. Грибенча С.В. Современные аспекты биологии и профилактики лиссавирусных инфекций // Дисс. докт. мед. наук. - М., 1993. - С.80.
15. Иванов В.С., Самуйленко А.Я., Титеричев В.И., Иванов И.В. Проявление иммуногенной потенции антирабической вакцины из штамма Щелково-51 в зависимости от

места ее введения // Тезисы конф. - Щелково, 2000. - С.33-36.

16. Патент РФ № 2196607. Способ получения гипериммунной антирабической сыворотки. А61К 39/205, А61К 39/42, G01N 33/569. Оpubл. 20.01.2003.

17. Канчурин А.Х. // Материалы V Межинститутской конференции памяти И.И.Мечникова. М., 1966. - С.55.

18. Исследования по иммунологии. ВОЗ. Женева, 1965. - С.119.

19. Ситник Н.П., Исрафилов А.Г., Крутилина Д.В., Шафеева Р.С., Кунцевич Ю.Г., Загидуллин Н.В., Кулагин В.Ф. Анительный ответ морских свинок на вакцинацию антирабической вакциной с различными адъювантами // Материалы Всероссийской научной конференции: «Актуальные вопросы вакцинно-сывороточного дела в XXI веке». Пермь, 2003. - С.56-57.

20. Ситник Н.П., Исрафилов А.Г., Крутилина Д.В., Шафеева Р.С. Влияние различных адъювантов на величину гуморального ответа // Всероссийская научная конференция: «Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов». Томск, 2004. - С.67-70.

21. Воробьев А.А. Рационально конструированные сорбированные анатаксины и закономерности иммуногенеза при их применении. Дисс. АМН СССР. Москва, - 1958.

22. Новые методы культуры животных тканей / Под редакцией проф. Ю.М.Оленова // М., 1978. - С.116-129.

23. Низкомолекулярная РНК: получение, гидролиз и применение в медицине / В.М.Земсков, М.Ю.Лидак, А.М.Земсков, У.Я.Микстайс // Рига, 1985. - С.39.

Формула изобретения

1. Способ получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки, включающий иммунизацию животных-продуцентов инактивированным вирусом бешенства совместно с адъювантом по схеме и выделение гипериммунной антирабической сыворотки, отличающийся тем, что для иммунизации используют вирус бешенства, полученный на культуре животных клеток, очищенный и концентрированный, который контролируют на содержание примесных компонентов, в качестве адъюванта используют фосфат алюминия и/или нуклеинат натрия, а схема иммунизации лошадей включает грундиммунизацию, основной, поддерживающий и укороченный циклы иммунизации.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что вирус бешенства выращивают на культуре перевиваемых клеток Vero или на первичной культуре клеток почек сирийского хомяка.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что вирус очищают и концентрируют адсорбцией на геле фосфата алюминия с концентрацией ионов алюминия 0,2-1,25 мкг/мл при pH 5,0-8,0.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что вирус очищают и концентрируют методами ультрацентрифугирования.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что вирус очищают и концентрируют методами ультрафильтрации с последующей очисткой через пористые кремнеземы или ионообменной хроматографией.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве адъюванта используют гель фосфата алюминия с концентрацией ионов алюминия 0,2-1,25 мкг/мл и/или нуклеинат натрия в количестве 0,002-0,5 мг/мл.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что антиген имеет индекс иммуногенности не менее 9,5 МЕ/мл, белок - менее 200 мкг/мл, бычий сывороточный альбумин - менее 0,5 мкг/мл, клетки ПСХ и Vero - менее 0,5 мкг/мл, клеточная ДНК в вирусе, полученном на культуре перевиваемых клеток Vero - 5,0-10,0 нг/мл.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве животных-продуцентов используют лошадей и крупный рогатый скот.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что грундиммунизация состоит из 1-3 внутрикожных и/или внутримышечных инъекций антигена дозой 3-15 мл с интервалом 14-30 дней.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что на 45-60-й день начинается основной цикл

иммунизации, состоящий из 10-15 внутрикожных и/или внутримышечных инъекций антигена дозой 5-70 мл с интервалом 5-15 дней, после чего в течение полугода животных-продуцентов иммунизируют раз в месяц дозой 20-70 мл.

5 11. Способ по п.1, отличающийся тем, что один раз в полгода проводят укороченный цикл иммунизации, состоящий из 2-4 внутрикожных и/или внутримышечных инъекций антигена дозой 20-70 мл с интервалом 5-15 дней.

10 12. Высокоспецифичная гетерологичная антирабическая сыворотка, полученная способом по п.1, в которой специфическая активность составляет не менее 75 МЕ/мл, содержание γ -глобулиновой фракции - не менее 40%, антитела к клеткам Vero и ПСХ - менее 0,5 мкг/мл.

15

20

25

30

35

40

45

50