
В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

©КОЛЛЕКТИВАВТОРОВ, 2017

УДК 615.373:547.962.4|.03:616.98:578.825.11|.012

Лазаренко А.А.¹, Алимбарова Л.М.¹, Мордвинцева Э.Ю.², Баринский И.Ф.¹

РАЗРАБОТКА СВЕЧЕВОЙ ФОРМЫ ПРЕПАРАТА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА С ВЫСОКИМИ ТИТРАМИ АНТИТЕЛ К ВИРУСАМ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1-го И 2-го ТИПОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ФОРМ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ

¹ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;²ЗАО «ФИРМА «ВИТАФАРМА», 125124, г. Москва

Терапия герпесвирусной инфекции (ГИ) представляет большие трудности, несмотря на обширный арсенал терапевтических средств, особенно у беременных, новорожденных и детей первых лет жизни, а также у лиц с иммунной недостаточностью. В связи с этим в настоящее время внимание врачей привлекает возможность использования иммуноглобулинов для лечения ГИ. Целью работы явилось создание технологии получения свечевой формы препарата, содержащей иммуноглобулины доноров с высоким уровнем вируснейтрализующих антител к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1 и ВПГ-2), для лечения хронических форм герпетической болезни. Дизайн исследования включал следующие этапы: отбор гамма-глобулинов с высоким титром антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в иммуноферментном тесте; определение уровня вируснейтрализующих антител в отобранных сериях гамма-глобулинов в опытах на культуре ткани и животных; лиофилизацию иммуноглобулинов; разработку свечевой формы препарата, содержащей гамма-глобулины доноров с высоким уровнем вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2; изучение сохранности активности вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в свечевой форме препарата с иммуномодулятором гиалуроновой кислоты. В результате проведенных работ была получена лекарственная форма иммуноглобулина в виде суппозитория, которая соответствовала требованиям безопасности и эффективности, не обладала токсичностью, пирогенностью. Обсуждаются вопросы клинического применения этого препарата в качестве метода терапии ГИ.

Ключевые слова: стандартный образец; иммуноглобулины человека; герпес; гиалуроновая кислота; реакция нейтрализации.

Для цитирования: Лазаренко А.А., Алимбарова Л.М., Мордвинцева Э.Ю., Баринский И.Ф. Разработка свечевой формы препарата иммуноглобулинов человека с высокими титрами антител к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов для лечения хронических форм герпетической болезни. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(1): 36-41.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-36-41>*Lazarenko A.A.¹, Alimbarova L.M.¹, Mordvintseva E.Yu.², Barinsky I.F.¹*

DEVELOPMENT OF THE SUPPOSITORY FORM OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN PREPARATION WITH HIGH TITERS OF ANTIBODIES TO HERPES SIMPLEX VIRUS TYPES 1 AND 2 FOR THE TREATMENT OF CHRONIC FORMS OF HERPETIC DISEASE

¹Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;²ZAO FIRMA "VITAFARMA", Moscow, 125124, Russian Federation

In spite of the vast arsenal of therapeutic agents, therapy of herpes virus infection (HVI) is very difficult, particularly in pregnant women, newborns and children in the first years of life, as well as in patients with immune deficiency. In this regard, possibility of using immunoglobulins for the treatment of HVI is currently attracting the attention of doctors. The aim of this work was to develop a suppository form of the drug containing donor immunoglobulins with high levels of neutralizing antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 for the treatment of chronic forms of herpetic disease. The study included the following steps: 1) selection of gamma-globulins with high antibody titer for HSV-1 and HSV-2 ELISA test; 2) determination of the level of neutralizing antibodies in the selected series of gamma-globulins in tests in tissue cultures and animals; 3) lyophilization of immunoglobulins; 4) development of the suppository form of the preparation containing gamma-globulin donors with high levels of neutralizing antibodies to HSV-1 and HSV-2; 5) study of the safety of the activity of neutralizing antibodies to HSV-1 and HSV-2 in the suppository form of the drug with hyaluronic acid used as immunomodulator. As the result of this work, immunoglobulin preparation in the suppository form was developed. The developed preparation meets the requirements for safety and efficacy. It is not toxic or pyrogenic. The problems of clinical use of this drug as a method of HVI therapy are discussed.

Keywords: standard sample; human immunoglobulins; herpes; hyaluronic acid; neutralization reaction.

Для корреспонденции: Алимбарова Людмила Михайловна, канд. мед. наук, доцент, вед. науч. сотр. лаб. сравнительной вирусологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: virology@mail.ru

For citation: Lazarenko A.A., Alimbarova L.M., Mordvintseva E.Yu., Barinsky I.F. Development of the suppository form of human immunoglobulin preparation with high titers of antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 for the treatment of chronic forms of herpetic disease. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(1): 36-41. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-36-41>

For correspondence: Ludmila M. Alimbarova, Ph.D., leading researcher of the Laboratory of comparative virology, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: virology@mail.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 19 March 2016

Accepted 29 March 2016

Герпесвирусная инфекция (ГИ), обусловленная вирусами простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2), является актуальной проблемой здравоохранения. Распространенность инфицирования ВПГ в развитых странах составляет 60—85% среди взрослых и 65% среди детей школьного возраста [1]. Риск манифестации симптоматической инфекции возрастает во время беременности, у новорожденных и лиц с иммунной недостаточностью. Терапия ГИ представляет большие трудности, несмотря на обширный арсенал терапевтических средств. Этиотропная терапия, к которой относят применение химиопрепаратов, специфических иммуноглобулинов, является одним из эффективных направлений лечения ГИ [1—3]. Иммуноглобулинотерапия как иммунотерапевтический подход к лечению ГИ имеет ряд преимуществ перед другими средствами, что подтверждается данными ряда отечественных и зарубежных авторов [2, 4, 5]. Однако в клинической практике использование иммуноглобулинов при лечении ГИ остается не до конца востребованным, что обусловлено рядом причин, основными из которых являются широкое использование химиопрепаратов (синтетических аналогов пуриновых нуклеозидов (Ацикловир (АЦВ)), ограниченный опыт применения иммуноглобулинов врачами общей практики и фобия перед иммуноглобулинами как потенциально опасными средствами, вызывающими при внутривенном введении побочные эффекты [1, 6, 7]. Следует отметить, что иммуноглобулины обычно хорошо переносятся, нежелательные реакции регистрируются лишь у 1—15% пациентов [8, 9]. Как и для любого белкового препарата, для них характерны «инфузионные реакции», которые появляются у части больных, не являются тяжелыми и купируются после прекращения инфузии или снижения дозы препарата [1, 8]. Однако в связи с регистрируемым ростом частоты иммунодефицитных состояний, увеличением резистентности микроорганизмов к химиопрепаратам, а также наличием противопоказаний для назначения АЦВ беременным отношение к специфическим иммуноглобулинам коренным образом меняется, о чем свидетельствуют работы отечественных и зарубежных авторов [2, 3, 7, 10, 11]. Перспективность данного направления обусловлена также 100-летним опытом использования антител в составе лечебных сывороток для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. В связи с этим целью данной работы было создание технологии получения свечевой формы препарата для лечения ГИ, содержащей иммуноглобулины доноров с высоким уровнем вируснейтрализующих антител к ВПГ 1-го и 2-го типов.

Материал и методы

Дизайн исследования: отбор гамма-глобулинов с высоким титром антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в иммуноферментном тесте; определение уровня вируснейтрализующих антител в отобранных сериях гамма-глобулинов в опытах на культуре ткани и животных; лиофилизация иммуноглобулинов; разработка свечевой формы препарата, содержащей гамма-глобулины доноров с высоким уровнем вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2; изучение сохранности активности вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в свечевой форме препарата. Опыты повторяли трехкратно.

Материалы. В работе использовали штаммы ВПГ-1 УС (Herpes simplex virus type 1) и ВПГ-2 ВН (Herpes simplex virus type 2), полученные из лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи». Вирусы культивировали на монослое клеток Vero. Специфическую инфекционную активность штаммов ВПГ определяли по наличию цитопатической дозы (ЦПД) вируса в клетках Vero и выражали в Ig ТЦД₅₀/мл. Клетки Vero культивировали в среде Игла с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 100 мкг/мл гентамицина.

Объектами исследования являлись лабораторные животные, полученные из питомника «Столбовая»: белые крысы, аутбредные, самцы, 100—120 г; морские свинки, самцы, 250—300 г; кролики, шиншилла, самцы, 2,5—3 кг; белые мыши, аутбредные, самцы (7—8, 18—20 г). Все манипуляции с зоологическими объектами осуществляли при строгом соблюдении правил, предписанных для работ с экспериментальными животными.

В работе использовали 150 экспериментально-производственных образцов нормальных иммуноглобулинов человека, полученных от доноров плазмы, не вакцинированных герпетической вакциной («Микроген» Минздрава РФ («Иммунопрепарат», Уфа); станция переливания крови ФМБА, Москва). Экспериментально-производственные образцы иммуноглобулина получены методом многостадийного низкотемпературного этанольного фракционирования белков плазмы по Кону и проверены в соответствии с международными требованиями и нормативными документами по исследованию плазмы крови человека и препаратов иммуноглобулинов [10, 11—17].

Титры антител к ВПГ (IgG) в плазме крови доноров и препаратах иммуноглобулина определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя коммерческие наборы для ИФА «ВектоВПГ-IgG-стрип» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). ИФА выполняли в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Результаты регистрировали с помощью спектрофотометра Stat Fax 3200 («Awareness Technology, Inc», США) при λ 450 нм. Содержание антител к ВПГ (IgG) вычисляли относительно отраслевого стандартного образца ОСО IgG анти-ВПГ-1,2 (ОСО 42-28-377-05), содержащего вируснейтрализующие антитела к ВПГ-1 и ВПГ-2. ОСО 42-28-377-05 применяется в системе здравоохранения РФ для оценки ИФА-методом содержания вируснейтрализующих антител в донорском сырье, препаратах иммуноглобулинов для получения специфического иммуноглобулина, а также для оценки эффективности проводимой иммунотерапии. В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие иммуноглобулины производства ЧАО «Биофарма», Украина, — «Гаммалин®» (Иммуноглобулин против ВПГ-1) и Иммуноглобулин против ВПГ-2 [12]. В качестве отрицательной сыворотки, не содержащей антител IgG к ВПГ-1 и ВПГ-2, использовали стандартную сыворотку производства Нижегородского предприятия по производству бакпрепаратов «ИмБио» по фармакопейной статье (ФС) 42-3641-98. Вируснейтрализующую активность и специфичность антител в образцах ОСО, экспериментально-производственных образцах

Таблица 1

Состав ингредиентов в свече

Ингредиент	На одну свечу	Соответствие нормативным документам
Имуноглобулин человека лиофилизированный	80 мг	
Гиалуроновая кислота	0,005 г	ТУ.9358.-005-12466809—98
Антибиотик: гентамицина сульфат	Не более 2 мкг	ВФС-42-3709—99
Наполнитель: кондитерский жир	До 75%	ГОСТ 28414—89
Парафины нефтяные твердые	7,5%	ГОСТ 23683—89
Эмульгатор Т-2	7,5%	ТУ 10-04-40-24—89

и референс-препаратах определяли с помощью реакции нейтрализации (РН): в культуре клеток, а также у животных [15, 18]. В первом варианте индикаторной системой РН являлись клетки Vero. Степень цитодеструкции оценивали под микроскопом по общепринятой четырехкрестовой системе (ФСП 42-71, ВС 93). Во втором варианте индикаторной системой РН являлась модель менингоэнцефалита у мышей, которую воспроизводили интрацеребральным введением смеси 100 ТЦД₅₀/мл вируса (штамм УС или ВН) с разведениями образцов иммуноглобулинов. Животным вводили по 0,03 мл смеси. Результаты учитывали по проценту летальности животных. Обработку результатов РН в двух модификациях проводили по методу Спирмена—Кербера [15]. Разность логарифмов титров вируса в контрольных и опытных образцах соответствовала логарифму индекса нейтрализации (ИН).

Разработка свечевой формы иммуноглобулина. При разработке состава и технологии изготовления суппозитория с иммуноглобулином особое внимание уделяли соблюдению требований к суппозиторным основам с целью обеспечения максимальной терапевтической эффективности препарата и стабильности качества свечей, а также учитывали значение вспомогательных веществ. Иммуностимулятор гиалуроновую кислоту вводили в свечу одновременно с препаратом иммуноглобулина. Для определения содержания гиалуроновой кислоты в 1 свече 10 свечей помещали в водяную баню при 37°C со 100 мл свежеекипяченой, охлажденной воды, встряхивали в течение 5 мин и фильтровали через бумажный фильтр (ГОСТ 12026—76). Суппозитории готовили по стандартной схеме [16, 17]. Состав ингредиентов в свече представлен в табл. 1.

Изучение сохранности активности вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в свечевой форме препарата. Полученный препарат должен быть специфически активен, т. е. вызывать специфический иммунитет к ВПГ при трехкратном введении белым крысам. Наличие антител в сыворотках животных изучали в РН (в культуре клеток). Вируснейтрализующая активность сывороток по показателю ИН должна быть не менее 2,0 lg ТЦД₅₀/мл для штамма УС и не менее 1,5 lg ТЦД₅₀/мл для штамма ВН.

Определение биологических характеристик *полуфабриката препарата, а также готового препарата* иммуноглобулина (стерильности, пирогенности и токсичности) выполняли по методикам, описанным в Государственной фармакопее XI 1. Пирогенность препаратов оценивали на кроликах, токсичность — на белых мышках массой 18—20 г и морских свинках (по МУК 4.1/4.2.588—96, с. 51). Состояние животных оценивали ежедневно по изменению массы тела, поведению, состоянию кожного покрова (наличию некроза или абсцесса в месте введения) и шерсти.

Отсутствие антител к вирусу гепатита С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, поверхностного антигена вируса гепатита В в образцах иммуноглобулинов подтверждали с использованием коммерческих наборов для ИФА «ИФА-НВsAg/м» и «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ» (ООО «НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород), «ИФА-анти-НСV», «Бест анти-ВГС» (комплект 2), «Бест анти-ВГС — СПЕКТР», «Бест анти-ВГС-IgM» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

По результатам проводимых исследований делали вывод о соответствии разработанной формы препарата иммуноглобулина требованиям безопасности (не содержит антител к ВИЧ и антигенов к гепатитам В и С) и о сохранности вируснейтрализующей активности в свечевой форме препарата (режим ускоренного старения) [18, 19].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ Excel 4.0 и Statistica 6.0 для Windows XP.

Результаты

Отбор иммуноглобулинов доноров крови человека со специфическими антителами к ВПГ 1-го и 2-го типов в

ИФА. Методом ИФА был проведен скрининг 150 серий экспериментально-производственных образцов нормальных иммуноглобулинов, из которых были отобраны 43 образца, содержащие антитела к ВПГ-1 и ВПГ-2 в различных титрах. Фоновое содержание антител в образцах иммуноглобулинов составило 1:1600. Образцы, в которых титры антител превышали в 4—6 и более раз фоновое значение, считали специфическими. В дальнейшем из тестируемых образцов были отобраны 9 имеющих титр антител к ВПГ-1 и ВПГ-2, определенный методом ИФА, от 1: 3200 до 1:25600 (табл. 2).

Полученные результаты (см. табл 2) свидетельствуют о том, что титры антител в отобранных сериях иммуноглобулинов статистически значимо превышали фоновые значения.

Важным свойством специфического иммуноглобулина должно быть наличие в нем вируснейтрализующих антител к вирусам ВПГ-1 и ВПГ-2, определение которых проводили в РН с использованием культуры клеток Vero, 100 ТЦД₅₀/мл доз вируса ВПГ-1 или ВПГ-2 и разведений исследуемых препаратов от 1:5 до 1:160. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку доноров, не содержащую антитела к ВПГ-1 и ВПГ-2. Критерием оценки являлись 2 параметра: титры антител и ИН, который должен быть не менее 2,0 lg ТЦД₅₀/мл для штамма УС и не менее 1,5 lg ТЦД₅₀/мл для штамма ВН. С этой целью были исследованы 9 отобранных ранее серий (№ 1—9). Результаты, приведенные в табл. 3, свидетельствуют о том, что титры антител к ВПГ-1, ВПГ-2 в сериях иммуноглобулинов № 1—9 с высокой степенью достоверности превышали фоновые значения и составляли 1:80—1:320. ИН был в диапазоне 1,0—3,0 lg. По результатам проведенных исследований были отобраны 5 серий препаратов иммуноглобулинов с наилучшими показателями в РН — серии № 1—4, 9.

Известно, что препараты крови человека, получаемые путем

Таблица 2

Титры антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в препаратах исследуемых иммуноглобулинов в ИФА

№ препарата	Разведение иммуноглобулинов				
	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	—
6	+	+	+	+	—
7	+	+	+	+	—
8	+	+	+	+	—
9	+	+	+	+	+

Примечание. * — $p < 0,05$.

Таблица 3

Результаты определения титра вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в РН на культуре клеток

Иммуноглобулин, серия №	Тест-вирус			
	ВПГ-1 (штамм УС)		ВПГ-2 (штамм ВН)	
	титр антител	ИН, lg	титр антител	ИН, lg
1	1:320*	2,5*	1:320*	2,0*
2	1:320*	3,0*	1:320*	2,25*
3	1:320*	2,5*	1:320*	2,0*
4	1:320*	2,0*	1:320*	1,5*
5	1:160	1,75	1:320*	1,75*
6	1:80	1,75	1:320*	2,0*
7	1:160	1,75	1:80	1,0
8	1:80	1,5	1:160*	1,5*
9	1:320*	2,5*	1:320*	2,0*
ОСО IgG анти-ВПГ-1,2 (ОСО 42-28-377-05)	1: 320		1: 160	
«Гаммалин®» (Иммуноглобулин против ВПГ-1, ЧАО «Биофарма», Украина)	1:320		Отр.	
Иммуноглобулин против ВПГ-2, ЧАО «Биофарма», Украина	Отр.		1:160	
Контрольная стандартная сыворотка	Отр.		Отр.	

Примечание. * — $p < 0,01$; отр. — антитела отсутствуют.

фракционирования, не могут быть в полной мере вирусобезопасными. Даже карантинизация всех порций плазмы не гарантирует отсутствие инфекционных агентов. Е.Б. Жибурт и В.Н. Тазеев [20] указывают, что вирусная безопасность продуктов крови обеспечивается отбором доноров, тестированием донаций и пулов плазмы, инактивацией и удалением вирусов в процессе производства. В связи с этим был проведен контроль отобранных в РН 5 серий иммуноглобулинов на отсутствие указанных выше вирусов, который не выявил наличие патогенов ни в одной из 5 серий иммуноглобулинов, что свидетельствовало об эффективности процессов вирусной инактивации исходного материала и его безопасности [19].

Исследования продолжались по показателю специфической безопасности отобранных серий иммуноглобулинов в соответствии с ФС [16]. Определение специфической безвредности (на отсутствие инфекционного ВПГ) отобранных 5 серий препаратов иммуноглобулинов проводили двумя последовательными пассажами на культуре клеток и двумя последующими последовательными пассажами на животных. Материалом второго пассажа специфической безвредности на культуре клеток были интрацеребрально заражены мыши (массой 8—10 г) в объеме 0,03 мл. Наблюдение за животными, проводившееся ежедневно в течение 2 нед, не выявило признаков заболевания или гибели ни у одного животного, что свидетельствовало о безвредности отобранных серий иммуноглобулинов.

Далее жидкие формы полученных серий иммуноглобулинов подвергались лиофилизации при $60 \pm 10^\circ\text{C}$. Сухую субстанцию иммуноглобулина получали на сублимационных установках LZ-45 (Чехия). Общая продолжительность лиофилизации составила 36 ч.

Одной из аттестуемых характеристик препаратов иммуноглобулинов, содержащих противогерпетические антитела, является сохранение специфической активности препарата при лиофилизации, которая была изучена по наличию вируснейтрализующих антител в РН на культуре клеток Vero.

Анализ всех стадий технологического процесса показал, что процесс лиофилизации как наиболее критичный не влиял на уровень вируснейтрализующих антител в препаратах (ИН в сериях № 1—4, 9 были идентичны данным, полученным в РН с препаратами до их лиофильной сушки и составили 1,5—2,5 lg) и позволил отобрать из них наиболее стабильные 3 серии (№ 2, 3 и 9), которые и стали основой для разработки свечевой формы препарата.

Получение готового препарата. Состав свечи приведен ранее (см. табл. 1). Одна единица свечевой формы содержала 80 мг лиофилизированного иммуноглобулина. Сохранность уровня вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в свечевой форме препарата определяли в РН в культуре клеток и в опытах на животных, как было описано ранее. Вируснейтрализующая активность образцов иммуноглобулинов по показателю ИН составила $2,5 \pm 0,5$ lg для штамма УС и $2,0 \pm 0,5$ lg для штамма ВН, что соответствовало требованиям нормативных документов.

Анализ стабильности уровня вируснейтрализующих антител в образцах свечевой формы препарата в зависимости от времени хранения проводили методом ускоренного старения согласно методическим рекомендациям «Определение стабильности ОСО и других МИБП ускоренным методом», разработанным в ГИСК им. Л.А. Тарасевича (2003). Исследования показали, что время хранения готового препарата не влияло на его качественные характеристики, в том числе ИН.

Готовые свечевые формы иммуноглобулинов (№ 2, 3, 9) далее были тестированы на токсичность, стерильность и пирогенность. Результаты исследований показали, что технология приготовления препарата не влияла на его иммунологические характеристики и разработанные свечевые формы иммуноглобулинов соответствовали требованиям ФС.

Обсуждение

Иммуноглобулины человека — группа иммунологических препаратов крови, представляющих собой выделенную промышленным способом иммунологически активную белковую фракцию плазмы крови здоровых доноров, несущую антительную активность различной специфичности. Препараты иммуноглобулинов в основном содержат иммуноглобулины класса G — антитела к различным возбудителям бактериальных и вирусных инфекций и/или их токсинам, обладают иммунозаместительной и иммуномодулирующей активностью и используются в терапии различных форм иммунодефицитов, а также для специфической профилактики и лечения ряда бактериальных и вирусных инфекций. На российском фармацевтическом рынке зарегистрировано более 100 наименований препаратов крови человека отечественного и зарубежного производства [1], в том числе для профилактики и лечения рецидивов ГИ (препараты иммуноглобулинов человека нормальные, специфические, специфические гипериммунные для внутривенного и внутримышечного введения, комплексные для перорального и местного введения) [12, 21—23]. За рубежом и в РФ разработаны свечевые формы препаратов иммуноглобулинов, которые используются для лечения различных инфекционных заболеваний людей, а также применяются в ветеринарии. Преимущество энтерального применения иммуноглобулинов очевидно: исключение инъекционного пути введения, возможность использования больших доз, хорошая переносимость.

Нами проведены эксперименты по разработке и получению препарата иммуноглобулина человека с высокими титрами вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в виде свечевой формы. В соответствии с международными требованиями основой для разработки гипериммунных препаратов явились отобранные нами экспериментально-производственные серии иммуноглобулинов, полученные из плазмы специально отобранных доноров, с исходно более высокими титрами специ-

фических антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 (по данным ИФА и РН), чем в популяции [21, 22]. По нашим данным, титры антител к ВПГ-1, ВПГ-2 составили 1:3200—1:51200, были сопоставимы с титрами противогерпетических антител в ОСО 42-28-377—05, представляющего пул плазмы, полученной от 800 доноров (IgG ВПГ-1 — 1:25000, IgG ВПГ-2 — 1:1280), и титрами антител в коммерческих иммуноглобулинах для внутривенного введения — «Гаммалин®», ЧАО «Биофарма», Украина (IgG ВПГ-1 — 1:25000, IgG ВПГ-2 — 1:640). На основе отобранных серий иммуноглобулинов была разработана технология получения свечевой формы препарата со стабильными иммунобиологическими характеристиками, основной из которых является наличие вируснейтрализующих антител, которые играют существенную роль в патогенезе ГИ. Защитное действие специфических антител связано как с их непосредственным участием в нейтрализации вирусных частиц, так и с активацией комплементопосредованного лизиса. Вируснейтрализующая активность в разработанных свечевых формах иммуноглобулинов по показателю ИН составила для штамма УС 2,5 ± 0,5 Ig, для штамма ВН — 2,0 ± 0,5 Ig, что соответствовало требованиям нормативных документов. Исследования показали, что технология производства препарата не влияет на характеристики конечного продукта (по содержанию вируснейтрализующих антител к ВПГ-1, ВПГ-2 свечевая форма иммуноглобулина сохраняла активность, характерную для жидкого образца, что полностью соответствовало требованиям ФС). Следует отметить, что разработанная форма иммуноглобулина в виде свечей не является дженериком коммерческих препаратов, так как у них разные источники получения плазмы доноров и технологии производства, состав подклассов IgG (общее содержание IgG > 95%), способы и количество стадий инактивации и элиминации вирусов.

Заключение

Таким образом, разработанная нами лекарственная форма иммуноглобулина в виде суппозитория вирусологически безопасна, соответствует требованиям безопасности и эффективности, не обладает токсичностью, пирогенностью и может быть использована в качестве метода терапии ГИ у иммунокомпromетированных пациентов, беременных женщин, для лечения активной ГИ у новорожденных и детей раннего возраста, а также для профилактики манифестации заболевания у инфицированных больных в трансплантологии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 3, 6, 10, 11, 13, 14, 17 см. REFERENCES)

- Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. *Герпесвирусные инфекции человека. Руководство для врачей. 2-е издание.* СПб.: СпецЛит; 2013.
- Люттов А.Г., Алешкин В.А., Мостовская Е.В., Усольцева В.В. Отечественный иммуноглобулин для внутривенного введения: инновационная технология и перспективы применения. *Лечение и профилактика.* 2012; (3): 109—12.
- Супотницкий М.В., Елапов А.А., Борисевич И.В., Кудашева Э.Ю., Климов В.И., Лебединская Е.В. Иммуноглобулины для внутривенного введения в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности. *Успехи современного естествознания.* 2015; (5): 182—3.
- Алешкин В.А., Люттов А.Г., Афанасьев С.С. Место иммуноглобулиновых препаратов в лечении и реабилитации инфекционных больных. *Новые лекарственные препараты.* 2003; (4): 6—10.
- Иванов В., Мосягин В., Вдовиченко М., Кудашева Э., Бондарев В., Борисевич И. Иммуноглобулин человека нормальный: эффективность и безопасность применения. *Врач.* 2015; (11): 17—20.
- Аверченков В.М., Палагин И.С. Внутривенные иммуноглобулины: механизмы действия и возможности клинического применения. *Клиническая микробиологическая и антимикробная химиотерапия.* 2004; 6(3): 273—81.
- Кудашева Э.Ю., Иванов В.Б., Борисевич И.В., Бондарев В.П., Миронов А.Н. Качество исходной плазмы — основа эффективности про-

изводства препаратов донорской крови. *Медицинская иммунология.* 2015; 17(5): 401—5.

- Государственный реестр лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
- Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журравлева М.В., Лепяхин В.К., ред. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты).* Часть 2. М.: Гриф и К; 2012.
- Общая фармакопейная статья «Иммуноглобулины человека»: утверждена приказом Министерства здравоохранения России от 21.11.2014 № 768. Режим доступа: <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/1/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/utverzhdennye-farmakopeynnye-stati-i-obshchie-farmakopeynnye-stati-po-preparatam-krovi>.
- ВОЗ. Рекомендации по эпидемиологическому надзору за энтеровирусами для поддержки программы ликвидации полиомиелита. Женева: ВОЗ; 2005.
- Корнилова О.Г., Кривых М.А., Кудашева Э.Ю., Бунатян Н.Д., Лебединская Е.В., Нечаев А.В. и др. Гармонизация требований к специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов человека с мировыми стандартами качества. *Фармация.* 2015; (2): 43—6.
- Жибурт Е.Б., Тазаев В.Н. Проблема донорских кадров: изучение и возможные пути решения. *Трансфузиология.* 2005; 6(4): 22—30.
- Алешкин В.А., Новикова Л.И., Афанасьев С.С., Борисова И.В., Зуева М.М., Зорик А.В. *Способ получения иммуноглобулинового препарата для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций, иммуноглобулиновый препарат для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций (варианты) и суппозитории на основе иммуноглобулинового препарата.* Патент РФ № 2255766; 2003.
- Кудашева Э.Ю., Исрафилов А.Г., Загидуллин Н.В., Хабибуллина В.В., Хазиев А.Ф. Разработка препарата антицитомегаловирусного иммуноглобулина для внутривенного введения. *Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение.* 2010; (3): 51—2.
- Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Новикова Л.И., Борисова И.В., Волков А.В., Зуева М.М. и др. *Иммуноглобулиновая основа для иммунобиологических препаратов и способов ее получения, суппозитории и мазь для профилактики и терапии бактериальных и вирусных заболеваний.* Патент РФ № 2361612; 2007.

REFERENCES

- Isakov V.A., Arkhipova E.I., Isakov D.V. *Human Herpesvirus infection. Guidelines for Doctors [Герпесвирусные инфекции человека. Руководство для врачей]. 2nd ed.* St. Petersburg: SpetsLit; 2013. (in Russian)
- Ljutov A.G., Aleshkin V.A., Mostovskaya E.V., Usol'tseva V.V. Domestic immunoglobulin for intravenous administration: innovative technology and application prospects. *Lechenie i profilaktika.* 2012; (3): 109—12. (in Russian)
- Dalakas M.C., Späth P.J., eds. *Intravenous Immunoglobulins in the Third Millennium.* Boca Raton, London, New York, Washington: Parthenon Publishing Group; 2004.
- Supotnitskiy M.V., Elapov A.A., Borisevich I.V., Kudasheva E.Yu., Klimov V.I., Lebedinskaya E.V. Immunoglobulins for intravenous administration in the aspect of quality, efficiency and security. *Uspekhi sovremenno ego estestvoznaniya.* 2015; (5): 182—3. (in Russian)
- Aleshkin V.A., Lyutov A.G., Afanas'ev S.S. Place immunoglobulin preparations in the treatment and rehabilitation of infectious diseases *Novye lekarstvennye preparaty.* 2003; (4): 6—10. (in Russian)
- leBlanc, Pesnicak L., Godleski M., Straus S.E. Treatment of HSV-1 infection with immunoglobulin or acyclovir: comparison of their effects on viral spread, latency, and reactivation. *Virology.* 1999; 1: 230—262.
- Ivanov V., Mosyagin V., Vdovichenko M., Kudasheva E., Bondarev V., Borisevich I. Human Immunoglobulin Normal: efficacy and safety. *Vrach.* 2015; (11): 17—20. (in Russian)
- Averchenkov V.M., Palagin I.S. Intravenous immunoglobulin: mechanism of action and clinical applications. *Klinicheskaya mikrobiologicheskaya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2004; 6(3): 273—81. (in Russian)
- Kudasheva E.Yu., Ivanov V.B., Borisevich I.V., Bondarev V.P., Mironov A.N. The quality of the original plasma — the basis of a production efficiency of donor blood products. *Meditinskaya immunologiya.* 2015; 17(5): 401—5. (in Russian)
- Concept paper on Guideline on the clinical investigation of human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg) and Core SmPC (EMA/CHMP/BPWP/572805/2013). Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/08/WC500170555.pdf.
- Bertolini J., Goss N., Curling J. *Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use.* New Jersey: John Wiley & Sons; 2013: 363—4.
- State Register of Medicinal Products of the Russian Federation Ministry of Health. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>. (in Russian)
- WHO recommendations for the production, control and regulation of hu-

- man plasma for fractionation, annex 4. WHO Technical Report, Series № 941. Geneva; 2007.
14. International Quality Plasma Program (IQPP) Available at: <http://www.pptaglobal.org/safety-quality/standards/iqpp>.
 15. Mironov A.N., Bunatyán N.D., Vasil'ev A.N., Verstakova O.L., Zhuravleva M.V., Lepakhin V.K., eds. *Guidelines for Preclinical Studies of Drugs (immunobiological drugs). Part 2 [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv (immunobiologicheskie lekarstvennye preparaty). Chast' 2]*. Moscow: Grif i K; 2012. (in Russian)
 16. General pharmacopoeial article «human immunoglobulin»: approved by the order of Russian Ministry of Health on 21 November 2014 №768. Available at: <http://www.rosmin-zdrav.ru/ministry/61/11/materialy-poduyatelnosti-departamenta/stranitsa-856/utverzhdennye-farmakopeynnye-stati-i-obschie-farmakopeynnye-stati-po-preparatam-krovi>. (in Russian)
 17. WHO Expert Committee on Biological Standardization: forty-third report. WHO Technical Report Series 840. Geneva; 1992. Available at: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_840.pdf.
 18. WHO. Guidelines for Surveillance of enteroviruses in support of polio eradication. Geneva: WHO; 2005.
 19. Kornilova O.G., Krivykh M.A., Kudasheva E.Yu., Bunatyán N.D., Lebedinskaya E.V., Nechaev A.V. et al. Harmonization of safety requirements for specific human immunoglobulin preparations with the international quality standards. *Farmatsiya*. 2015; (2): 43—6. (in Russian)
 20. Zhiburt E.B., Tazaev V.N. The problem of donor staff: study and possible solutions. *Transfuziologiya*. 2005; 6(4): 22—30. (in Russian)
 21. Aleshkin V.A., Novikova L.I., Afanas'ev S.S., Borisova I.V., Zueva M.M., Zorik A.B. *A Method of Producing Immunoglobulin Preparation for the Prophylaxis and Therapy of Viral and Bacterial Infections, the Immunoglobulin Preparation for the Prophylaxis and Therapy of Viral and Bacterial Infections (variants) and Suppositories Based on Immunoglobulin Preparation*. Patent RF № 2255766; 2003. (in Russian)
 22. Kudasheva E.Yu., Israfilov A.G., Zagidullin N.V., Khabibullina V.V., Khaziev A.F. Development of the drug antitsitomegalovirusnogo immunoglobulin for intravenous administration. *Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie*. 2010; (3): 51—2. (in Russian)
 23. Aleshkin V.A., Afanas'ev S.S., Novikova L.I., Borisova I.V., Volkov A.V., Zueva M.M. et al. *Immunoglobulin Framework for Immunobiological Preparations and Methods for its Preparation, Suppository and Ointment for the Prophylaxis and Therapy of Viral and Bacterial Diseases*. Patent RF № 2361612; 2007. (in Russian)

Поступила 19.03.16

Принята в печать 29.03.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.28.036.8

Носик Н.Н., Носик Д.Н., Чижов А.И.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВИРУЛИЦИДНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

В статье представлены результаты изучения вирулицидной активности 4 основных групп соединений, входящих в состав дезинфицирующих средств, четвертичных аммониевых соединений (ЧАС), аминов, гуанидинов, альдегидов. В работе были использованы полиовирус, вакцинный штамм Сэбина, тип 1; аденовирус, тип 5; вирус иммунодефицита человека; вирус гепатита С и вирусы гриппа А. Показано, что ЧАС, входящие в состав многих дезинфицирующих средств, не обладают достаточным потенциалом эффективной инактивации ($\geq 4,0 \text{ Ig TCID}_{50}$) безоболочечных вирусов, но эффективны в отношении оболочечных вирусов в концентрации 0,02—0,5%. Аналогичные результаты наблюдаются при использовании комбинации ЧАС с аминами. Для безусловной инактивации как оболочечных, так и безоболочечных вирусов следует применять комплексные дезинфицирующие средства, в состав которых входят ЧАС, амины и гуанидины (эффективные концентрации 0,166—0,280% для безоболочечных и 0,08—0,185% для оболочечных вирусов) или ЧАС с альдегидами (0,04—0,64% для безоболочечных вирусов).

Ключевые слова: вирулицидные дезинфицирующие средства; вирусы; полиовирус; амины; альдегиды; четвертичные аммониевые соединения; гуанидины.

Для цитирования: Носик Н.Н., Носик Д.Н., Чижов А.И. Сравнительный анализ вирулицидной эффективности дезинфицирующих средств. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(1): 41-45.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-41-45>

Nosik N.N., Nosik D.N., Chizhov A.I.

A COMPARATIVE ANALYSIS OF VIRUCIDAL EFFICIENCY OF BIOCIDES AGENTS

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

The main groups of biocide agents used for inactivation of bacteria and viruses were studied for their virucidal activity against enveloped (HIV, viral hepatitis C, influenza virus A) and non-enveloped viruses (poliovirus, adenovirus). Their efficiency was analyzed. Quarterly ammonium compounds (QAC) themselves are not able to properly inactivate non-enveloped viruses. However, they can be successfully applied in combination with other biocides (guanidines, aldehydes). Effective composition of QAC with amines and guanidines provided inactivation of viruses (4.0 IgTCID_{50}) in concentrations of 0.166-0.280% for non-enveloped viruses and 0.08-0.185% for enveloped viruses. The combination of QAC with aldehydes is especially effective (0.04-0.64% for non-enveloped viruses). The virucidal efficiency does not directly depend on the QAC concentration in the chemical disinfectants.

Для корреспонденции: Носик Николай Николаевич, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. онтогенеза вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: nosiknn@yandex.ru