

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Афанасьева Татьяна Михайловна

**ПРОТИВОСТАФИЛОКОККОВЫЙ ПРЕПАРАТ «СТАФИЛОЛЕЙКИН»:
ТЕХНОЛОГИЯ,
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Николаева А.М.

Научный консультант:

кандидат медицинских наук, доцент

Мац А.Н.

Пермь – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СТАФИЛОКОККОВАЯ ИНФЕКЦИЯ. ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Стафилококковая инфекция – насущная проблема современной медицины....	12
1.2 Ассортимент лекарственных препаратов для лечения и профилактики стафилококковой инфекции.....	15
1.3 Препараты антител в терапии стафилококковых инфекций	17
1.4 Препараты на основе низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов ..	21
1.5 Технологические аспекты получения препаратов на основе низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов	26
1.6 Плазма крови человека – сырье для получения лечебных и профилактических препаратов	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1. Материалы и оборудование	33
2.1.1. Препараты и реагенты	33
2.1.2 Оборудование	34
2.2 Методы	35
2.2.1 Физико-химические методы.....	35
2.2.2 Иммунологические и биологические методы	37
2.2.3. Статистическая обработка результатов	46
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧНЫХ ЦИТОКИНОВ ИЗ ОСАДКА Б – ОТХОДА СЕРИЙНОГО ПРОИЗВОДСТВА ПРОТИВОСТАФИЛОКОККОВОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА	47
3.1. Получение Т-клеточных антигенсвязывающих белков из осадка Б.....	48
3.2. Разработка способа выделения низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов из раствора ТАБ.....	53
3.3. Разработка состава и технологии лекарственной формы препарата	57

3.4. Обоснование методов контроля и стандартизация препарата	
«Стафилолейкин»	73
3.4. Обоснование методов контроля и стандартизация препарата	
«Стафилолейкин»	74
ГЛАВА 4. ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТА	
«СТАФИЛОЛЕЙКИН»	82
4.1. Изучение влияния препарата «Стафилолейкин» на формирование	
противостафилококкового клеточного иммунитета.	82
4.1.1. Перенос ГЗТ, регистрируемый по кожным пробам со стафилококковым	
белком А (СБА), адсорбированным на алюмо-калиевых квасцах	82
4.1.2. Изучение активности препарата с помощью переноса ГЗТ, регистрируемого	
в реакции СБА-зависимой конгломерации лейкоцитов мышей после введения	
«Стафилолейкина»	83
4.2. Изучение специфических свойств препарата «Стафилолейкин» с помощью	
иммуноферментного анализа	85
4.3. Реализация иммуносpezifической активности «Стафилолейкина» в переносе	
антистафилококковой резистентности	90
4.4. Оценка потенциала «Стафилолейкина» в терапии язвенных поражений	
роговицы стафилококковой этиологии	91
4.5. Изучение токсических свойств препарата «Стафилолейкин»	92
4.5.1. Определение острой и хронической токсичности препарата	92
4.6. Определение нежелательной миелостимулирующей активности	
«Стафилолейкина»	107
4.7. Определение провоспалительной активности «Стафилолейкина»	108
4.8. Определение пирогенных свойств «Стафилолейкина»	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	117
ПРИЛОЖЕНИЕ	134

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

TSS – синдром токсического шока

АКДС-вакцина – вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка

АРВХТ – антиретровирусная химиопрофилактика

АРСИ - антибиотикорезистентная стафилококковая инфекция

АГ – антиген

АТ – антитело

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека

ВЭН – ВИЧ-экспонированные дети

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа

ГФ – государственная фармакопея

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФТС – иммуноферментная система

ИЛ – интерлейкин

КФБ – калий-фосфатный буферный раствор

К – конъюгат

МНС- главный комплекс гистосовместимости

НАСЦ – направленные антигенспецифичные цитокины

ММ – молекулярная масса

ОП – оптическая плотность

ПМА – показатель миелостимулирующей активности

СПК – средняя пороговая концентрация

СБА - стафилококковый белок А

СПИД - синдром приобретенного иммунодефицита

ТФ – трансфер-фактор

ТАБ – Т- клеточные антигенсвязывающие белки

ФСБ-Т – фосфатный буферный раствор с твином

ФСП – фармакопейная статья предприятия

ВВЕДЕНИЕ

Staphylococcus aureus вызывает гнойно-воспалительные заболевания различной локализации от легких до генерализованных форм [5, 30, 101, 93]. В настоящее время существующие методы терапии данной инфекции зачастую себя не оправдывают. Это связано с формированием устойчивости возбудителя к антибиотикам и недостаточной эффективностью общепринятой иммунотерапии с использованием иммуноглобулиновых препаратов, которые имеют ограниченный потенциал, прежде всего, в силу низкой пенетрантности полноценных антител из сосудистого русла в ткани [41]. Кроме того, эффективный противостафилококковый иммунный ответ в большей степени основан на механизмах клеточного иммунитета, чем на функциях антител, поскольку для *S. aureus* характерно как вне-, так и внутриклеточное паразитирование [34, 18, 19, 21, 10].

Разработка лечебных и профилактических препаратов направленного действия, в частности, препарата для иммунотерапии хронической стафилококковой инфекции, входит в круг задач Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера», которая предусматривает создание новых иммунобиологических лекарственных средств для лечения инфекционных заболеваний, разработку технологии и развитие их производства.

Известно о существовании в лейкоцитарных экстрактах, плазме крови и молозиве человека низкомолекулярных полипептидов, способных переносить специфический клеточный иммунитет иммунизированного донора неиммунному реципиенту и обладающих терапевтическим потенциалом при недостаточности противоинфекционного иммунитета [15, 20, 59, 66, 95, 96]. Предполагаемую природу и функцию этих полипептидов выражает их современное название – «низкомолекулярные антигенспецифичные цитокины» (НАСЦ) [6, 113, 26, 20]

В 90-х годах XX века при лечении стафилококковой инфекции были осуществлены успешные попытки восстановления утраченного противостафилококкового клеточного иммунитета, именно препаратами НАСЦ

[99, 112, 113], которые, по-видимому, представляют собой N-концевой фрагмент (5 – 10 кДа) растворимых Т-клеточных антигенсвязывающих белков (ТАБ) [17, 15, 52, 62, 92], экстрагируемых из лимфоцитарных мембран и иммунной плазмы человека [17, 18, 107]. В Чехии (Sevapharma Ltd) был приготовлен и с успехом применялся в клиниках «антистафилококковый иммодин» из лимфоцитов доноров с высокими титрами антител к антигенам штаммов *S. aureus* [6, 109, 12]. Аналогичный иммунотерапевтический препарат стафилококковой специфичности разрабатывался в начале двухтысячных годов в Universidad Autónoma de Nuevo León (Мексика). Мексиканский препарат из спленоцитов коров не только индуцирует противостафилококковый клеточный иммунитет у пациентов, но и обладает специфическими бактериостатическими и бактерицидными свойствами [82].

В исследованиях, проведенных Мацем А.Н. с соавторами, было установлено, что Т-клеточные антигенсвязывающие белки, выделенные из фракции α -глобулинов плазмы крови доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином, могут служить источником приготовления специфических иммунотерапевтических лекарственных средств типа разработанного ранее полиспецифичного трансфер-факторного препарата «Аффинолейкин» [17, 19].

В настоящее время на фармацевтическом рынке существует пять фармакопейных препаратов НАСЦ с доказанной иммунотерапевтической эффективностью: это «Immodin» (Чехия), «Leukonorm» (Германия), «Hebertrans» (Куба), «Transferon» (Мексика), «Аффинолейкин» (Россия). Высокая эффективность «Аффинолейкина» показана в контролируемых клинических испытаниях, в которых участвовало более 400 больных, включая новорождённых детей. Использование препарата в комбинированной фармакотерапии неонатальных пневмоний [13, 14, 12] рецидивирующего бронхита у детей [8, 9], урогенитального хламидиоза [32], хронического гнойного отита [25] и туберкулёза лёгких [1] существенно повысило её эффективность. Получено клиничко-лабораторное подтверждение, что в основе лечебного действия «Аффинолейкина» лежит восстановление клеточного иммунитета к

микобактериям туберкулёза, вирусам герпеса, возбудителю стафилококковой инфекции и дрожжеподобным грибам [1, 2, 5, 13, 14, 17, 18, 24].

Производство всех коммерческих препаратов НАСЦ однотипно и начинается со взятия крови у доноров нормальной плазмы. Из крови выделяют лейкоциты, их разрушают, готовят экстракт, из которого, используя методы мембранной технологии, получают компоненты с молекулярной массой менее 10 кД.

Так как указанные низкомолекулярные антигенспецифичные цитокины содержатся и в плазме крови [18, 96, 129, 202, 146], представлялось целесообразным разработать технологию их выделения непосредственно из плазмы доноров, предварительно вакцинированных против стафилококковой инфекции. При производстве иммуноглобулинов по Кону (дифференциальное этаноловое осаждение при минусовой температуре) антигенспецифичные цитокины и их предшественники содержатся во фракции, обозначаемой как «осадок Б» - отход производства донорского иммуноглобулина.

Актуальность темы.

Острая и хроническая инфекционная патология, вызванная резистентными к антибиотикам и химиопрепаратам штаммами золотистого стафилококка – это серьезная проблема медицины.

Разработка лечебных и профилактических препаратов направленного действия на основе антигенсвязывающих фрагментов растворимых Т-клеточных иммунопротеинов, в частности препарата для иммунотерапии хронической стафилококковой инфекции, входит в круг задач Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера», которая в общей форме предусматривает создание новых иммунобиологических лекарственных средств для лечения инфекционных заболеваний, разработку технологии и развитие их производства.

Отсутствие антистафилококковых вакцин и недостаточная эффективность иммуноглобулиновых препаратов из-за ограниченного проникновения экзогенных антител в ткани и очаги стафилококковой инфекции могли бы сделать

препараты антистафилококковых цитокинов лекарственным средством рационального выбора

Степень научной разработанности темы

Проблеме разработки трансфер-факторных препаратов на основе низкомолекулярных полипептидов посвящены работы таких авторов, как А.Н. Мац, W. Borkowsky, D.C. Dumonde, C.H. Kirkpatrick, H.S. Lawrence.

Работы А.Н. Маца и соавторов (Н.П. Перепечкина, Л.И. Райхер, И.И. Райхер) по созданию полиспецифичного препарата «Аффинолейкин» с использованием в качестве сырья лейкоцитов человека в значительной мере способствовали проведению исследования по разработке противостафилококкового препарата на основе антигенспецифичных цитокинов «Стафилолейкин» из нового источника сырья – отхода производства иммуноглобулина человека антистафилококкового – осадка Б.

Цель исследования

Разработка технологии получения нового антистафилококкового препарата на основе направленных антигенспецифичных цитокинов из отхода производства антистафилококкового иммуноглобулина.

Задачи исследования:

1. Разработать способ получения низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов из осадка Б - отхода производства противостафилококкового иммуноглобулина.
2. Разработать состав и технологию лекарственной формы Стафилолейкина.
3. Определить нормы качества и провести стандартизацию лекарственной формы препарата «Стафилолейкин». Разработать пакет нормативных документов (лабораторный регламент, проект ФСП).
4. Провести доклинические исследования препарата по изучению специфической активности и специфической безопасности препарата.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили труды как отечественных, так и зарубежных ученых по разработке препаратов на основе низкомолекулярных полипептидов, обладающих терапевтическим потенциалом. В исследовательской работе были использованы аналитические и статистические методы анализа. В зависимости от поставленных целей и задач данные методы применялись на разных этапах исследования.

Научная новизна

Впервые из осадка Б – отхода производства антистафилококкового иммуноглобулина, выделены иммунопептиды с молекулярной массой 5-8 кДа, представляющие собой фрагменты растворимых антигенсвязывающих белков Т-клеточного происхождения, которые можно отнести к серологическим коррелятам протективного антистафилококкового иммунитета.

Впервые показано, что «Стафилолейкин» индуцирует специфический клеточный иммунитет, защищает мышей от подострого менингоэнцефалита, способствует излечению стафилококкового кератита у кроликов.

Впервые установлено, что цитокиновый препарат «Стафилолейкин» обладает способностью повышать функциональную аффинность гомологичных антител.

Практическая значимость работы и внедрение материалов исследования

- Разработана экспериментально-производственная технология получения препарата «Стафилолейкин» из осадка Б, являющегося отходом производства антистафилококкового иммуноглобулина. Технология является универсальной и может быть использована для получения цитокинов различной направленности из отходов производства других специфических иммуноглобулинов человека (против гепатита В, против клещевого энцефалита и др.).

- Разработаны проекты нормативно-технической документации на производство нового антистафилококкового препарата на основе антигенспецифичных цитокинов: проекты Фармакопейной статьи, Экспериментально-производственного регламента.

- Разработанная технология апробирована в цехе иммуноглобулинов в филиале ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» (акт внедрения от 18.02.2015).

- Изготовлены 4 экспериментально-производственные серии противостафилококкового препарата на основе антигенспецифичных цитокинов.

Личное участие автора в получении научных результатов

Автор лично участвовала в планировании и проведении экспериментов, разработке технологии получения препарата, интерпретации результатов исследований, подготовке научных публикаций.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 3 статьи в изданиях из Перечня ВАК РФ.

Исследования выполнены в соответствии с планом научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, номер государственной регистрации 01.9.50 007426.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Технология получения препарата на основе антигенспецифичных цитокинов из отхода производства антистафилококкового иммуноглобулина – осадка Б.

- Методы контроля и стандартизация препарата «Стафилолейкин».

- «Стафилолейкин» не обладает токсичностью, индуцирует специфический клеточный иммунитет, защищает мышей от подострого стафилококкового менингоэнцефалита, способствует излечению стафилококкового кератита у кроликов, обладает способностью повышать функциональную аффинность гомологичных антител.

Степень достоверности и апробация работы

Научные положения, выводы базируются на достаточном количестве экспериментальных исследований, использованы современные методы анализа, исследования подтверждаются большим табличным материалом. Статистическую обработку результатов проводили согласно требованиям ГФ XI с помощью программы таблицы Excel для Windows (Microsoft) и AtteStat и компьютерной программы «Паралайн»,

Результаты проведенных исследований были доложены и обсуждены на научно-практической конференции ПГФА (г. Пермь, 2010); Международной конференции: «Биология – наука XXI века» (г. Москва 2012); конференции молодых ученых НИИВС им. И.И. Мечникова Российской академии медицинских наук (г. Москва 2013); на заседании Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (г. Пермь, 2016).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы, 17 рисунков; включает введение, обзор литературы (глава 1), экспериментальную часть (главы 2, 3, 4), список цитируемой литературы, содержащий 155 библиографических источника, из которых 120 на иностранных языках, приложение.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Исследование, представленное в диссертационной работе, соответствует паспорту научной специальности 14.04.01 – технология получения лекарств, конкретно пункту 3- «Разработка технологий получения субстанций и готовых лекарственных форм» и пункту 6 – «Исследование биофармацевтических аспектов в технологии получения лекарственных средств, их дизайн и изучение факторов, влияющих на их биодоступность».

ГЛАВА 1. СТАФИЛОКОККОВАЯ ИНФЕКЦИЯ. ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Стафилококковая инфекция – насущная проблема современной медицины

Антибиотикорезистентная стафилококковая инфекция (АРСИ) осложняет лечение больных в дерматологии, неонатологии, пневмологии, оториноларингологии и хирургии. Однако в настоящее время АРСИ в качестве причины смерти регистрируется не чаще 7,5 на 100 тысяч населения [71, 72, 84, 85, 116, 128, 132, 140,]. Стафилококковая инфекция, как типичная условнопатогенная, характеризуется многообразием клинических проявлений, как по тяжести, так и по локализации очагов. Здоровое носительство, встречающееся у 50 – 70% людей, сменяется распространённой колонизацией и внутриклеточной инфекцией с интоксикацией и бактериемией [111, 144, 120, 147]. До начала использования противомикробных препаратов смертность от заболеваний, вызванных золотистым стафилококком, составляла около 90%. Значительное снижение заболеваемости было достигнуто в результате антибиотикотерапии. Но после первоначального ее успешного применения последовало появление антибиотикоустойчивых штаммов, что снизило эффективность лечения [98, 36, 61, 69, 46, 54]. Частота госпитальных и внебольничных стафилококковых инфекций, в том числе пневмоний, неуклонно растёт, с небольшими изменениями общей смертности [70, 56, 57, 104, 106].

Большинство стафилококковых поражений человека вызвано коагулазопродуцирующими штаммами *S. aureus* [121, 138, 155, 50]. Эпидермальный стафилококк (*S. epidermidis*) и другие стафилококки, неспособные вырабатывать вышеупомянутый фермент, выделяют слизь, которая препятствует фагоцитозу. Инфицирование золотистым стафилококком может быть эндогенным, то есть, возбудитель принадлежит к резидентной микрофлоре пациента, и экзогенным, когда заражение происходит в условиях стационара

среди больных с нарушенными межтканевыми барьерами и недостаточностью функций иммунной системы [78].

Чаще всего прогрессирующая стафилококковая инфекция поражает больных сахарным диабетом 1 типа, наркоманов, употребляющих внутривенные препараты, больных, находящихся на гемодиализе или перенесших хирургическое вмешательство, больных СПИДом, новорожденных с низкой массой тела, недоношенных младенцев, а также людей с различными нарушениями функций лейкоцитов. Золотистый стафилококк может быть причиной эндокардита, тромбоза, тромбоза, инфекций дыхательных путей [134, 60, 101, 94, 75, 78]. В настоящее время часто диагностируют стафилококковую пневмонию, которая была широко распространена в 50-х годах. Она чаще всего встречается у младенцев, детей младшего возраста и при истощении. Это быстро прогрессирующее заболевание с летальностью до 50% [149, 72, 122, 145]. К тяжелым, резистентным к терапии заболеваниям, относятся остеомиелит и септический артрит [28, 48, 38]. Высокую летальность имеет синдром токсического шока (TSS), впервые описанному у детей. Позднее выяснилось, что он также встречается и у взрослых. Наибольшую роль в развитии TSS играют энтеротоксин А и В, α -токсин и лейкоцидин Пантон-Валентайн, способствующие повреждению тканей [143, 49].

По некоторым данным, как следствие внутрибольничной инфекции, часто развиваются стафилококковые миозит и пиомиозит (глубокие абсцессы мышечных тканей) [55, 89, 90, 58, 129]. После операционного вмешательства могут возникать стафилококковые абсцессы печени, селезенки, почек, околоушной железы [151], возможно также серьезное поражение центральной нервной системы [37].

Степень тяжести стафилококковых заболеваний определяется вирулентностью возбудителя. Вирулентность золотистого стафилококка обусловлена сочетанием множества факторов патогенности, в том числе поверхностно-ассоциированными белками-адгезинами: фибриногеном (факторы слипания А и В) и фибронектином, позволяющими бактериям удерживаться на эукариотических клеточных мембранах; капсульными полисахаридами, защищающими бактерии от фагоцитоза;

экзотоксинами, в частности, гемолизином. Стафилококки способны вырабатывать ряд ферментов, таких как протеазы, липазы и гиалуронидазы, которые разрушают ткани в очагах инфекции и способствуют ее распространению на соседние участки [136, 107].

Кроме того, стафилококки имеют множество механизмов, направленных на защиту бактерий от иммунной системы макроорганизма. К ним относятся антиопсонистическая наружная капсула, защищающая бактерию от фагоцитоза и системы комплемента. Ряд ферментов стафилококков, таких как супероксиддисмутаза, способствующих выживанию бактерий в фагосоме нейтрофилов, гиалуронидазы и стафилокиназы, повреждающие ткани, обеспечивают выживание и распространение бактерий в макроорганизме [103, 133].

Было проведено много исследований по изучению факторов, способствующих переходу стафилококков от безвредных синантропных микроорганизмов к опасным для жизни инфекционным агентам. Отмечено, что люди, являющиеся бессимптомными носителями стафилококков, подвергаются более высокому риску заражения этими микроорганизмами, включая и штаммы носителя. В большинстве случаев инфицирование золотистым стафилококком происходит после нарушения кожных или слизистых барьеров, далее инфекция распространяется через кровь, вызывая бактериемии [72, 80].

Золотистый стафилококк, так же как и эпидермальный, часто загрязняет медицинское оборудование: внутривенные катетеры, эндопротезы, в том числе протезы клапанов сердца, кардиостимуляторы и другое, образуя на их поверхности биопленки [119, 87]. Характерная особенность биопленок – это внеклеточный матрикс, состоящий из полисахаридов межклеточной адгезии [142]. Способность стафилококков образовывать биопленки увеличивает их устойчивость к воздействию дезинфицирующих растворов и повышенных температур. Её можно также считать фактором вирулентности, способствующим распространению инфекции [74, 43]. Биопленки могут формироваться в межклеточном пространстве тканей макроорганизма. В этом процессе участвуют рецепторы бактериальной поверхности – адгезины, включающие коллагенсвязывающий белок (CNA), а также факторы слипания А (ClfA) и В

(ClfB) [47, 88]. Образованные стафилококками биопленки повышают их устойчивость к антибиотикам и к воздействию защитных сил макроорганизма [39] за счет замедления скорости диффузии антистафилококковых факторов. С формированием биопленок связано 65% нозокомиальных инфекций, таких как эндокардит, отит, остеомиелит [119].

Стафилококковая инфекция во всех формах своего проявления – это предмет исследования клиницистов, микробиологов, эпидемиологов, иммунологов и генетиков. Высокой лекарственной устойчивостью, прежде всего к антибиотикам, объясняются значительные трудности в лечении стафилококковых заболеваний. Устойчивость к антибиотикам у стафилококка носит, как правило, множественный характер, и ее распространение в бактериальной популяции происходит путем передачи плазмид, происходящей с высокой частотой [84, 83, 42, 104]. Традиционное лечение антибиотиками в ряде случаев может не только не приносить ожидаемых результатов, но и отягощать течение болезни, усугубляя состояние иммунодефицита [90, 150, 47].

Широким распространением возбудителей стафилококковых инфекций, разнообразием вызываемой ими клинической патологии и циркуляцией антибиотикоустойчивых штаммов обусловлена многолетняя актуальность создания новых препаратов для эффективного антистафилококкового лечения.

1.2 Ассортимент лекарственных препаратов для лечения и профилактики стафилококковой инфекции

Вакцинопрофилактика условно патогенных инфекций, в частности стафилококковой, - это до сих пор нерешённая проблема, несмотря на почти столетнюю историю [109, 112, 113, 72, 124, 143]. Все имеющиеся на современном фармацевтическом рынке вакцины, содержащие антигены стафилококка, применяются преимущественно в России и являются не профилактическими, а лечебными. Дело в том, что инфицирование большинства населения стафилококками происходит в первые недели жизни, возбудитель заселяет кожу и слизистые, иницирует иммунологическую память, но ведёт себя чаще всего как комменсал [125, 135, 139]. Введение любой вакцины после инфицирования – это

приём вакцинотерапии, а не вакцинопрофилактики, главной задачей которой является создание иммунологической памяти [40, 44, 62, 143, 125]. Иммунологическая память к стафилококку, как к условно патогенному возбудителю, у подавляющего большинства детского и взрослого населения уже имеется, и создавать её нет нужды, да и стафилококковые антигены постоянно присутствуют в организме в избытке [132, 65, 81]. Принципы, лежащие в основе вакцинопрофилактики и вакцинотерапии, глубоко различны. Кроме того, эффективность вакцинотерапии, как правило, не достигает 50%, тогда как для вакцинопрофилактики, по современным представлениям, она должна превышать 70% [62, 73, 77, 79, 61]. Низкая эффективность терапевтических стафилококковых вакцин не позволяет решать с их помощью проблему внутри- и внебольничной стафилококковой инфекции [100].

В российской медицинской практике в настоящее время используется шесть иммунобиологических препаратов, предназначенных для терапии, но не для профилактики стафилококковой инфекции, однако, ни для одного из них не установлена клиническая эффективность в соответствии с принципами доказательной медицины:

1. Анатоксин стафилококковый очищенный жидкий лечебный производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (Москва);
2. Вакцина стафилококковая лечебная (Антифагин стафилококковый) производства ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова представляет собой комплекс стафилококковых пептидогликанов и тейхоевых кислот;
3. «Рузам» – экстракт культуры *Staphylococcus aureus*, штамм С-2, производства ООО «Рузам-М» (Москва);
4. Назальный спрей ИРС-19 – бактериальный лизат, содержащий компоненты золотистого стафилококка, производства Solvay Pharma (Франция);
5. «Имудон» - бактериальный лизат, содержащий компоненты золотистого стафилококка, в виде таблеток для рассасывания, производства Фармстандарт – Томскхимфарм;

6. Бронхо-Мунал – бактериальный лизат, содержащий компоненты золотистого стафилококка, в капсулах для приёма внутрь; производитель LEK d.d., (Словения).

Разрекламированные в России в 90-х годах два новых иммунобиологических препарата, содержащие антигены золотистого стафилококка, «Иммуновак-ВП-4» и «Стафило-протейно-синегнойная вакцина» в настоящее время не производятся, то есть, в медицинской практике отсутствуют.

Таким образом, на основании приведенных данных можно заключить, что препараты, предназначенные для активной иммунизации, не были достаточно эффективны в отношении стафилококковой инфекции [108, 122, 126, 152, 139]. Кроме этого, в настоящее время разработаны и широко используются иммуноглобулиновые препараты для быстрого создания пассивного иммунитета, что особенно важно при лечении тяжелых заболеваний стафилококковой этиологии.

1.3 Препараты антител в терапии стафилококковых инфекций

Опыт использования антител в составе лечебных препаратов для профилактики и лечения целого ряда заболеваний насчитывает более чем столетнюю историю. Лечебный эффект препаратов иммуноглобулинов основан на распознавании и связывании чужеродных антигенов различного происхождения. Реакция антиген-антитело приводит к образованию крупных агрегатов, блокируя тем самым адгезию патогенов на мембранах чувствительных клеток и способствуя поглощению их фагоцитами. Иммуноглобулины обладают опсонизирующей активностью и обеспечивают реализацию реакции антителозависимой клеточно опосредованной цитотоксичности. Традиционно выпускаются две формы иммуноглобулиновых препаратов: для внутривенного и для внутримышечного введения. Основное их различие заключается в степени очистки и сохранности структуры молекул [64, 105].

Для лечения наиболее тяжелых заболеваний стафилококковой этиологии (сепсис, септический эндокардит) больным со значительным снижением специфической и неспецифической резистентности показаны антистафилококковая

гипериммунная плазма и антистафилококковый иммуноглобулин, введение которых обеспечивает быстрое создание пассивного иммунитета [41]. При получении антистафилококкового иммуноглобулина в отечественном производстве используют плазму доноров, иммунизированных адсорбированным очищенным стафилококковым анатоксином. За рубежом были предприняты попытки получения иммуноглобулинового препарата из гипериммунных сывороток, полученных от здоровых добровольцев, иммунизированных вакциной StaphVAX – AltaStaph ®. Приготовленный из этого сырья иммуноглобулиновый препарат вводили новорожденным детям, имеющим низкий вес. Темпы бактериемии золотистым стафилококком не были статистически значимыми в 2-х сравниваемых группах детей, которым вводили соответственно испытуемый препарат и плацебо [35, 79].

В последние годы с использованием технологии моноклональных антител были разработаны специфические антительные препараты, направленные на различные антигены золотистого стафилококка [115, 112]. К таким препаратам относятся Altastaph (антитела против капсульных полисахаридов типов 5 и 8), BSYX-A110 (моноклональные антитела против липотейхоевой кислоты), Veronate или INH-A21 (антитела против «компонентов микробной поверхности, распознающих адгезивный матрикс молекул» [MSCRAMMS]) и Aurexis (моноклональные антитела против фактора слипания А (ClfA)) [115, 105].

Доклинические испытания препарата Veronate показали, что при профилактическом и терапевтическом его применении происходит увеличение фагоцитарной активности [153]. При проведении клинических исследований этого препарата отмечено нарастание титра антител.

Попытки использовать препараты на основе антител для профилактики и лечения стафилококковых заболеваний были описаны в работах многих авторов [142, 43, 86].

Как известно, 20-25% случаев заражения внутрибольничными инфекциями, вызванными стафилококками, составляют новорожденные с очень низкой массой тела [99, 131]. Это связано с функциональной недостаточностью Т-лимфоцитов и

с несформировавшейся еще иммунной системой [80, 130]. Были предприняты попытки повышения уровня антител в крови новорожденных препаратами антител INH-21 [53] и Altastaph [35, 153].

Следует отметить, что эти препараты могут вызывать аллергические реакции, иметь ряд побочных эффектов, связанных с большим объемом инфузий [124]. Кроме того, для недоношенных новорожденных и младенцев с очень низкой массой тела при рождении данные препараты не могут быть эффективными из-за незрелости лейкоцитов и недостаточности системы комплемента [124, 43].

В исследованиях Itoh S, Hamada E. показано, что попытки предотвратить или лечить заболевания, вызванные стафилококками, при помощи антител не всегда могут быть успешными [43, 144].

Колонизация кожи, слизистых оболочек носа, а также незначительные клинические инфекции вызывают выраженный иммунный ответ у постоянных носителей стафилококков, но количество выработанных антител не является достаточным для элиминации стафилококков [144].

Известно, что у здоровых людей циркулирует до 19 видов иммуноглобулинов, направленных против различных антигенов золотистого стафилококка. Причем уровень IgG и уровень IgA, имеющих антистафилококковую направленность, выше у постоянных носителей, чем у людей, встречающихся с данным патогеном периодически [120]. Тем не менее, эти антитела не могут обеспечить полной элиминации золотистого стафилококка на слизистых носа постоянных носителей, даже если эти антитела обладают нейтрализующей способностью в отношении антигенов *S. aureus* [110, 131]. Также было показано, что антитела, полученные новорожденными от матери, не защищают младенцев от колонизации стафилококком слизистых носа [86].

По данным литературы можно сделать вывод о том, что даже высокое содержание антител в крови к золотистому стафилококку не гарантирует защиту от инфекции. В исследованиях Verkaik NJ было установлено, что у четырнадцати пациентов из тысячи, имеющих в крови антитела к золотистому стафилококку, после плановой операции развилась бактериемия [86]. Несмотря на значительные

уровни стафилококковых антител в организме человека, восприимчивость к инфекции *S. aureus* сохраняется [131].

Таким образом, использование иммуноглобулиновых препаратов, приготовленных из донорского сырья, и препаратов на основе моноклональных антител недостаточно для эффективного лечения стафилококковых заболеваний.

Тем не менее, для снижения уровня токсинов применение препаратов стафилококковых антител просто необходимо.

В исследованиях, проведенных в 2008 – 2010 годах Bubeck Wardenburg, Schneewind, Ким и др., было показано, что терапия антительными препаратами обеспечивает защиту от различных антигенов золотистого стафилококка, но не обеспечивает защиту против инфекции. С другой стороны, показано, что наличие механизмов антителоопосредованной защиты является потенциально важным при стафилококковой инфекции.

Ограниченный потенциал традиционной иммунотерапии внутривенным антистафилококковым иммуноглобулином объясняется низкой пенетрантностью полномерных антител (мол. масса > 160 кДа) из сосудистого русла в ткани. Кроме того, следует отметить, что эффективный противостафилококковый иммунный ответ в большей степени основан на механизмах клеточного иммунитета, чем на функциях антител, поскольку для золотистого стафилококка характерно как вне-, так и внутриклеточное паразитирование [74, 72]. Также высокому риску подвержены люди с пониженной функцией хемотаксиса, количественными и качественными нарушениями функций Т-клеток, расстройствами функций или дефектами нейтрофилов, таких как нейтропения и хроническая гранулематозная болезнь [73, 64].

Важность клеточного иммунитета в борьбе с золотистым стафилококком была показана Spellberg соавт. (2008) на животных. Мыши с дефицитом В-клеток не были более восприимчивы к инфекции, вызванной золотистым стафилококком, чем мыши дикого типа, в то время как мыши с дефицитом Т-клеток, IFN- γ -, TNF-дефицитные оказались гиперчувствительными к инфицированию. Супероксид-

дефицитные мыши (модель хронического гранулематозного заболевания) были также более восприимчивы к инфекции.

В целом, эти данные свидетельствуют о том, что для борьбы с заболеваниями стафилококковой этиологии необходима разработка новых эффективных и безопасных препаратов, способных создавать пассивный специфический клеточный иммунитет. Судя по отдельным наблюдениям, при атопической экземе с пиогенизацией, хроническом тонзиллите, отите, стафилококковом сепсисе и пневмонии более успешную иммунотерапию антибиотикорезистентной стафилококковой инфекции можно осуществить препаратами низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов, называемых также антигенспецифичными иммунопептидами [19, 21].

Разработка таких препаратов оказалась сложной задачей, прежде всего, из-за неопределенности в вопросе о том, что является гуморальным фактором клеточного иммунитета.

1.4 Препараты на основе низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов

В 1949 году ученый Нью-Йоркского института туберкулеза д-р Шервуд Лоуренс (Sherwood Lowrence) сделал важное открытие. Он экстрагировал внутриклеточную жидкость лейкоцитов у пациентов, которые болели туберкулезом. Затем полученный экстракт был введен здоровым пациентам. Используя тест на иммунный ответ, известный как ГЗТ, он показал, что иммунная система пациентов, не встречавшихся с данным патогенным агентом, распознает его, как ранее известный: иммунитет к туберкулезу передался от одного человека к другому через лейкоцитарный экстракт. Лоуренс назвал такую субстанцию, содержащуюся в лейкоцитах, которая «передает иммунитет» от одного пациента другому, «Трансферфактор» (ТФ) [66, 67, 91, 148].

Практически до 1981 года вопрос о действующем начале препаратов ТФ не был решен.

В 1981-1983 годах в лаборатории Лоуренса было показано, что трансферфакторные пептиды (индукторные ТФ) аффинно связываются с

гомологичными антигенами и антителами (супрессорные ТФ). Тогда же было установлено, что для переноса иммунореактивности препаратами ТФ не существует видового барьера. Спустя 10 лет с помощью аффинной сорбции были выделены и охарактеризованы четыре ТФ-пептида: мышинный специфический к овалбумину, мышинный специфический к трансферрину лошади, мышинный и козий специфический к антигенам простого герпеса. В результате было установлено, что ТФ, подобно антителам, составляют обширную группу белков (пептидов) с молекулярной массой 5-8 кДа, способных специфически связываться с гомологичными антигенами [123, 91, 21].

Считается, что ТФ синтезируются Т-хелперами, которые координируют защитную деятельность иммунной системы. После попадания в организм реципиента ТФ влияют на активность иммунной системы по нескольким направлениям. Их присутствие распознается другими иммунными клетками как сигнал того, что включился иммунный ответ, опосредованный Th-1, кроме того, ТФ связываются со специфическими антигенами подобно антителам. При введении ТФ вызывается антигенспецифичный Т-хелперный ответ. Т-хелперы благодаря антигенспецифическим ТФ направляют иммунный ответ против конкретного антигена. Связываясь с антигеном на поверхности инфицированных клеток, ТФ маркируют их для уничтожения цитотоксическими Т-лимфоцитами [21, 3, 6].

Достаточно много публикаций о клинической эффективности препаратов ТФ при терапии хронических инфекций и аллергических заболеваний с дисбалансом иммунологической реактивности и при недостаточности клеточного иммунитета [8, 118, 18, 2, 24, 17]. Эффективность препаратов ТФ подтверждается в контролируемых клинических испытаниях при генерализованном кандидомикозе, атипичных микобактериозах легких [8, 9], туберкулезе, лепроматозной проказе и др. [3, 25].

Их преимущества перед иммуноглобулиновыми препаратами заключаются в следующем:

- малая молекулярная масса (менее 15 кДа) способствует быстрому проникновению из кровотока в ткани (даже забарьерные) и в места, недоступные антителам;

- независимость от межвидовых барьеров (возможность использования гетерологичного сырья).

В то же время препараты ТФ в сравнении с иммуноглобулинами обладают существенно меньшей эффекторной активностью, которая реализуется опосредованно через клетки иммунной системы реципиента и зависит от степени акцепции ТФ этими клетками [96, 68, 23].

ТФ выделяют непосредственно из разрушенных лейкоцитов человека или животных, сенсibilизированных различными антигенами. В 80-х годах прошлого столетия для увеличения содержания ТФ применяли сенсibilизацию лимфоцитов фитогемагглютинином. Лейкоциты выделяли из крови, селезенки, лимфоузлов, перитонетальных экссудатов [25, 30, 138].

Биофармацевтические препараты, получаемые из диализатов или ультрафильтратов лейкоцитарных, или лимфоцитарных экстрактов, в настоящее время сгруппированы под рубрикой антимикробных иммуномодуляторов [123, 114].

Коммерческие названия препаратов различны и отражают быстро меняющиеся представления об активном начале, которым в настоящее время считают комплекс продуцируемых Т-клетками растворимых антигенспецифичных белков с молекулярной массой около 5 кДа, способных аффинно связываться с гомологичными антигенами [96, 23, 67]. По традиции этот комплекс белков продолжают называть «трансфер-фактором». Современное название - «низкомолекулярные антигенспецифичные цитокины» - отражает предполагаемую природу и функцию этих иммунопептидов.

Производство препаратов «низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов» требует значительных количеств исходного сырья. Например, доза в 1 единицу имеет клеточный эквивалент $5 \cdot 10^8$ лейкоцитов, такое количество лейкоцитов без учета потерь можно получить из 200 мл крови, для приготовления

малой серии препарата в 1000 ампул требуется 200 л крови. Этот источник сырья становится экономически доступным только в том случае, если лейкоцитарная масса представляет собой неиспользуемый отход другого производства, например, лейкоциты человека после получения интерферона, лейкоциты лошадей – продуцентов антитоксических сывороток [66, 113].

В настоящее время на фармацевтическом рынке существует четыре фармакопейных препарата с доказанной иммунотерапевтической эффективностью. Это – «Аффинолейкин» (Россия) [1, 2, 3], «Leukonorm» (Германия) [150], «Hebertrans» (Куба) и «Transferyn» (Мексика).

Производство всех четырех аналогов однотипно и начинается с взятия крови у здоровых (неиммунизированных предварительно) доноров. Из крови выделяют лейкоциты, их разрушают, готовят экстракт, из которого диализом или ультрафильтрацией получают компоненты с молекулярной массой менее 10 кДа.

Приготовленный по оригинальной технологии итало-французский препарат ТФ был назван «ВИЧ-специфичным», поскольку его получали из CD8+Т-спленоцитов мышей BALB/c, иммунизированных ВИЧ, реплицировали в перевиваемой культуре лимфоидных клеток человека и инкапсулировали для энтерального введения. Назначение ВИЧ-специфичного ТФ на II – IV стадии ВИЧ-инфекции одновременно с АРВХТ через полгода вызывало улучшение у 80% пациентов, а у 86% восстанавливало утраченную ГЗТ на антигены иммунологической памяти – туберкулин-PPD, кандидин, столбнячный и дифтерийный анатоксины – увеличивало число CD8+Т-клеток и содержание IL-12 в крови, вызывало падение вирусной нагрузки и продление срока жизни [88].

Диализат лимфоцитарного экстракта коров, иммунизированных *Cryptosporidium parvum*, улучшал клинические (купирование диареи) и микробиологические (выделение ооцист) показатели у больных СПИДом с криптоспоридиозом [63, 76].

Аналогичный иммунотерапевтический препарат стафилококковой специфичности разрабатывается в настоящее время в UniversidadAutynomadeNuevoLeyn (Мексика). Мексиканский препарат из

спленоцитов коров не только индуцирует противостафилококковый клеточный иммунитет у пациентов, но и обладает специфическими бактериостатическими и бактерицидными свойствами [19, 20].

Для больных атопическим дерматитом характерна колонизация кожи золотистым стафилококком в высокой степени плотности. Для лечения атопического дерматита применялся японский трансфер-факторный препарат RCTF-1-L, в результате было получено выраженное клиническое улучшение [51, 52]. Данный способ лечения был выбран в качестве прототипа лечения Аффинолейкином, отечественным препаратом, получаемым из не утилизируемого отхода производства препарата интерферона – лейкоцитов нормальной плазмы. Исследования показали высокую эффективность применения отечественного препарата в лечении атопического дерматита [24, 18, 13].

Также были проведены исследования, в которых Аффинолейкин применялся для лечения неонатальных пневмоний. Острая пневмония у новорожденных это следствие пре-, интра- и перинатального инфицирования лёгочной паренхимы патогенными, но чаще, условнопатогенными микробами: вирусами цитомегалии и простого герпеса, респираторно-синцитиальными и аденовирусами, энтеровирусами (полио-, Коксаки, ЕСНО) и коронавирусами, стрептококками группы В, D и анаэробными пептострептококками, хламидиями, золотистыми и эпидермальными стафилококками, пневмококками, кишечными и гемофильными бактериями, порфирио- и псевдомонадами, моракселлами и клебсиеллами, токсо-, уреа- и микоплазмами, серрациями, легионеллами, протеем, листериями и грибами. Нередко пневмонию вызывает смешанная вирус-бактериальная (например, вирус-хламидийная) инфекция. Постнатальные пневмонии обусловлены либо латентной внутриутробной, либо госпитальной инфекцией вследствие искусственной вентиляции лёгких или катетеризации сосудов. Был показан достоверный положительный результат [14, 16].

Были проведены исследования, в которых «Аффинолейкин» применялся для компенсации дефицита иммунизабельности ВИЧ-экспонированных детей.

Полученные данные показали, что «Аффинолейкин» как иммунокорректор при АКДС-вакцинации ВИЧ/АРВХП-экспонированных детей восстанавливает нарушенную иммунореактивность и иммунологическую память:

- возвращает к гомеостатической норме содержание в крови CD4+T- и $\gamma\delta$ T-клеток, а также соотношение CD4/CD8;
- приближает к норме IgG1, 2, 3 и 4-ответ на дифтерийный анатоксин;
- адьювантирует образование антител к столбнячному анатоксину;
- частично восстанавливает сниженный гуморальный ответ на коклюшный компонент АКДС-вакцины.

Применение «Аффинолейкина» при АКДС-иммунизации ВЭН детей не только не вызывает нежелательных клинических проявлений в поствакцинальном периоде, но и нивелирует гемо- и гепатотоксические эффекты антиретровирусной химиопрофилактики, в частности, корригирует снижение содержания нейтрофилов и стимулирует эритропоэз [96].

Таким образом, представленные данные демонстрируют успешное применение ТФ препаратов для лечения целого ряда инфекционных заболеваний, оказывая корректирующее влияние на состояние иммунной системы.

1.5 Технологические аспекты получения препаратов на основе низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов

Препаратам на основе низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов свойственна иммуносцифическая (антигенспецифическая) и фармакологическая (неспецифическая, иммунорегуляторная) активность (таб. 1). Их терапевтический потенциал обусловлен, в основном, иммуносцифической активностью, носителями которой служат индуцибельные белки Т-клеточного происхождения с молекулярной массой 5-8 кДа, связывающиеся аффино с гомологичным антигеном и способные при введении несенсибилизированному реципиенту индуцировать гиперчувствительность замедленного типа. Все коммерческие препараты на основе низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов представляют собой, в основном, балластные белки, в которых активный фактор переноса представлен ничтожными количествами [17, 31, 29].

Низкомолекулярные антигенспецифичные цитокины обеспечивают иммуноспецифическую активность, а балластные компоненты – фармакологическую. В отличие от иммуноспецифической, фармакологическая активность препаратов на основе низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов обусловлена многочисленными низкомолекулярными примесями, которые оказывают неспецифическое противовоспалительное, прокоагулянтное, миелостимулирующее, антифагоцитарное и иммунодепрессивное действие. В ряде случаев клинической патологии фармакологическая активность препаратов трансфер-фактора может стать причиной осложнений его терапевтического применения. Поэтому оптимальный способ получения препаратов трансфер-фактора должен обеспечить максимальную иммунологическую и минимальную фармакологическую активность [14, 29].

Таблица 1

Биологическая активность препаратов на основе низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов

	Эффект	Действующее начало
Иммуноспецифическая активность	1. Антигенспецифический перенос иммунореактивности; 2. Антигенспецифическая иммунодепрессия; 3. Прямое связывание с бактериями, вирусами и т.п.	Пептиды, аффинные к эпитопам антигена 5-8 кДа; Пептиды, аффинные к паратопам антител; Пептиды типа бактеницинов 5-7 кДа.
Фармакологическая активность	1. Противовоспалительный и миелостимулирующий – стимуляция освобождения ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6; - хемотаксис гранулоцитов, пирогенность; -хемотаксис лимфоцитов; -экспрессия рецептора ИЛ-2;	Тафтсинподобные пептиды 0,5-1,0 кД; Нуклеозиды, инозин, гипоксантин, простагландины и т.п.; ИЛ-8 6 кДа; Фрагменты ИЛ-1 2-3 кДа, гликолипиды 1 кДа;

	2. Прокоагулянтный; 3. Обострение аллергии; 4. Инсулиноподобный; 5. Тимозиноподобный.	Пептиды 3,5-5 кДа; Гистамин 0,12-0,3 кДа; Инсулин 6 кДа; α_1 – тимозин 3,5 кДа.
--	--	---

Отечественный препарат антигенспецифичных иммунопептидов Аффинолейкин был разработан в Пермском НПО «Биомед» совместно с институтом им. И.И. Мечникова и производится Пермским НПО «Биомед» [30, 32].

На начальных этапах разработки технологии Аффинолейкина основной задачей был выбор сырья. Были проведены исследования, в которых использовали миндалины человека, лимфоциты миндалин человека и лейкоцитарная масса крови человека [5, 19]. Полученные препараты антигенспецифичных иммунопептидов были протестированы в реакции индукции ГЗТ к стафилококковому белку А. Установлено, что все препараты обладают примерно одинаковой активностью. Для промышленного производства препаратов антигенспецифичных иммунопептидов в качестве сырья была выбрана лейкоцитарная масса – не утилизируемый отход производства альфа-интерферона человека. Клетки разрушают путем замораживания-оттаивания, выделяют низкомолекулярные компоненты мембранным разделением и лиофилизируют.

1.6 Плазма крови человека – сырье для получения лечебных и профилактических препаратов

Плазма крови человека содержит большое количество различных по структуре и свойствам биологически активных соединений, играющих важную роль в выполнении жизненных функций и процессов, протекающих в организме.

В настоящее время более 25 различных белков получают из плазмы крови промышленным способом и используют в качестве лекарственных средств для лечения тяжелых заболеваний и повреждений, связанных с кровотечениями и

тромботическими расстройствами, иммунологическими, инфекционными и дегенеративными заболеваниями. Роль многих белков недостаточно изучена [28, 29, 30].

Исходным материалом для получения белков плазмы промышленным способом является плазма крови, полученная от здоровых доноров методом плазмафереза (афереза) или из цельной крови путем отделенная от клеточных элементов центрифугированием и объединенная в производственный пул (технологическую загрузку) [27, 28].

Для фракционирования применяют только индивидуальные порции плазмы, соответствующие требованиям по качеству и безопасности. В стартовые пулы обычно включают от 1000 до 10000 донаций. При объеме пула плазмы около 1000 литров в нем содержится до 75 кг белков, но лишь часть их выделяют в процессе производства [27, 45].

Правила сбора крови/плазмы, ее обработка и хранение влияют на сохранность белков плазмы и, соответственно, на выход целевых продуктов.

Требования по сбору плазмы для фракционирования могут отличаться от требований для свежзамороженной плазмы, применяемой в качестве самостоятельного лечебного препарата [45].

Плазма используется для производства препаратов лабильных белков (например, факторов свертывающей системы) или для выделения стабильных белков, например, альбумина и иммуноглобулина. Плазма, предназначенная для выделения лабильных белков, должна быть заморожена быстрым охлаждением при температуре минус 30 °С или ниже в течение короткого времени, но не позже 24 часов после донации. Плазма, предназначенная для выделения стабильных белков, должна быть заморожена при температуре минус 20 °С или ниже в течение короткого времени, но не позже 72 часов после донации [29, 154].

Для лучшей сохранности белков плазмы необходимо обеспечить хорошее смешивание крови с антикоагулянтом от начала до конца процесса сбора; продолжительность сбора не должна превышать 15 минут; не допускать вариации температуры при хранении [27, 154].

Во взятой в антикоагулянт донорской крови еще до отделения плазмы в нее переходит множество эритроцитарных, лейкоцитарных и тромбоцитарных белков (распад клеток, солюбилизация мембран) и образуются агрегаты. Кроме того, во время карантинизации плазмы происходит протеолиз, окисление и дезагрегация белков [28, 27].

Для получения лечебных препаратов общего действия используют плазму крови нормальной популяции доноров. Для получения препаратов специфического действия, как, например, гипериммунных (специфических) иммуноглобулинов, плазму крови получают следующими способами:

- отбирают индивидуальные донации путем селекции доноров из нормальной популяции;
- заготавливают плазму крови от лиц, иммунизированных с профилактической целью;
- заготавливают плазму крови от добровольцев, иммунизированных вирусными и бактериальными антигенами по специальным схемам.

Виды гипериммунной плазмы и способы ее получения приведены в рекомендациях ВОЗ [154].

Традиционным способом разделения белков плазмы крови является спиртовое фракционирование, разработанное E.Cohn в 1946 году, и его более поздние модификации [27, 154]. Этот процесс включает последовательные этапы их очистки при определенных концентрациях этанола, связанные со сдвигом pH, температуры и осмоляльности, что приводит к избирательному осаждению белков, в основном IgG и альбумина.

Осадки отделяют центрифугированием или фильтрацией [117].

Современные технологии при правильной организации производства позволяют получать большой ассортимент лечебных препаратов из плазмы крови доноров, но основными по клинической значимости являются альбумин, факторы свертывания и препараты иммуноглобулинов. Это стратегически значимые продукты, обеспечивающие до 80% дохода производителей препаратов крови [27, 28].

Идея производства препаратов, способных создавать пассивный специфический клеточный иммунитет, используя в качестве сырья плазму крови человека, возникла в середине прошлого века [117]. В эксперименте удалось осуществить пассивный перенос клеточного иммунитета и ряд иммунорегуляторных воздействий с помощью альфа-глобулинов гипериммунной сыворотки, растворимых Т-клеточных рецепторов (в частности, гамма-дельта Т-клеток) и препаратов растворимых Т-клеточных антигенсвязывающих белков (ТАБ) [17, 18].

Функциональными характеристиками ТАБ являются:

- ТАБ аффинно связывают непротессивный антиген без участия продуктов МНС;
- комплекс ТАБ+антиген присоединяет IL-10, TGF β , эластазу и простагландины;
- происходит антигензависимое фокусирование этих цитокинов в тканях;
- индукция клеточного иммунитета, сдерживание и подавление Т-зависимого воспаления. Однако эти антигенсвязывающие белки плазмы человека, кроме гамма-цепей CD3 Т-клеточного рецептора, полностью не охарактеризованы и пока не стали основой терапевтических лекарств [17, 117].

Тем не менее, вполне эмпирически удачным направлением оказалось исследование белков, представленных в низкомолекулярном (ММ меньше 15 кДа) субпротеоме плазмы человека [17, 18].

В плазме человека все 20 белков с молекулярной функцией цитокинов/хемокинов – это пептиды из 52 – 128 аминокислотных остатков молекулярной массой 5 – 14 кДа, стереоспецифичные только к клеточным рецепторам, но не к антигенам. То есть, НАСЦ еще недостаточно охарактеризованы по структуре и геномике для включения в базы данных протеома плазмы человека и в то же время обладают особыми свойствами:

- обладают двойной стереоспецифичностью – к антигенам и клеточным рецепторам;

- представляют собой Т-клеточный антигенспецифичный продукт адаптивного иммунного ответа;
- выделяются *ex vivo* при дезинтеграции и экстракции лимфоцитарных мембран или белков (ТАБ) плазмы иммунизированного донора;
- способны осуществлять антигенспецифичную поддержку иммунного ответа [1, 3, 17].

По данным литературы, при фракционировании плазмы по Кону основная масса низкомолекулярных белков, способных осуществлять антигенспецифичную поддержку иммунного ответа, содержится в осадке Б (III фракция по Кону). Этот осадок содержит α -, β - глобулины и липиды [7].

В исследованиях, выполненных Пермским НПО «Биомед» совместно с ГУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН и поддержанных РФФИ (проект 02-04-48924), было обнаружено, что молекулы иммунопептидов представляют, по-видимому, аминотерминальные фрагменты растворимых Т-клеточных антигенсвязывающих белков (ТАБ), которые содержатся в плазме человека. Оказалось, что ТАБ, выделенные из фракции α -глобулинов плазмы крови доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином, могут служить источником приготовления специфических иммунотерапевтических лекарственных средств типа разработанного ранее полиспецифического иммунопептидного препарата Аффинолейкин [15, 17].

Таким образом, сырьем для производства препаратов иммунопептидов направленного действия может служить осадок Б, полученный из плазмы иммунизированных доноров.

В связи с этим нам представлялось целесообразным провести исследования по разработке технологии получения препарата иммунопептидов антистафилококковой направленности с использованием в качестве исходного сырья отходов производства стафилококкового иммуноглобулина.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и оборудование

2.1.1. Препараты и реагенты

Анатоксин стафилококковый очищенный концентрированный производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед».

Иммуноглобулин человека антистафилококковый производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед» (ФСП 42-0504673105).

Плазма для фракционирования получена из донорского пункта НПО «Биомед» (ФСП –ЛСР-003036/10-090410).

Стафилококковый белок А (СБА) производства Pharmacia Fine Chemicals, Швеция.

Глицин (гликокол, аминокислота) производства «Panreac», содержание основного вещества не менее 98,5 %.

Мочевина (карбамид) производства «Panreac», массовая доля мочевины не менее 99,3% (ГОСТ 6691-77).

Спирт этиловый ректификованный экстра или высшего сорта (ГОСТ Р 51652-2000).

Аммоний сернокислый производства фирмы BASF, Германия (СП-03-701.2.-В1-104).

Вода для инъекций производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед» (ФС 42-0325-09).

Иммуноферментная тест-система MONOLISA® anti-HBs – для определения антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в сыворотке или плазме производства фирмы «BIO-RAD».

Коммерческий субстрат (раствор тетраметилбензидина) производства фирмы «Хема», Россия.

Пероксидаза хрена высокоочищенная с RZ не менее 2,7 производства фирмы «Sigma», США.

N-гидроксисукцинимидобиотин производства фирмы «Sigma», США.

Полистироловые пластины для проведения твердофазного ИФА фирмы «Greiner bio-one».

Мембраны фильтровальные производства ООО ПАЛЛ ЕВРАЗИЯ, Россия, диаметр пор 3; 2; 1,2; 1, 0,8; 0,65; 0,45; 0,22 мкм, (ТУ 9452-001-11483645-2001).

2.1.2 Оборудование

Реактор DB 500W (Германия)

Суперцентрифуга СГО-100 (Россия)

Центрифуга лабораторная ЦЛР1 (Россия)

Вакуумно-нагнетательный насос (фирма «Millipore»)

Низкотемпературная камера (до минус 70 °С) (фирма «Sanyo», Ultra low, Япония)

Установка для ультрафильтрации «Sartaflow Beta» (фирма «Sartorius stedim» Германия).

Термостат ТС-80М, температурный диапазон от 28 до 55 °С (Россия)

Фотоколориметр КФК-2 (Россия)

Спектрофотометр PR 2100 (фирма «Sanofi Diagnostics Pasteur», Франция)

Полумикроосмометр К-7400 («KNAUER», Германия)

Автоматическое промывочное устройство (фирма «Sanofi Diagnostics Pasteur», Франция)

Спектрофотометр WPA, BIOWAVE II AND II⁺ QUICK REFERENCE GUIDES

Сублиматор ТГ-50 (Германия)

Иономер лабораторный И160 МТИС 2.840.001 ПС (Россия)

Шкаф сушильно-стерилизационный MOV313-P (фирма «Sanyo», Япония)

Мерник чугунно-эмалированный, емкость 0,16 м³, рабочий вакуум – 0,7 кгс/см², мерное приспособление – водомерное стекло (Россия)

Напорный бак (фирмы «Millipore»)

Держатель фильтра 293 мм (фирма «Millipore»)

Фильтродержатель Сальникова (Россия)

Жидкостной хроматограф (фирма «Knauer»), включающий:

- хроматографическую колонку SuperDex 200 10/300;

- изократический насос для подачи подвижной фазы в системе под давлением (Knauer Smartline 1000);
- ультрафиолетовый детектор Knauer Smartline 2550, рабочая длина волны 280 нм;
- инжектор Knauer;
- компьютер с установленной программой сбора и обработки хроматографических данных Clarity Chrom.

2.2 Методы

2.2.1 Физико-химические методы

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Проводили на колонке *SuperDex 200 10/300* при условиях:

скорость потока	0,5 мл/мин;
температура	(22 ± 2) °С;
детектор	УФ, 280 нм;
объем вводимой пробы	100 мкл;
время регистрации хроматограммы	60 мин;

подвижная фаза: 0,05 М КФБ; 0,15 М NaCl; 0,003 М NaN₃,

испытуемый образец: с концентрацией белка более 0,6 мг/мл.

2.2.1.1. Электрофорез

Электрофорез проводили в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия с обработкой 2-меркаптоэтанолом и без обработки, окрашивали бриллиантовым синим R. Процедуру проводили в соответствии с инструкцией к прибору «BIO-RAD».

2.2.1.2. Определение остаточного содержания этанола

Определение остаточного содержания этанола в полуфабрикate и готовом препарате проводили по методике, описанной в МУК 4.1/4.2.588-96. Метод основан на окислении спирта калия дихроматом.

2.2.1.3. Определение содержания мочевины (карбамида)

Мочевину в полуфабрикate и готовом препарате определяли по методике, описанной в ГОСТ 6691-77.

2.2.1.4. Процесс ультрафильтрации и диафильтрации

Ультрафильтрацию и диафильтрацию проводили по инструкции к установке ультрафильтрационной на модулях с ретенцией 30, 10 и 5 кДа.

2.2.1.5. Определение белка по Лоури

Проводили по методике описанной в ГФ XI издания. Метод основан на свойстве ароматических аминокислот давать цветную реакцию с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи.

2.2.1.6. Определение белка спектрофотометрически

Проводили по методике, описанной в ГФ XI издания.

Спектрофотометрический метод определения белка основан на способности ароматических аминокислот (триптофан, тирозин и в меньшей степени фенилаланин) поглощать ультрафиолетовый свет с максимумом поглощения при 280 нм.

Условно принято считать, что при концентрации белка в растворе, равной 1 мг/мл, величина оптической плотности при 280 нм равна 1 при использовании кюветы с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют растворитель препарата – физиологический раствор.

Оптическую плотность готового препарата или полуфабриката измеряли при двух длинах волн – 260 и 280 нм; содержание белка X (мг/мл) рассчитывали по формуле Калькара:

$$X = 1,45 \times D_{280} - 0,74 \times D_{260}.$$

2.2.1.7. Растворимость, прозрачность, цветность, стерильность, pH

Оценку растворимости, цветности, стерильности и pH проводили в соответствии с ГФ XI издания.

2.2.1.8. Определение осмоляльности «Стафилолейкина»

Осмоляльность измеряли криоскопическим методом, основанным на понижении точки замерзания растворов по сравнению с точкой замерзания чистого растворителя.

2.2.1.9. Определение эвтектической температуры растворов

Определение проводили с помощью прибора мегомметр с диапазоном измерения удельного сопротивления от 1 кОм до 500 мОм.

Установка для определения эвтектической температуры растворов препаратов представляла собой стеклянный стакан диаметром 40 мм и высотой 50 мм, в крышке которого стационарно закреплены два электрода, соединенные с мегомметром, и расположенный между ними термопреобразователь сопротивления ТСП марки ТС 1388/4.

Установку с исследуемым раствором препарата помещали в низкотемпературную камеру «TBV 1000» (Германия) и с помощью измерителя-регулятора 2ТРМ1 (диапазон измерения с датчиком ТСП от минус 50 до плюс 180 °С, класс точности 0,5) понижали температуру. Контроль температуры раствора препарата и температуры в низкотемпературной камере осуществляли при помощи термопреобразователя сопротивления ТСП марки ТС1388/4 и контрольно-измерительного регистрирующего прибора «Технограф-160».

Эвтектическая температура (температура полного затвердевания раствора) определялась при удельном сопротивлении раствора равном 20 мОм.

2.2.2 Иммунологические и биологические методы

2.2.2.1. Иммуноферментный анализ

Для определения специфической активности с помощью ИФА были использованы следующие реагенты:

- стафилококковый анатоксин, использовался непосредственно для сенсibilизации твердой фазы;
- конъюгат – биотинилированный стафилококковый белок А;
- контрольный положительный образец – 10% раствор антистафилококкового иммуноглобули

на производства НПО «Биомед», из которого готовили двукратные разведения, начиная с концентрации белка в первой лунке 0,5 мкг/мл;

- отрицательный контрольный образец – плазма крови человека, не содержащая стафилококковых антител;
- планшеты для твердофазного ИФА для иммобилизации антигена;

- субстрат и система детекции.

Стафилококковый анатоксин адсорбировали в концентрации 10 мкг/мл (0,34 ЕС/мл). Планшет выдерживали при температуре (8 ± 2) °С в течение суток. В лунки планшета рядов 1 и 2 вносили по 0,1 мл контрольных образцов (положительный – иммуноглобулин человека противостафилококковый (А1, 2 – F1, 2) и отрицательный – сыворотку человека не содержащую стафилококковых антител (G1, 2-H1, 2) в рабочих разведениях, шаг разведения 1:2; в лунки планшета рядов 3 и 4 вносили ФСБ-Т; в лунки планшета рядов 5 и 6 вносили исследуемый препарат «Стафилолейкин», в концентрации 0,5 мкг/мл, в лунки планшета рядов 7 и 8 вносили по 0,1 мл контрольных образцов (положительный – иммуноглобулин человека противостафилококковый (А7, 8 – F7, 8) и отрицательный – сыворотку человека не содержащую стафилококковых антител (G7, 8-H7, 8).

Планшет закрывали и инкубировали в течение 60 минут при температуре (37 ± 1) °С.

После инкубации планшет промывали 5 раз. Далее в лунки планшета рядов 1 и 2 вносили по 0,1 мл ФСБ-Т; в лунки планшета рядов 3, 4, 5 и 6 вносили контрольные образцы (положительный (А3, 4, 5, 6 – F3, 4, 5, 6) в разведениях, шаг разведения 1:2 и отрицательный (G3, 4, 5, 6-H3, 4, 5, 6), в лунки планшета рядов 7 и 8 вносили «Стафилолейкин» в концентрации 0,5 мкг/мл. Планшет закрывали и инкубировали в течение 60 минут при температуре (37 ± 1) °С.

В лунки отмытого планшета вносили конъюгат биотинилированный белок А. Планшет закрывали и инкубировали в течение 60 минут при температуре (37 ± 1) °С. После инкубации планшет промывали 5 раз. Раствор субстрата (коммерческий препарат R055Z (Хема, Россия) вносили в каждую лунку по 0,1 мл. Планшет выдерживали при температуре (20 ± 2) °С в течение 20 минут в защищенном от света месте.

Реакцию останавливали внесением в каждую лунку по 0,05 мл стоп-реагента. Результаты ИФА регистрировали на спектрофотометре PR 2100 производства фирмы «Sanofi Diagnostics Pasteur» (Франция) при двух длинах волн 450/620 нм.

При определении концентрации специфических антител была использована компьютерная программа количественного определения специфических антител или антигенов, созданная на основании разработанного алгоритма обработки результатов ИФА [4, 22, 26]

2.2.2.3. Определение стерильности препарата

Определение стерильности разработанного препарата проводили по методике описанной в ОФС-42-0066-07.

Эксперименты на животных проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985) в соответствии со следующими законодательными и рекомендательными документами:

1. Правила лабораторной практики в Российской Федерации. Утверждено приказом Минздрава России от 19.06.2003 №267.

2. Федеральный закон № 61-ФЗ от 12.04.2010 г. «Об обращении лекарственных средств» Ст. 10 и 11.

3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых лекарственных веществ. П/ред. Р.У. Хабриева. – 2-изд., М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005, Стр. 13, 28, 41 – 122, 501 – 514.

4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. П/ред. А.Н. Миронова – часть вторая. – М.: ,Гриф и К, 2012. – 536 с.

2.2.2.4. Определение токсических свойств препарата

Исследование токсических свойств препарата проводили согласно основным положениям РД 42-28-8-89 «Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов». Острую и хроническую токсичность определяли на белых беспородных мышах массой (20 ± 2) г и морских свинках массой (250 ± 10) г.

2.2.2.5. Определение специфической активности

2.2.2.5.1. Определение специфической активности методом переноса ГЗТ, регистрируемого по кожным пробам со стафилококковым белком А (СБА), адсорбированным на алюмо-калиевых квасцах

Эксперименты проводили на мышах линии BALB/c (самцы весом 23 – 25 г) по методике Brummer E. et al., модифицированной Мацем А.Н. (см. глава 4.4.1)

2.2.2.5.1. Определение специфической активности методом переноса ГЗТ, регистрируемого с помощью реакции СБА-зависимой конгломерации лейкоцитов

По аналогии с препаратом «Аффинолейкин» специфическую активность «Стафилолейкина» определяли методом переноса ГЗТ, регистрируемого с помощью реакции СБА-зависимой конгломерации лейкоцитов.

Исследования проводили на мышах F1 (СВА × С57BL/6J). Антигензависимая реакция конгломерации лейкоцитов рассматривается как аналог реакции торможения миграции лейкоцитов крови – классического теста оценки клеточного иммунитета.

Активность препарата выражается величиной его дозы в мкг, введение которой мышам в 100 раз снижает пороговую концентрацию СБА, вызывающую конгломерацию циркулирующих лейкоцитов, в сравнении с эффектом введения неспецифического иммуностимулятора – натрия нуклеината. Согласно ФСП на препарат «Аффинолейкин», доза, дающая «индекс переноса», равный 100 (D_{100}), не должна превышать 50 мкг/мышь.

Чтобы унифицировать расчёты активности «Аффинолейкина» и «Стафилолейкина», доза 50 мкг принимается за 1,0 ед.

Приготовление растворов:

1. *Раствор натрия нуклеината* (ФС 42-1781-97) – 1 мг которого растворяют в 10 мл 0,9% раствора натрия хлорида для инъекций и стерилизуют микрофильтрацией через мембрану с размером пор 0,22 мкм;

2. *6,1% раствор натрия лимоннокислого трёхзамещённого 5,5-водного* (ФС 42-2872-92) – 1,83 г которого растворяют в 30 мл воды очищенной и стерилизуют микрофильтрацией через мембрану с размером пор 0,22 мкм;

3. *Раствор, содержащий 25,6 мкг/мл СБА в 6,1% растворе натрия лимоннокислого («рабочий» раствор СБА).* В стерильный флакон, содержащий 2 мг СБА, добавляют в условиях асептики 2 мл воды очищенной; затем в другой стерильный флакон помещают 3,9 мл 6,1% раствора натрия цитрата и добавляют 0,1 мл раствора СБА из первого флакона;

4. *0,01% раствор метиленового голубого* – 0,1 г красителя растворяют в 1000 мл очищенной воды.

Постановка реакции

1-й день исследования. 12 мышей F₁ (СВА × С57BL/6J) или F₁ (С57BL/6J × СВА) (одного пола, массой тела 22 – 25 г) делят на 4 группы (по 3 мыши) и вводят им в основание хвоста справа подкожно по 0,2 мл следующие растворы:

1) группа (контроль) – 20 мкг натрия нуклеината в 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций (заранее приготовленный раствор 1)

2) группа – (4 мкг) 0,08 ед. «Стафилолейкина» в 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций; к 0,2 мл раствора, содержащего 0,4 ед. «Стафилолейкина» (приготовленного для группы 3) добавляют 0,8 мл 0,9% раствора натрия хлорида

3) группа – (20 мкг) 0,4 ед. «Стафилолейкина» в 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций; для приготовления раствора в ампулу, содержащую 250 мкг (5 ед.) «Стафилолейкина» вносят 2,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида; в 0,2 мл этого раствора содержится (20 мкг) 0,4 ед. «Стафилолейкина»

4) группа – (100 мкг) 2,0 ед. в 0,9% растворе натрия хлорида для инъекций; вскрывают 2 ампулы, содержащие по 250 мкг (5 ед.) «Стафилолейкина» и вносят 1,0 мл в 0,9% раствор натрия хлорида для инъекций и после растворения содержимого переносят раствор из 1-ой ампулы во 2-ю. Во 2-ой ампуле каждые 0,2 мл раствора содержат (100 мкг) 2 ед. «Стафилолейкина»

Сделав инъекции и отметив время, оставляют мышей в виварии на ночь, обеспечив питательной водой и пищей без ограничений

2-й день исследования. Готовят 12 силиконированных мерных центрифужных пробирок, нумеруют их от 1 до 12 и вносят в каждую по 0,2 мл (по меткам на стенке пробирки) 6,1% раствора натрия цитрата. Затем готовят серии разведений

СБА в стерильном полистироловом «планшете для иммунологических реакций» с 96 круглодонными лунками (ТУ 64-2-278-79). Во все лунки планшета вносят по 100 мкл 6,1% раствора натрия цитрата. После этого приготовленный накануне «рабочий» раствор, содержащий 25,6 мкг СБА в 1 мл, вносят по 100 мкл в лунки «Н» с 1 по 6 ряд планшета. Затем, перемешав на шейкере содержимое лунок, последовательными переносами 100 мкл раствора из лунки в лунку от «Н» до «В» готовят серии двукратных разведений СБА: 6,4 – 3,2 – 1,6 – 0,8 – 0,4 – 0,2 – 0,1 мкг/мл. Избыток раствора в 100 мкл из лунок «В» удаляют. После этого в лунки «Н» с 7 по 12 ряд вносят по 50 мкл рабочего раствора СБА и, перемешав, последовательными переносами 50 мкл раствора из лунки в лунку от «Н» до «В» готовят серии трехкратных разведений СБА: 4,3 – 1,4 – 0,5 – 0,16 – 0,05 – 0,018 – 0,006 мкг/мл. Избыток раствора в 50 мкл из лунок «В» удаляют. Лунки «А» с 1 по 12 ряд содержат только 100 мкл 6,1% раствора натрия цитрата и представляют собой «контрольные» для каждого ряда

Через 18 – 24 ч после инъекций «Стафилолейкина» или нуклеината мышей по одной помещают в 1-литровую стеклянную банку, на дне которой находится вата, смоченная эфиром для наркоза. Банку накрывают крышкой чашки Петри, и как только мышь заснёт, её лапки фиксируют инъекционными иглами на толстой (1 – 2 см) воск-парафиновой подложке. Шерсть передней поверхности тела животного смачивают 0,9% раствором натрия хлорида. «Глазными» хирургическими ножницами надрезают кожу в области правой подмышечной ямки, перерезают подмышечные сосуды, пипетками Пастера отдельно у каждой мыши собирают излившуюся в карман между кожей и грудной стенкой кровь (пока не свернулась!) в приготовленные центрифужные пробирки соответствующего номера с раствором натрия цитрата до отметки «1 мл» и перемешивают. Погибшую от кровопотери мышь вскрывают и осматривают паховые лимфоузлы справа и слева, а также место введения препарата.

В приготовленный планшет во все лунки одного ряда от «Н» до «А» вносят по 100 мкл стабилизированной цитратом крови от одной мыши, заполняя по числу мышей все 12 рядов планшета (вносят кровь, начиная с контрольной лунки «А» и

меня наконечник после лунки «Н»). Планшет сверху герметизируют пленкой «Парафилм М» (Sigma, США), раскатав ее фотографическим валиком, накрывают крышкой, которую закрепляют резиновыми обхватками. Планшет помещают в термостат при температуре $(38,0 \pm 1,0)$ °С на 3 часа. Каждые 30 минут планшет извлекают из термостата, помещают на 3 мин в устройство для горизонтального встряхивания, добиваясь перемешивания содержимого лунок, и вновь помещают в термостат.

На выверенной по уровню горизонтальной поверхности раскладывают 96 чистых обезжиренных предметных стекол. На стеклах надписывают номер ряда и буквенный шифр лунки. По окончании инкубации планшет извлекают из термостата, открывают и из каждой лунки, начиная с «А», перемешав, дважды переносят по 50 мкл крови на соответствующее предметное стекло и распределяют ее по его поверхности наконечником пипетки в виде двух «толстых капель» диаметром около 2 см. Чтобы капли были одинаковы, под стекло помещают трафарет. Мазки оставляют на воздухе до полного высыхания.

3-й день исследования. Высушенные мазки, не фиксируя, осторожно погружают в 0,01% раствор метиленового голубого на 10 минут. После гемолиза и окрашивания «толстых капель» мазки осторожно извлекают из красителя и, не промывая и не касаясь капель, вновь высушивают на воздухе.

Учет результатов.

Для просветления на поверхность мазка наносят иммерсионное масло и исследуют под микроскопом при 80-кратном увеличении. Обе капли каждого мазка просматривают по продольному диаметру, начиная с лунки «А». В последовательно сменяющихся полях зрения обращают внимание на взаимное расположение лейкоцитов и, встретив клеточные агломераты, определяют число образующих их лейкоцитов. Учитывают любые агломераты, состоящие только из сегментоядерных или только из мононуклеарных лейкоцитов, а также смешанного состава, глобулярной и цепочечной формы.

Просматривая обе капли каждого мазка, выявляют три наиболее крупных агломерата и усредненное число образующих их клеток заносят в таблицу,

соответствующую расположению лунок на планшете. Обычно в мазках из лунок «А» – контрольных в каждом ряду – встречаются агломераты из 3, максимум 5 клеток. Просматривая далее мазки из лунок от «В» до «Н», находят ту лунку данного ряда, 3 самых крупных агломерата которой содержат в среднем на 2 и более лейкоцитов больше, чем усредненная численность максимальных агломератов в мазках из лунки «А». Концентрацию СБА в этой лунке принимают за пороговую (ПК), вызвавшую конгломерацию (укрупнение агломератов) лейкоцитов данной мыши.

Если ни в одной из лунок от «В» до «Н» рядов от 1 до 6 не выявлено конгломерации лейкоцитов, то условно за пороговую концентрацию СБА принимают 12,8 мкг/мл. Отсутствие конгломерации лейкоцитов в лунках от «В» до «Н» с 7 по 12 ряд свидетельствует об утрате активности препарата и нецелесообразности дальнейшего проведения анализа.

Если в лунках «В» рядов от 7 до 12 выявлена конгломерация лейкоцитов, то условно за пороговую концентрацию СБА принимают 0,002 мкг/мл, хотя в действительности она может быть и меньше.

После этого вычисляют среднее геометрическое пороговых концентраций (СПК) СБА в каждой группе животных, извлекая кубический корень из произведений ПК каждой из мышей. Затем, последовательно разделив СПК первой (контрольной) группы животных на СПК второй, третьей и четвертой групп, вычисляют «индексы переноса» (И) для каждой из введенных доз (Д) «Стафилолейкин», то есть, I_1 для 0,08 ед., I_2 для 0,4 ед. и I_3 для 2,0 ед. Затем находят сумму И ($\Sigma I = I_1 + I_2 + I_3$) и сумму произведений $I \times D$ ($\Sigma I \times D = I_1 \times 0,08 + I_2 \times 0,4 + I_3 \times 2,0$), а после этого – дозу препарата, которая дает «индекс переноса» равный 100, по формуле линейной регрессии:

$$D_{100} = \frac{\sum (I \cdot D) + 260 - 1,7 \sum I}{1,2 \sum (I \cdot D) - \sum I} \text{ (ед.)}$$

Величина D_{100} должна быть меньше или равна 1,0 ед. (50 мкг). Если D_{100} препарата, номинально содержащего в ампуле 1,0 или 2,0 ед. «Стафилолейкина», превысит 1,0 ед., но будет менее 2,0 ед., то он может быть маркирован как

содержащий в ампуле соответственно 0,5 или 1,0 ед. Препарат с D_{100} , равной или превышающей 2,0 ед., считается неактивным. Умножив найденный показатель активности на 50, можно его выразить в дозе мкг/мышь (метод оценки регламентирован для препарата «Аффинолнейкин» ФСП 42-0504-7814-06).

2.2.2.6. Определение специфической активности препарата методом переноса противостафилококковой резистентности

Определение специфической активности препарата методом переноса ироге-востафилококковой резистентности проводили на разработанной А.Н. Мацем модели подострого стафилококкового менингоэнцефалита у мышей, заражённых интрацеребрально *S. aureus* МТ-1. Исследования проводили на мышцах линии СВА/Sto самцах массой (24 ± 2) г (см. главу 4.7).

2.2.2.7. Оценка потенциала препарата в терапии язвенных поражений роговицы стафилококковой этиологии

Оценка препарата проведена по методике, разработанной Мацем А.Н., на модели стафилококкового стромального гнойного кератита на 10 кроликах породы «Шиншилла» (самцы массой ($2,5 \pm 0,3$) кг) (см. главу 4.8).

2.2.2.8. Определение пирогенности

Определение пирогенных свойств препарата проводили на кроликах с массой тела ($2,0 \pm 0,2$) кг (ГФ XI).

2.2.2.9. Определение провоспалительной активности препарата

Определение провоспалительной активности препарата проводили на мышцах одновременно с оценкой иммуноспецифической активности (см. раздел 4.6).

2.2.2.10. Определение миелостимулирующей активности (способности вызывать активацию лейкопоэза) препарата

Оценку миелостимулирующей активности проводили на мышцах. Определяли увеличение степени спонтанной конгломерации лейкоцитов (лейкергии) одновременно с оценкой специфической активности (см. раздел 4.5).

2.2.2.11. Гистологические исследования

Гистологические исследования проводились совместно с сотрудниками кафедры патологической анатомии Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера.¹

2.2.3. Статистическая обработка результатов

Статистический анализ результатов был проведен с помощью методов описательной статистики. В работе использовали электронные таблицы Excel для Windows (Microsoft) и AtteStat, для расчета критерия Фишера. Результаты в большинстве таблиц представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Для оценки значимости межгрупповых различий использовали парный и непарный t-критерия Стьюдента, различия или показатели связи считались значимыми при $p < 0,05$, а также медианы и их 95%-е доверительные интервалы по Ван дер Вардену. Изучение линейности и параллелизма спектрофотометрического метода анализа проводили в соответствии с инструкцией по применению компьютерной программы «Паралайн», разработанной в ГИСК им. Л.А. Тарасевича, которая прошла тестирование в Национальном Институте Биологических Стандартов (Англия) и в Европейском центре ВОЗ (Дания).

¹ Выражаю благодарность заведующей кафедры патологической анатомии Фрейд Г.Г. и сотрудникам за предоставленную возможность проведения гистологических исследований.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧНЫХ ЦИТОКИНОВ ИЗ ОСАДКА Б – ОТХОДА СЕРИЙНОГО ПРОИЗВОДСТВА ПРОТИВОСТАФИЛОКОККОВОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

Антигенсвязывающие Т-клеточные белки (ТАБ) иммунизированного донора, способные переносить гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) и другие проявления специфического клеточного иммунитета неиммунному реципиенту, существуют в двух формах – связанной с мембранами Т-клеток и растворимой в крови и лимфе. В плазме крови они представлены агрегатами (мол. масса 1000 кДа), мультимерами (120-150 кДа), ди- и тримерами (48-90 кДа) неполярных гидрофобных белков, которые при восстановлении распадаются на «протомеры» (20-28 кДа) [18, 19].

Интересующие нас иммунопептиды, по данным литературы, обнаружены в осадке Б, являющимся отходом производства иммуноглобулиновых препаратов при спиртовом фракционировании плазмы (рис. 1), основанном на последовательном изменении основных факторов, влияющих на растворимость белков: концентрации этанола, рН, ионной силы, концентрации белка и температуры [59].

На первой стадии фракционирования карантинизированную плазму крови подвергают предварительной очистке от остатков фибриногена, слизи и нерастворимых примесей (стадия А₈). Затем выделяют осадок, содержащий иммуноглобулиновую фракцию со значительными примесями α- и β-глобулинов (стадия А). После растворения осадка иммуноглобулинов при низкой ионной силе в изoeлектрической зоне (рН 5,0-5,1) отделяют иммуноглобулины класса А, М, незначительное количество IgG, липопротеиды, а также α- и β-глобулины. Полученную осажденную фракцию обозначают как «осадок Б» (фракция III по E.Cohn'у) [7, 21, 28, 29].

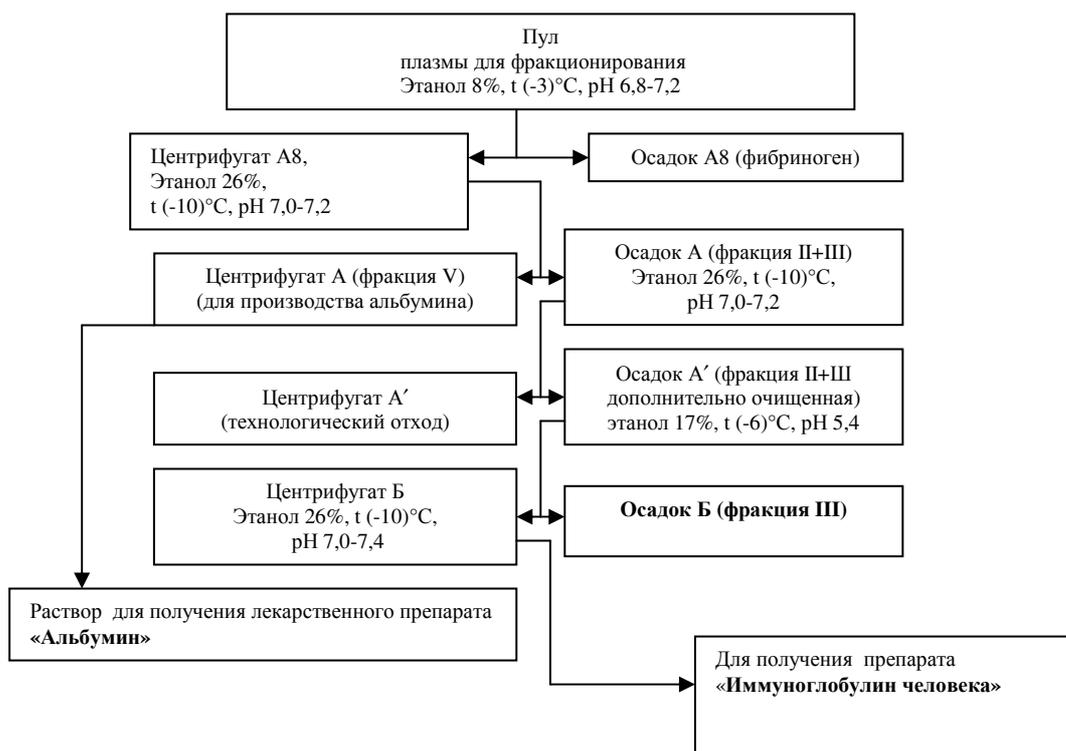


Рис. 1. Схема фракционирования белков крови по E.Cohn'у [7]

3.1. Получение Т-клеточных антигенсвязывающих белков из осадка Б

Для производства одной серии антистафилококкового иммуноглобулина берется пул карантинизированной плазмы, содержащей стафилококковые антитела, примерно от 600 доноров. Это позволяет получить препарат, активный в отношении многих штаммов золотистого стафилококка.

При разработке технологии получения антистафилококкового препарата, активным началом которого являются иммунопептиды, мы оценивали возможность использования в качестве исходного сырья осадок Б. Как указано выше, балластный осадок Б содержит иммуноглобулины класса А, М, незначительное количество IgG и липопротеиды, β -глобулины, а также фракцию α -глобулинов в которой находятся растворимые ТАБ [6].

На первом этапе наших исследований по отработке технологии производства антистафилококкового препарата необходимо было определить условия получения ТАБ, содержащихся в α -глобулиновой фракции, из осадка Б.

С этой целью к осадку добавляли 0,01М калий-фосфатный буферный раствор с pH $(7,3 \pm 0,1)$ (КФБ), содержащий мочевины в различных концентрациях: 1, 2, 4

и 6 М. Учитывая тот факт, что осадок Б содержит значительное количество липидов, дополнительно были проведены эксперименты, в которых для осаждения фракции липидов в буферный раствор, содержащий мочевины, добавляли хлороформ.

Эксперименты по обработке осадка Б проводили при температуре минус (5 ± 1) °С по двум схемам.

В опыт брали две пробы, содержащие по 50 г осадка Б. В обе пробы добавляли по 120 мл буферного раствора (эксперимент 1), а во вторую пробу (эксперимент 2), кроме этого, вносили 120 мл хлороформа. После растворения осадка пробы центрифугировали ($g=7800$) для удаления нерастворившихся примесей. Надосадочные жидкости фильтровали через мембраны с диаметром пор от 1,2 мкм до 0,22 мкм, затем проводили осаждение белков насыщенным раствором сернокислого аммония, добавляя его до 43% от объема. Через (18 ± 2) часов пробы центрифугировали, образовавшиеся осадки растворяли в КФБ. После центрифугирования ($g=7800$) в пробе, при растворении которой использовали хлороформ, образовавшийся осадок по массе был в четыре раза меньше, чем в пробе, растворенной без добавления хлороформа, то есть выход продукта был меньше. Полученный осажденный белок растворяли в буферном растворе, добавляя его до первоначального объема. При использовании схемы с использованием хлороформа выход целевого продукта был низким, вероятно, из-за возможной денатурации белков. Уменьшение количества хлороформа не привело к положительным результатам, поэтому в дальнейшем мы отказались от применения хлороформа для растворения осадка Б.

Данные, полученные в этих опытах, показали, что максимальный переход белков в раствор происходит уже при концентрации мочевины 2 М, так что увеличение концентрации до 4 и 6 М было нецелесообразным.

В следующей серии экспериментов мы оценивали влияние температуры на растворение и выбирали оптимальное соотношение осадка Б и КФБ. Растворение проводили при отрицательной минус (5 ± 1) °С и положительной плюс (5 ± 1) °С температурах. Равные количества осадка растворяли, используя разные

количества КФБ, а затем последовательно фильтровали через мембраны с диаметром пор 1,0; 0,8; 0,65; 0,45 и 0,22 мкм. Фильтраты доводили до равных объемов и измеряли в них содержание белка.

Максимальный переход в раствор всех белков, как выяснилось, происходит при соотношении 1:10 (табл. 2), то есть 1 кг осадка растворяли в 10 л буферного раствора, содержащего 2 М мочевины, при температуре $(5 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Таблица 2

Содержание белка в фильтратах в зависимости от соотношения количества осадка Б и КФБ

Соотношение количества осадка Б и КФБ	Содержание белка в фильтрате, %
1:2	1,1
1:4	1,6
1:5	2,86
1:10	3
1:15	2,8
1:20	2,95

В результате проведенных экспериментов была разработана схема получения Т-клеточных антигенсвязывающих белков из осадка Б – отхода производства противостафилококкового иммуноглобулина (рис. 2).

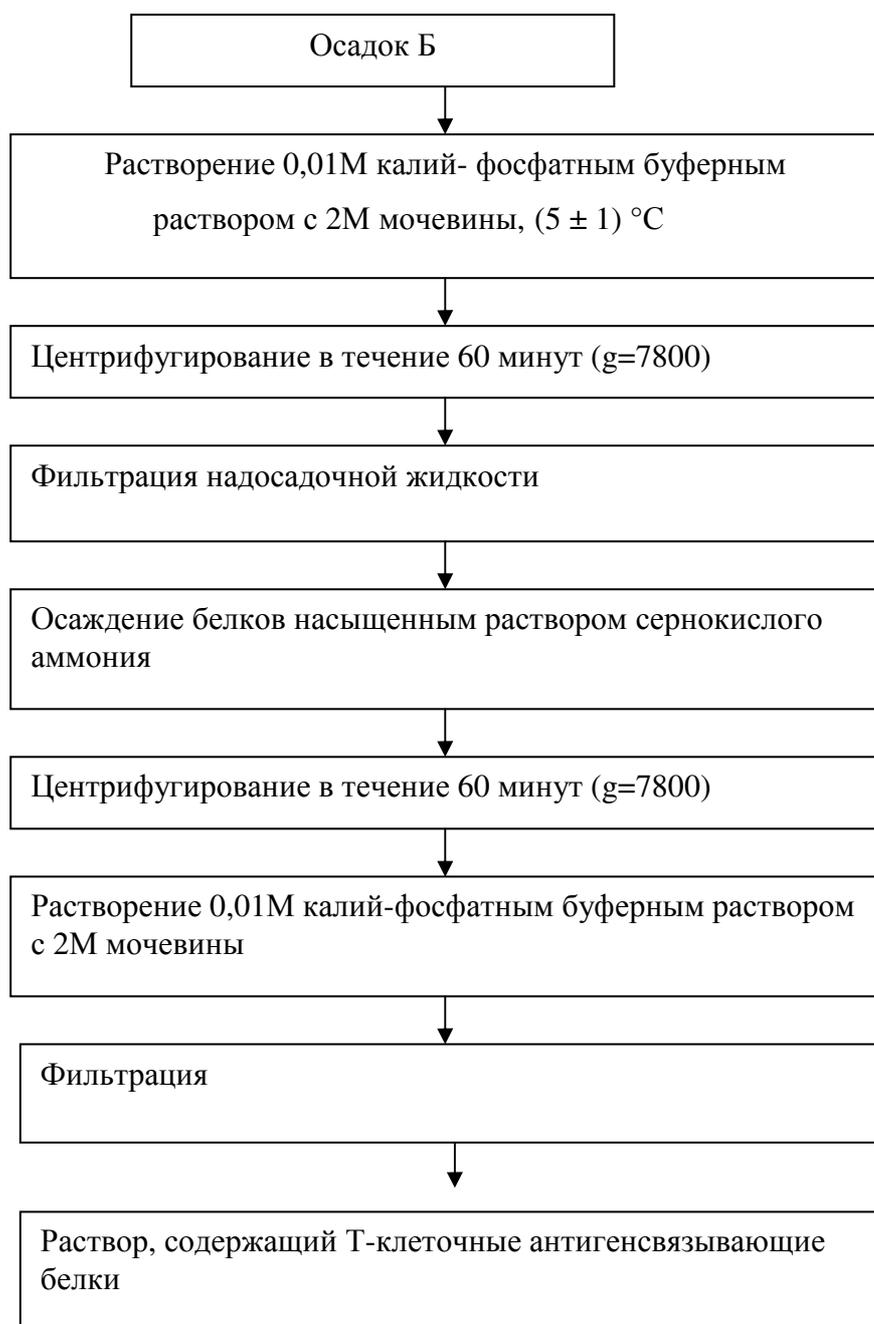
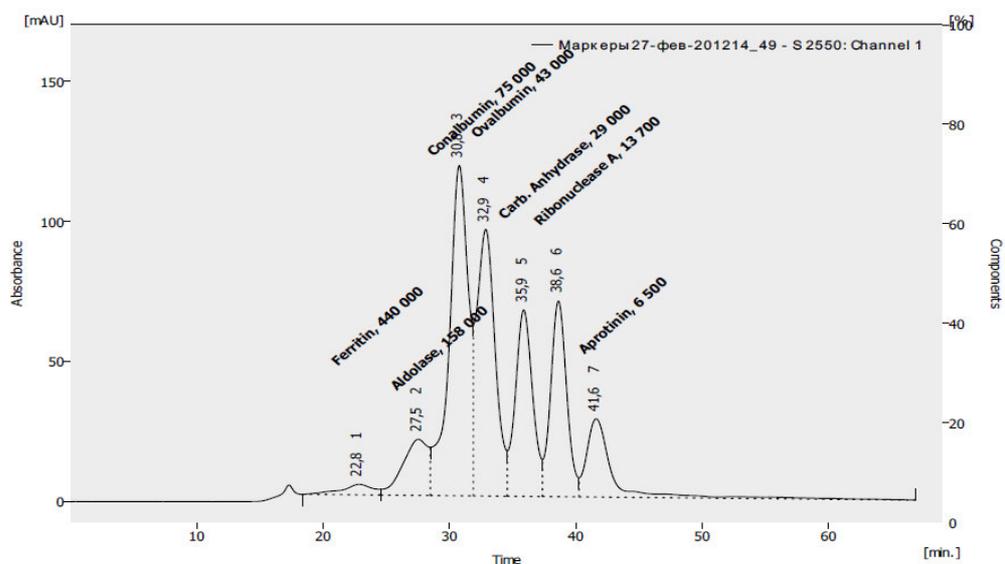


Рис. 2. Схема получения ТАБ из осадка Б

На рисунке (рис. 3) представлены хроматограммы раствора, содержащего ТАБ, и маркеров с различной молекулярной массой. Хроматография была проведена на колонке SuperDex 200 300/10 GL (скорость потока при хроматографии маркеров молекулярной массы – 0,45 мл/мин, при хроматографии раствора, содержащего ТАБ – 0,5 мл/мин).

1.



2.

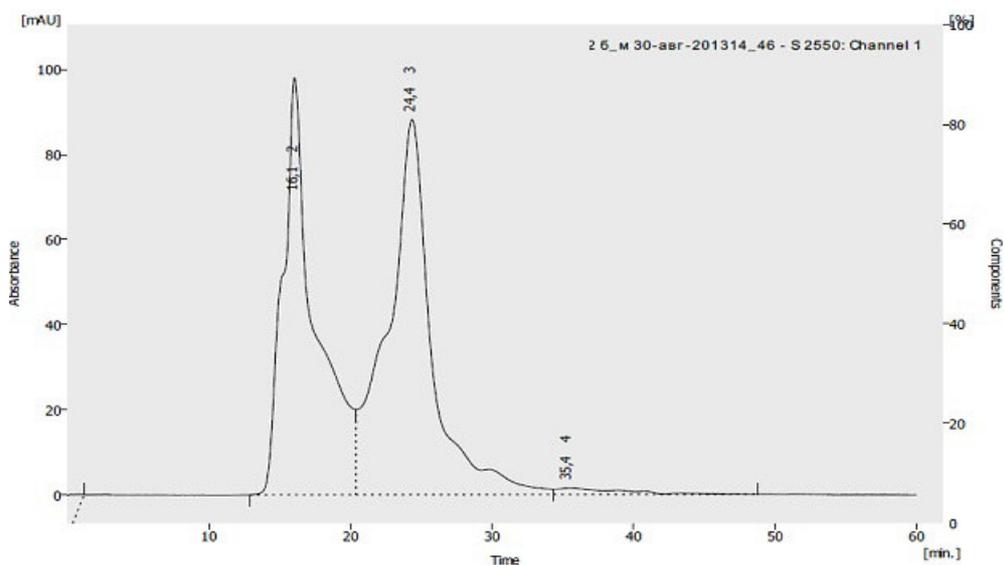


Рис. 3. Хроматограммы раствора содержащего ТАБ и маркеров молекулярного веса (1- хроматограмма маркеров молекулярного веса, 2- хроматограмма раствора, содержащего ТАБ)

Как видно из представленных на рисунке 3 данных, раствор, содержащий ТАБ, состоит в основном из белков молекулярной массы более 150 кДа и незначительного количества примесей с молекулярной массой от 5 до 150 кДа.

Следующий этап работы заключался в получении НАСЦ, которые являются продуктом дезагрегации некоторой части ТАБ.

3.2. Разработка способа выделения низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов из раствора ТАБ

Для выделения низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов (НАСЦ) из раствора, содержащего ТАБ, необходимо было разработать способ их дезагрегации.

В технологии получения «Аффинолейкина» для этой цели используется стадия криодезинтеграции лейкоцитарной массы: 6 – 8 циклов замораживания-оттаивания, которая позволяет не только разрушить лейкоциты, но и дезагрегировать белки. Исходя из этого, при разработке технологии получения противостафилококкового препарата этот метод был взят за основу. В предварительных экспериментах подбиралось оптимальное количество циклов замораживания-оттаивания. Для этого полученный раствор, содержащий ТАБ, подвергался замораживанию при минус (20 ± 1) °С и размораживанию при плюс (37 ± 1) °С. Для более полной дезагрегации в раствор ТАБ добавляли 1 мМ этилендиаминтетраацетата натрия и 10 мМ L-цистеина, процесс проводили при рН 2,4-2,6.

При отработке стадии дезагрегации через каждые два цикла замораживания-оттаивания брали пробы для анализа молекулярных масс белков в растворе. Отобранные пробы анализировали с помощью ВЭЖХ и электрофореза в полиакриламидном геле. Было установлено, что хроматографический профиль и результаты электрофоретического разделения белков не менялись после 15 циклов замораживания-оттаивания, поэтому мы выбрали такое количество циклов как оптимальное.

В дальнейшем мы включили стадию закисления криодезинтеграта, содержащего НАСЦ, с помощью CO_2 , который пропускали через полуфабрикат в течение 30 минут. Закисленный раствор оставляли на (18 ± 2) часа в герметичной емкости. Введение этой стадии способствовало сохранению молекул в дезагрегированном состоянии.

По данным ВЭЖХ, раствор, состоявший до криодезинтеграции из белков с молекулярной массой более 150 кДа, после 15 кратного замораживания-

оттаивания на 67 % был представлен низкомолекулярными белками (полипептидами) от 5 до 17 кДа (рис 4).

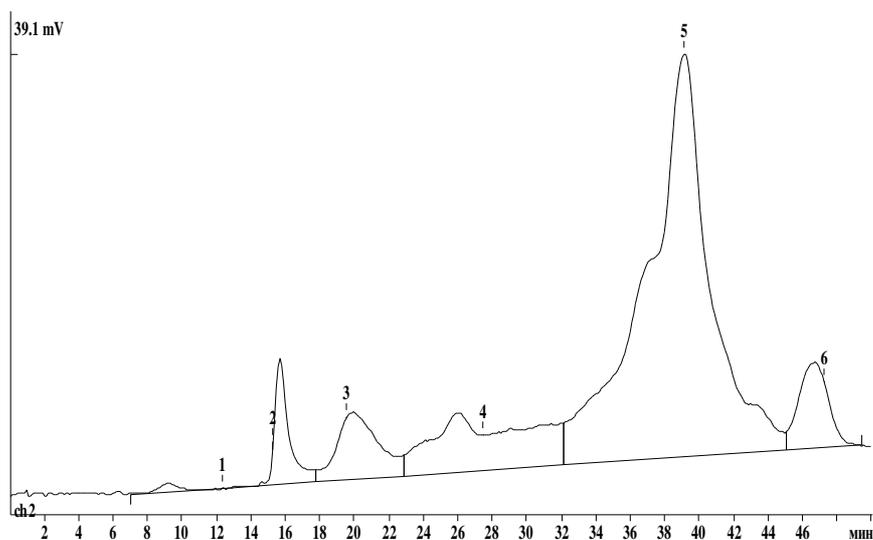


Рис. 4. ВЭЖХ раствора ТАБ после криодезинтеграции

Колонка Superdex 200 10/300. Элюция со скоростью 0,5 мл/мин, 0,15 М раствором хлорида натрия, забуференным (рН 7, 12) 0,05М фосфатами калия. Детекция при 280 нм.

Для выделения НАСЦ (от 5 до 10 кДа) из криодезинтеграта использовали метод дифференциальной ультрафильтрации в присутствии мочевины на мембранах фирмы Sartorius (Германия) с отсекающей способностью 30 кДа и 10 кДа.

После предварительной осветляющей фильтрации в полуфабрикат порциями (1:1 по объему) добавляли 2, 4, 6, 8 и 10 объемов 2 М раствора мочевины и проводили ультрафильтрацию на мембранных модулях сначала с ретенцией 30 кДа, собирая фильтрат. При помощи ВЭЖХ было установлено, что 8 объемов достаточно для полного перехода белков с молекулярной массой менее 30 кДа в пермеат.

Затем проводили ультрафильтрацию на модулях 10 кДа, добавляя 2М раствор мочевины в тех же пропорциях. Добавление 8 объемов было достаточно для полного перехода в пермеат белков с молекулярной массой менее 10 кДа.

Полученный пермеат диафильтровали против воды очищенной и концентрировали, собирая концентрат на кассетном модуле с ретенцией 5 кДа.

В ранее проведенных экспериментах нами было установлено, что выделение низкомолекулярной фракции ультрафильтрацией на модулях 30 кДа с последующим концентрированием и диафильтрацией на модулях с ретенцией 5 кДа приводило к получению препарата с более широким диапазоном молекулярных масс от 5 до 18 кДа.

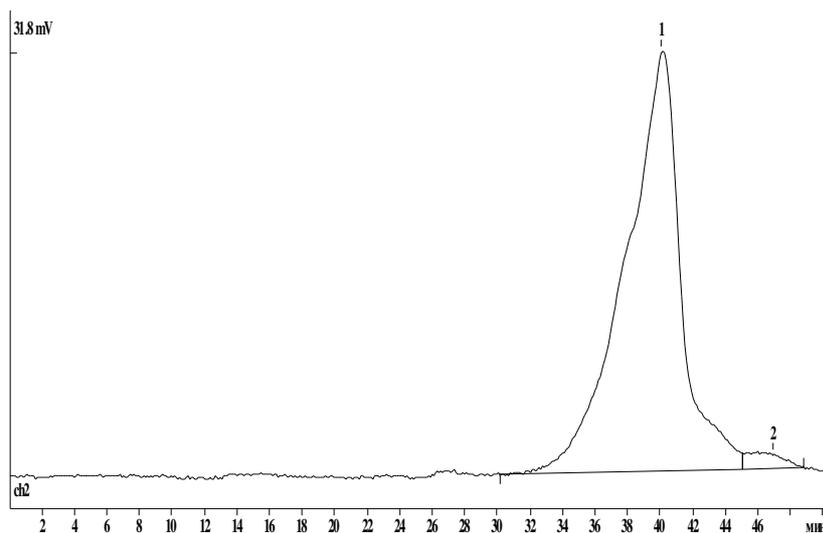


Рис. 5. ВЭЖХ препарата, полученного дифференциальной диафильтрацией на кассетных модулях с ретенцией 30 и 5 кДа фирмы Sartorius (Германия) из криодезинтеграта

На хроматограмме (рис. 5) видно, что 97% препарата представлено смесью низкомолекулярных белков с молекулярной массой от 5 до 18 кДа.

Однако, полученный препарат обладал пирогенными свойствами в тесте на кроликах, вероятно, вследствие примеси эндогенного пирогена (прекурсора интерлейкина 8 – с молекулярной массой 18 кДа).

Исходя из данного факта, в следующей серии экспериментов для достижения необходимой чистоты препарата (удаления веществ, обуславливающих пирогенные свойства) и его удовлетворительного выхода была отработана схема, включающая трехступенчатую мембранную ультра- и диафильтрацию:

I этап – ультрафильтрация криодезинтеграта на кассетном модуле с ретенцией 30 кДа;

II этап – ультрафильтрация пермеата 30 кДа на кассетном модуле с ретенцией 10 кДа;

III этап – концентрирование и диафильтрация пермеата на кассетном модуле с ретенцией 5 кДа.

Как оказалось, начинать фракционирование сразу со II этапа не представляется возможным из-за обилия гидрофобных примесей в полуфабрикате, которые вызывают поляризацию мембран с ретенцией 10 кДа.

Диафильтрация необходима для снижения концентрации мочевины до физиологической нормы (2,8 – 8,3 мкг/мл в крови) и удаления сульфатов. После отработки условий проведения диафильтрации содержание сульфатов варьировало от 0 до 0,02 мкг/мл, а мочевины от 3,8 до 4,3 мкг/мл, что соответствует физиологической норме для человека.

Таким образом, дополнительное включение в схему очистки ультрафильтрации на кассетном модуле с ретенцией 10 кДа позволило получить препарат НАСЦ (в дальнейшем «Стафилолейкин») с молекулярной массой 5 – 8 кДа, не обладающий пирогенными свойствами.

На рисунке 6 представлен хроматографический профиль «Стафилолейкина», представляющий собой высокий четко выраженный пик, соответствующий молекулярной массе менее 10 кДа.

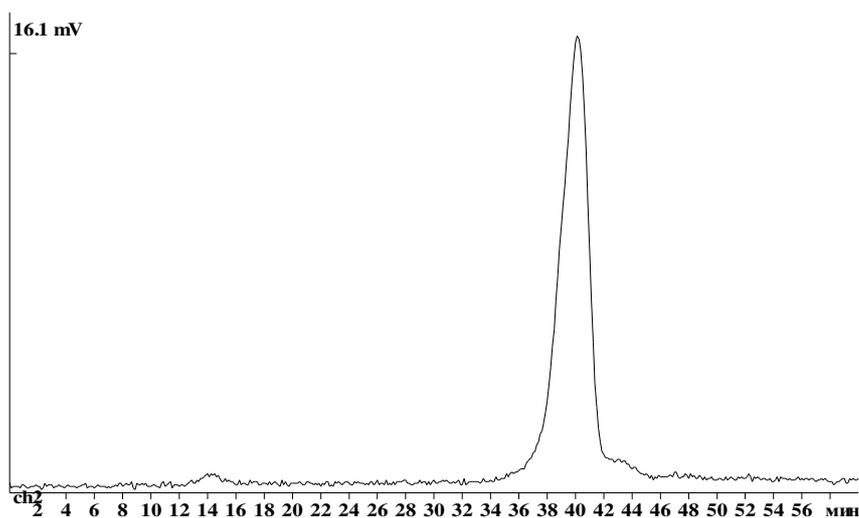


Рис. 6. ВЭЖХ готового препарата «Стафилолейкин», полученного дифференциальной ультрафильтрацией на касетных модулях с ретенцией 30, 10 и 5 кД фирмы Sartorius (Германия) из криодезинтеграта ТАБ

В результате проведенных исследований была разработана схема получения низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов, включающая следующие этапы: растворение осадка Б и получение раствора, содержащего Т-клеточные антигенсвязывающие белки, добавление диссоциирующих реагентов, осветляющая фильтрация и микрофильтрация, криодезинтеграция ТАБ, стабилизация криодезинтеграта насыщением CO_2 , трехступенчатая ультра-, диафильтрация и стерилизующая фильтрация.

3.3. Разработка состава и технологии лекарственной формы препарата

Одной из основных задач при разработке технологии препаратов является получение стабильной лекарственной формы. В связи с этим было проведено изучение стабильности экспериментальных серий жидкой формы препарата «Стафилолейкин». Образцы препарата НАСЦ хранили при температурах $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ и при $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$. В проводимых экспериментах «Стафилолейкин» оценивали по следующим показателям: подлинность, цветность, специфическая активность и молекулярные параметры. Как видно из представленных данных (таб. 3, 4, 5) при хранении в жидком виде максимальный срок годности препарата составил не более 6 месяцев.

Известно, что в биофармацевтическом производстве лиофилизация является технологическим приемом, обеспечивающим получение стабильных

лекарственных форм препаратов. В связи с этим были проведены эксперименты по стабилизации «Стафилолейкина» с помощью сублимационного высушивания.

Обязательным условием для проведения лиофилизации с максимальным сохранением биологической активности препарата является выбор оптимальной температуры замораживания, что определяется эвтектическими параметрами стабилизируемой субстанции «Стафилолейкина».

Таблица 3

Результаты хранения экспериментальных серий «Стафилолейкина» при температуре $(6\pm 2)^\circ\text{C}$ в жидкой форме

Время хранения (сутки)	Исследуемые показатели											
	Подлинность (max поглощения, нм)			Цветность			Специфическая активность			Молекулярные показатели		
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3
0	205,8	205,7	205,8	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
7	206,9	207,8	205,9	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
14	207,6	206,9	205,9	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
21	206,8	206,9	206,9	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
28	207,4	206,5	205,9	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
6 мес.	205,9	207,6	207,4	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
8 мес.	205,9	207,6	207,4	Выдерживает сравнение с эталоном I			0,5 ед.	0,45 ед.	0,5 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД

Таблица 4

Результаты хранения экспериментальных серий «Стафилолейкина» при температуре $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$ в жидкой форме

Время хранения (сутки)	Исследуемые показатели											
	Подлинность (max поглощения, нм)			Цветность			Специфическая активность			Молекулярные показатели		
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3
0	205,7	205,7	205,6	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
7	206,1	207,1	205,7	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
14	207,3	206,1	205,7	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
21	206,5	206,2	206,2	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
28	207,0	206,5	205,8	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
6 мес.	205,8	207,5	207,1	Выдерживает сравнение с эталоном I			0 ед.	0,15 ед.	0,13 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД

Таблица 5

Результаты хранения экспериментальных серий «Стафилолейкина» при температуре $(37\pm 2)^\circ\text{C}$ в жидкой форме

Время хранения (сутки)	Исследуемые показатели											
	Подлинность (max поглощения, нм)			Цветность			Специфическая активность			Молекулярные показатели		
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3
0	207,6	207,3	205,9	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
7	205,8	205,8	207,1	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
14	206,9	207,1	207,1	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
21	206,7	206,6	206,6	Выдерживает сравнение с эталоном I			0,4 ед.	0,3 ед.	0,5 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД
6 мес.	205,9	206,8	206,8	Выдерживает сравнение с эталоном I			0,1 ед.	0 ед.	0 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД

В качестве технологического прототипа мы использовали коммерческий препарат «Аффинолейкин».

Эвтектические температуры обоих препаратов оказались достаточно близкими (Аффинолейкин: минус 19 °С, Стафилолейкин: минус 18 °С, поэтому для лиофилизации «Стафилолейкина» мы ориентировались на режимы замораживания и высушивания препарата – аналога.

Розлив препарата осуществляли в ампулы ШП-2 (емкостью 2 см³) по 0,2 мл, высота столба жидкости составляла (3±1) мм, что можно считать адекватным параметром для проведения высушивания. Учитывая технические возможности сублимационной установки и температуру полного замерзания раствора препарата все этапы лиофилизации было решено выполнять в одном аппарате без привлечения дополнительного низкотемпературного оборудования. Такой подход позволяет использовать конечную температуру замораживания всего на 1-2 градуса ниже эвтектической и исключить отепление препарата, возможное при его переносе из низкотемпературной камеры в сублиматор.

При высушивании субстанции без ксеропротекторов наблюдалась полная потеря специфической активности, а лиофилизированный материал был «размазан» по дну флакона вследствие малого содержания сухого остатка.

При подборе вспомогательных компонентов для лиофилизации были использованы следующие протекторы: глицин, мальтоза и сахароза. Для выбора оптимального варианта апробированы композиции, содержащие данные вещества в различных концентрациях (таб. 6).

Таблица 6

Варианты составов композиций, используемых в качестве ксеропротекторов

Композиция № 1 (глицин/сахароза)				Композиция № 2 (глицин/мальтоза)			
Концентрация сахарозы, %	Концентрация глицина, %	Эвтектическая температура а °С	Таблетка	Концентрация мальтозы, %	Концентрация глицина, %	Эвтектическая температура а °С	Таблетка
1	0,5	-19,5	+/-	1	0,5	-19,8	+/-
2	0,5	-20,4	+	2	0,5	-21,5	+
2	3,0	-23,5	+	2	3,0	-25,1	+
4	0,5	-21,7	+	4	0,5	-22,8	+
4	3,0	-24,2	+	4	3,0	-25,4	+
6	0,5	-22,1	+	6	0,5	-25,3	+
6	3,0	-25,9	+	6	3,0	-26,1	+
8	0,5	-23,4	+	8	0,5	26,4	+
8	3,0	-26,5	+	8	3,0	27,2	+

По результатам исследования (таб. 6) было выбрано два перспективных состава защитной среды:

Композиция № 1: сахароза 2% +глицин 0,5%;

Композиция № 2: мальтоза 2% + глицин 0,5%.

В ходе отработки режима замораживания «Стафилолейкина» было показано, что для полного перехода жидкого препарата в твердое состояние в условиях сверхмедленного охлаждения (менее 1 °С/мин) достаточно 4-часовой экспозиции с последующей 2-часовой выдержкой (закаливанием) при конечной температуре полок сублиматора на уровне не выше минус (25±5) °С.

Далее мы оценивали роль температурного градиента загруженного препарата и полок, а так же полок в начале и конце замораживания. Учет данных факторов

позволил значительно снизить структурно-цветовую неоднородность продукции. Достичь этого удалось, устанавливая начальную температуру полок на уровне не ниже минус 15 °С с постепенным ее понижением до минус (25 ±5)°С со скоростью порядка (7,5 ±2,0) °С/ч после загрузки ампул с разлитым препаратом. При таком режиме замораживания жидкий препарат переходит в минусовую температурную зону не позднее 3 ч от начала процесса, а к 4 ч достигает температуры полок.

Особенностью высушивания данного препарата является небольшая высота замороженного слоя и относительно большая площадь десорбции, что при интенсивном испарении может вызывать разрушение сформированной в процессе замораживания «таблетки». Для нивелирования негативного влияния процесса активного пароудаления были апробированы варианты с различной интенсивностью нагрева полок.

Изначально этап сублимации осуществлялся без подогрева продукта в течение 15 ч. Несмотря на небольшой объем наполнения и незначительную высоту замороженного слоя скорость испарения воды была очень низкой и даже за 15 ч. не обеспечивала полное завершение сублимации, что в дальнейшем приводило к интенсивной десорбции льда при досушивании препарата и вызывало нарушение макроструктуры лиофилизата.

В дальнейшем нами было испытано проведение основного этапа высушивания при температуре нагрева полок до плюс (14±3) °С в течение (4±2) ч, что позволило максимально сократить процесс удаления воды без негативного влияния на физические и биологические свойства препарата, его внешний вид. Досушивание проводили при нагреве полок (5 °С/ч) до конечной температуры (35±4) °С и выдержкой продукта в плюсовом диапазоне температур не менее 15 ч, что в результате позволило получить препарат с необходимой остаточной влажностью (не более 2 %). Оптимизированные режимы замораживания и сублимации препарата представлены на рисунках 7 и 8

В ходе дальнейших исследований были получены образцы лиофилизированного препарата с использованием выбранных протекторов, которые контролировались по следующим показателям: описание, подлинность, растворимость, цветность, специфическая активность. Результаты приведены в таблицах 7, 8, 9.

Результаты хранения образцов «Стафилолейкина» при температуре (6±2)°С

Время хранения (сутки)	Исследуемые показатели														
	Подлинность (max поглщения, нм)			Цветность			Специфическая активность			Молекулярные параметры			Растворимость, секундах		
	Препарат Стафилолейкин, высушенный в присутствии 2% сахарозы и 0,5% глицина														
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3
0	206,6	207,1	206,2	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,1	1,1
14	207,1	206,4	207,1	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,2
30	206,6	205,9	207,0	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,0	1,0	1,0
6 мес.	206,2	205,6	207,0	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,0	1,0
12 мес.	205,8	206,6	206,9	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,0
24 мес.	206,2	205,6	207,0	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,0	1,0
36 мес.	205,8	206,6	206,9	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,0
Препарат Стафилолейкин, высушенный в присутствии 2% мальтозы и 0,5% глицина															
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3
0	206,6	207,0	207,1	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,1	1,1
14	206,8	205,9	205,9	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,2	1,2
30	206,4	207,0	207,1	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,0	1,0	1,0
6 мес.	206,7	206,7	205,9	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,0	1,0
12 мес.	205,9	206,2	207,0	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,0
24 мес.	206,2	205,6	207,0	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1 с	1,0 с	1,0 с
36 мес.	205,8	206,6	206,9	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2 с	1,0 с	1,0 с

Таблица 8

Результаты хранения образцов «Стафилолейкина» при температуре (20±2)°С

Время хранения (сутки)	Исследуемые показатели														
	Подлинность (max поглощения, нм)			Цветность			Специфическая активность			Молекулярные параметры			Растворимость, секундах		
	Препарат Стафилолейкин, высушенный в присутствии 2% сахарозы и 0,5% глицина														
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3
0	206,6	207,1	206,2	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,1	1,1
14	207,1	206,4	207,1	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,2
30	206,6	205,9	207,0	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,0	1,0	1,0
6 мес.	206,2	205,6	207,0	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,0	1,0
12 мес.	205,8	206,6	206,9	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,0
24 мес.	206,2	205,6	207,0	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	0,5 ед.	0,5 ед.	0,5 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,0	1,0
36 мес.	205,8	206,6	206,9	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	0,1 ед.	0 ед.	0,3 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,0
Препарат Стафилолейкин, высушенный в присутствии 2% мальтозы и 0,5% глицина															
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3
0	206,6	207,0	207,1	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,1	1,1
14	206,8	205,9	205,9	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,2	1,2
30	206,4	207,0	207,1	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,0	1,0	1,0
6 мес.	206,7	206,7	205,9	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,0	1,0
12 мес.	205,9	206,2	207,0	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,0
24 мес.	206,2	205,6	207,0	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	0,5 ед.	0,5 ед.	0,4 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,0	1,0
36 мес.	205,8	206,6	206,9	Выдерживает эталоном I	сравнение	с	0 ед.	0 ед.	0,2 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,0

Таблица 9

Результаты хранения образцов «Стафилолейкина» при температуре (37±2)°С

Время хранения (сутки)	Исследуемые показатели														
	Подлинность (max поглощения, нм)			Цветность			Специфическая активность			Молекулярные параметры			Растворимость, секундах		
	Препарат Стафилолейкин, высушенный в присутствии 2% сахарозы и 0,5% глицина														
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3
0	206,6	207,1	206,2	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,1	1,1
14	207,1	206,4	207,1	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,2
30	206,6	205,9	207,0	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,0	1,0	1,0
6 мес.	206,2	205,6	207,0	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,0	1,0
12 мес.	205,8	206,6	206,9	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,0
24 мес.	206,2	205,6	207,0	Выдерживает сравнение с эталоном I			0,3 ед.	0,5 ед.	0,3 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,0	1,0
36 мес.	205,8	206,6	206,9	Выдерживает сравнение с эталоном I			0 ед.	0 ед.	0 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,0
Препарат Стафилолейкин, высушенный в присутствии 2% мальтозы и 0,5% глицина															
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 1	Серия 2	Серия 3
0	206,6	207,0	207,1	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,1	1,1
14	206,8	205,9	205,9	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,2	1,2
30	206,4	207,0	207,1	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,0	1,0	1,0
6 мес.	206,7	206,7	205,9	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,0	1,0
12 мес.	205,9	206,2	207,0	Выдерживает сравнение с эталоном I			1 ед.	1 ед.	1 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,0
24 мес.	206,2	205,6	207,0	Выдерживает сравнение с эталоном I			0,3 ед.	0,4 ед.	0,5 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,1	1,0	1,0
36 мес.	205,8	206,6	206,9	Выдерживает сравнение с эталоном I			0,2 ед.	0,2 ед.	0 ед.	5-8кД	5-8кД	5-8кД	1,2	1,0	1,0

Диаграмма режима замораживания препарата «Стафилолейкина»

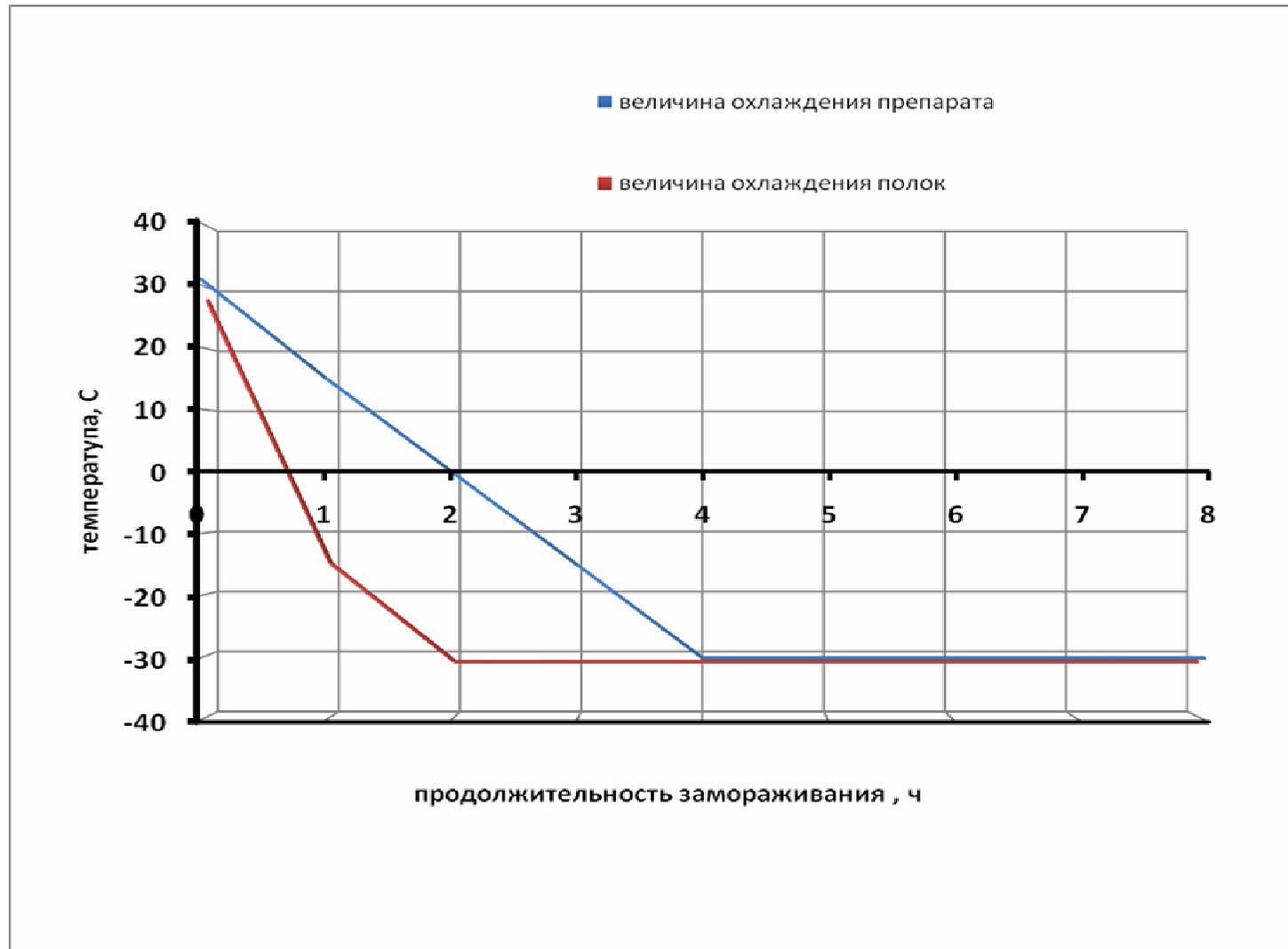


Рис. 7 Замораживание препарата «Стафилолейкин»

Диаграмма режима сублимационного высушивания препарата «Стафилолейкина»

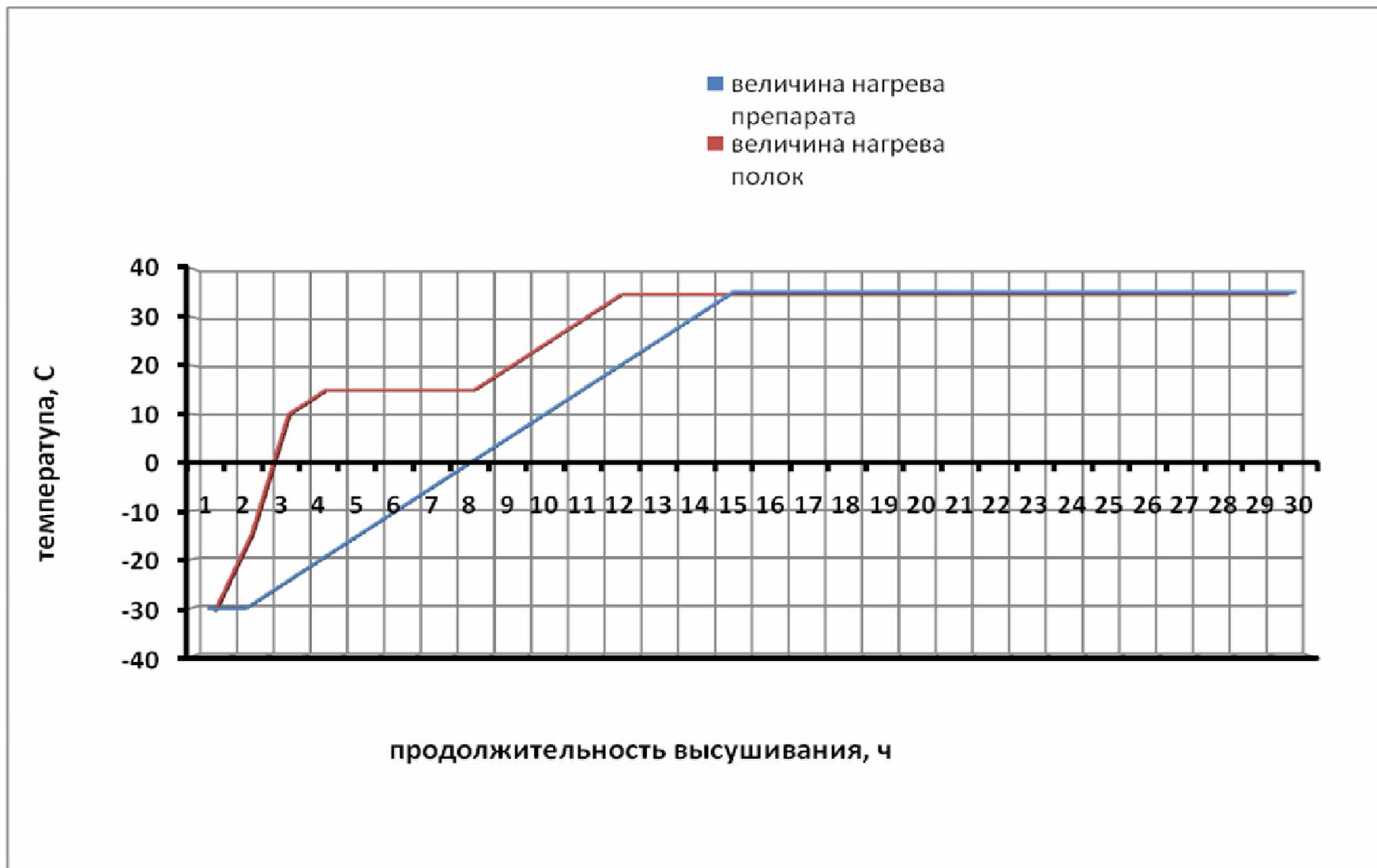


Рис. 8. Сублимационное высушивание препарата «Стафилолейкин»

Таким образом, на основании идентичности полученных образцов по физико-химическим и биологическим показателям в качестве ксеропротектора была выбрана композиция, содержащая глицин (0,5%) и сахарозу (2%), так как использование данного углевода по сравнению с мальтозой экономически более целесообразно. Разработанный режим сублимации и выбранная концентрация и состав ксеропротектора обеспечивают необходимую остаточную влажность препарата (не более 2 %) и его стабильность в течение 36 месяцев при температуре хранения (6 ± 2) °С.

В итоге проведенных исследований разработана технология получения противостафилококкового препарат «Стафилолейкин», технологическая схема которой приведена на рисунке 9.

Особенностями разработанной технологии являются:

- Источником цитокинов для данного препарата служит плазма крови доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином. В качестве сырья используется осадок Б – отход производства противостафилококкового иммуноглобулина человека. На этом этапе решены проблемы растворения осадка путем использования оптимальной концентрации мочевины в растворяющем буфере и выделение из раствора белковой фракции методом осаждения сернокислым аммонием.

- Стадия криодезинтеграции белков до низкомолекулярных пептидов (ММ 5-8 кДа) проводится в присутствии ЭДТА и L-цистеина. Было определено количество циклов замораживания-оттаивания. Процесс дезагрегации белков контролируют с помощью определения молекулярных параметров методом ВЭЖХ.

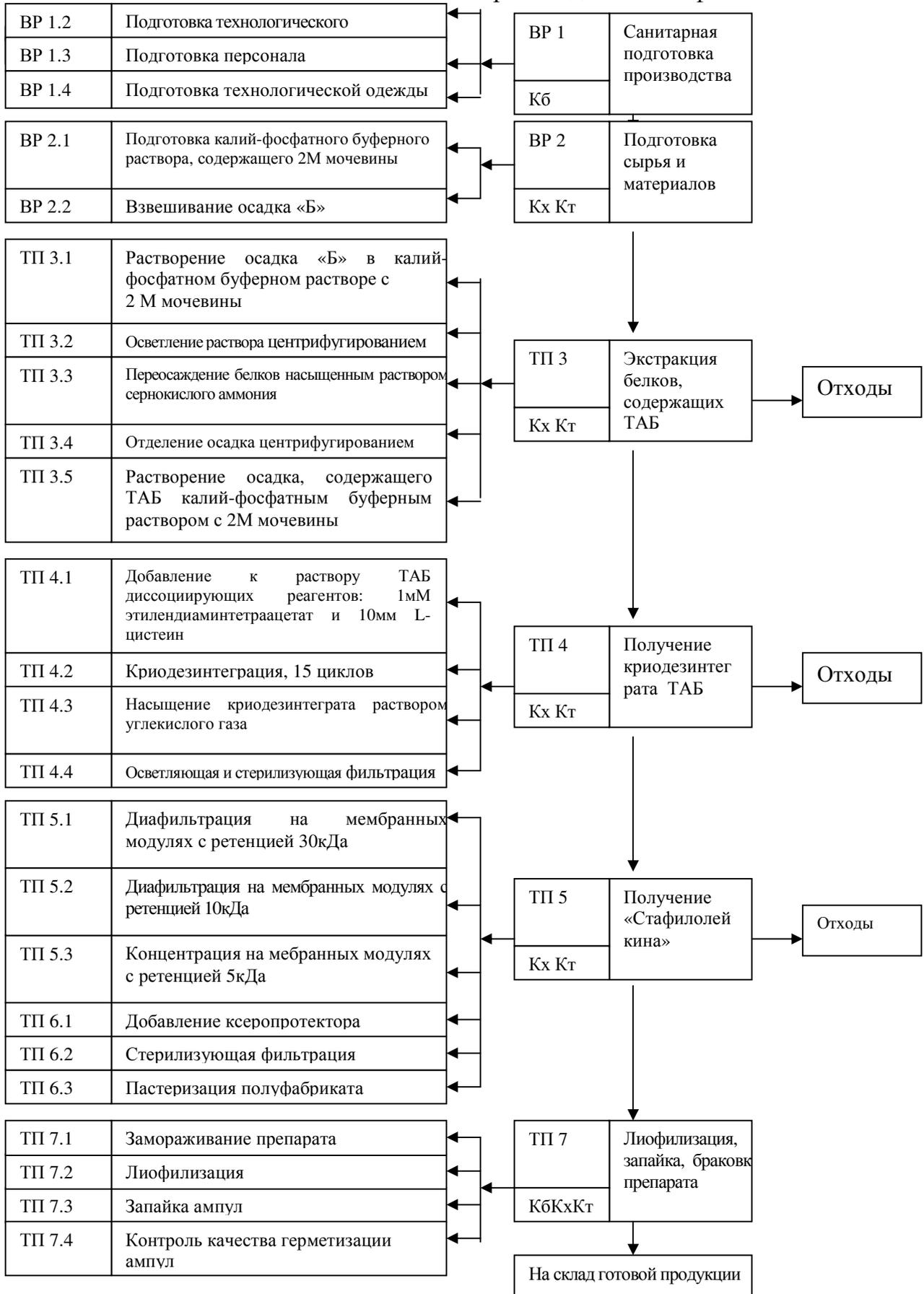
- Стадия ступенчатой ультрафильтрации проводится сначала на модуле с ретенцией 30 кДа, а затем на модуле с ретенцией 10 кДа. На данном этапе была решена проблема налипания белков и липидов на мембрану с ретенцией 10 кДа введением этапа ультрафильтрации с использованием мембраны с ретенцией 30 кДа.

По разработанной технологии были получены 4 серии препарата «Стафилолейкин», который представляет собой комплекс низкомолекулярных (5 – 8

кДа) белков (цитокинов). В готовом препарате отсутствовал этанол, содержание мочевины не превышало физиологической нормы для человека (660 мг/л в сыворотке крови здоровых взрослых людей).

Технологическая схема производства «Стафилолейкина» представлена на рисунке 9.

Технологическая схема производства «Стафилолейкина»



3.4. Обоснование методов контроля и стандартизация препарата «Стафилолейкин»

Для обоснования методов контроля «Стафилолейкина» нами проведен сравнительный анализ технологии этого препарата с технологией коммерческого аналога - препарата «Аффинолейкин», который производится Пермским НПО «Биомед» и имеет многолетний положительный опыт применения.

Основным отличием технологий «Аффинолейкина» и «Стафилолейкина» является исходное сырье. «Аффинолейкин» производится из «отработанных» донорских лейкоцитов, полученных при производстве препарата природного α -интерферона. Лейкоциты отделяются от других форменных элементов крови и плазмы, затем они индуцируются вирусом Сендай для выработки интерферона. После отделения «отработанных» лейкоцитов от интерферонсодержащей жидкости лейкоциты используются в качестве сырья для получения «Аффинолейкина». Сырьем для «Стафилолейкина» является содержащий α -глобулины осадок Б, который образуется в процессе фракционирования плазмы крови доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином.

В технологии «Аффинолейкина» имеется этап длительной (4 – 7 суток) кислой экстракции лейкоцитарных мембран в HCl-глициновом буферном растворе и 6 – 8 циклов замораживания-оттаивания для полного разрушения мембран, тогда как в технологии «Стафилолейкина» проводится процесс растворения белков, при котором используют 0,01М КФБ, содержащий 2М мочевины, с рН (7,3 ± 0,1). Для дезагрегации агрегатов в технологию включен процесс криодезинтеграции, который проводили в присутствии мочевины, ЭДТА и L-цистеина путем замораживания-оттаивания (не менее 15 циклов), затем для предотвращения процесса агрегации белков дополнительно проводится насыщение раствора углекислым газом (CO₂).

Далее в обоих процессах для выделения низкомолекулярных цитокинов используется ультра- и диафильтрация. При получении «Аффинолейкина» процесс происходит в два этапа: I этап – ультрафильтрация на модуле с ретенцией 10 кДа; II

этап – концентрирование и диафильтрация на модулях 5 кДа. При получении «Стафилолейкина» процесс происходит в три этапа: I этап – ультрафильтрация на модуле с ретенцией 30 кДа; II этап – ультрафильтрация на модуле с ретенцией 10 кДа и III этап – концентрирование и диафильтрация на модуле с ретенцией 5 кДа.

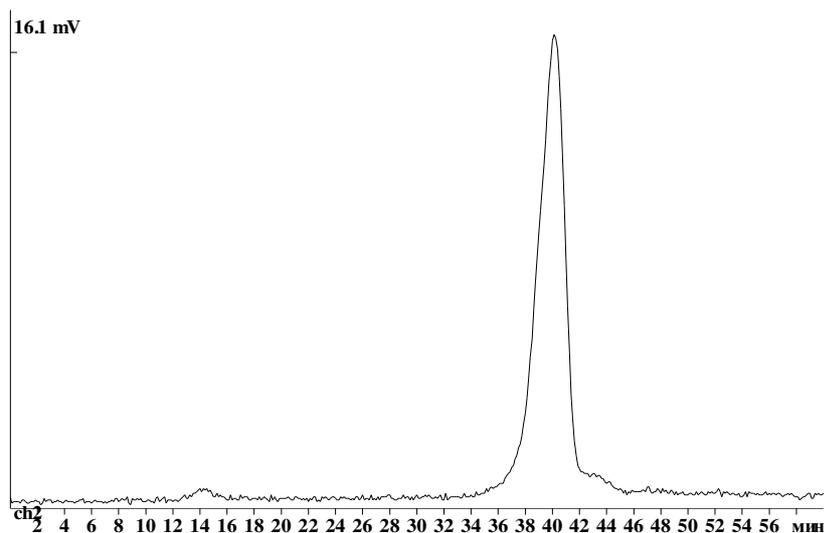


Рис. 10. Результаты ВЭЖХ готового препарата «Стафилолейкин», полученного дифференциальной ультра- и диафильтрацией на кассетных модулях с ретенцией 30, 10 и 5 кДа фирмы Sartorius (Германия).

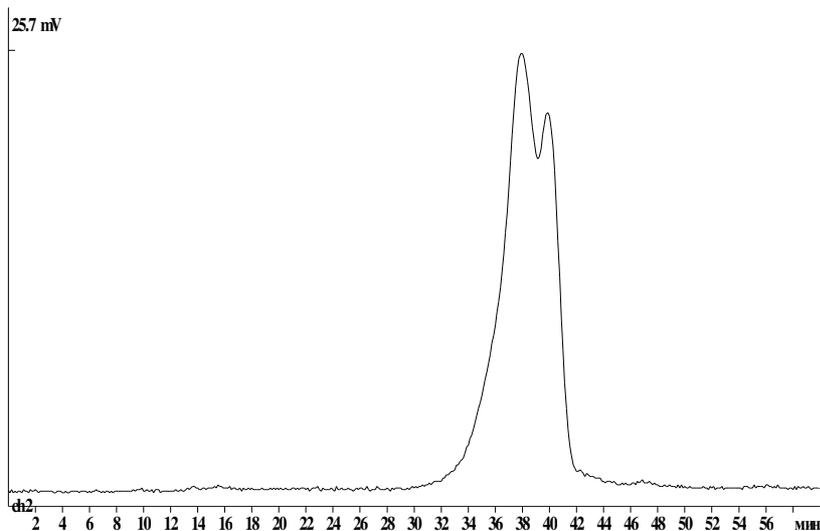


Рис. 11. Результаты ВЭЖХ коммерческого препарата «Аффинолейкин», полученного дифференциальной ультрафильтрацией на кассетных модулях с ретенцией 10 и 5 кДа фирмы Sartorius (Германия).

Следующие стадии технологического процесса (добавление стабилизатора, пастеризация, розлив, лиофилизация, маркировка и упаковка) аналогичны для обоих препаратов.

Таким образом, при существенных различиях в сравниваемых технологиях присутствуют аналогичные стадии.

При сравнении хроматографических профилей видно, что по молекулярным параметрам «Стафилолейкин» подобен «Аффинолейкину» (рис. 10,11).

Необходимо отметить, что на хроматограмме «Аффинолейкина» выявляется два пика, в то время как «Стафилолейкин» гомогенен. Данный факт подтверждается и результатами электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 12, 13).

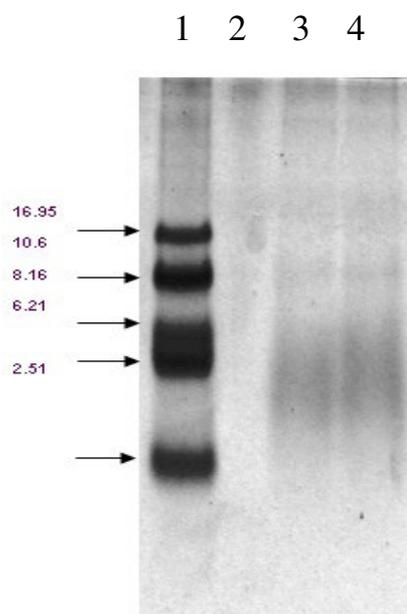


Рис. 12. Электрофорез коммерческого препарата по R.Swank & K.Munkers. Дорожки слева направо: (1) калибранты с указанием ММ; (3 – 4) «Аффинолейкин»

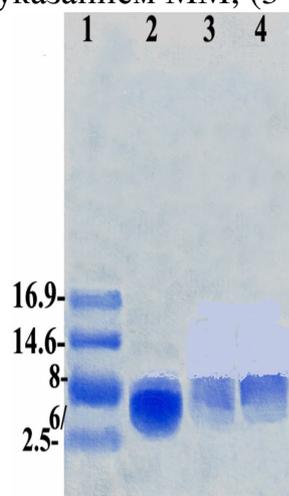


Рис. 13. Электрофорез готового препарата «Стафилолейкин» в полиакриламидном геле. Tricine–SDS-PAGE по Н. Schägger'у [214]. (1) Калибранты с отметкой ММ в кДа; (2) Бычий инсулин 5,7 кДа; (3 и 4) разные серии препарата «Стафилолейкин»

Выполненные сравнительные исследования показали, что новый препарат «Стафилолейкин» по своим характеристикам подобен коммерческому препарату «Аффинолейкин» и представляет собой полипептиды с молекулярной массой 5-8 кДа. Поэтому оценку физико-химических и иммунобиологических свойств нового препарата проводили по следующим регламентированным показателям качества для препарата «Аффинолейкин»: описание, подлинность, растворимость, прозрачность, цветность, механические включения, потеря в массе при высушивании, белок, стерильность, пирогенность, провоспалительная и миелостимулирующая активность, специфическая активность (ФСП 42-0504-7814-06).

Таблица 10

Сравнительная характеристика препаратов

Показатель	«Аффинолейкин»				«Стафилолейкин»			
	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 4	Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 4
	Значения							
Описание	аморфная масса белого цвета				аморфная масса белого цвета			
Подлинность (УФ спектр, максимум поглощения) (нм)	205,9	210,0	205,9	210	206,1	208,3	208,6	209,5
Растворимость (сек.)	1	5	5	5	3	4	4	4
Прозрачность	выдерживает сравнение с эталоном 1				выдерживает сравнение с эталоном 1			
Цветность (ое)	0,006	0,02	0,022	0,016	0,015	0,012	0,018	0,015
Механические включения РД 42-501-98	Выдерживает требования				Выдерживает требования			
рН	7,0	7,3	7,29	7,03	6,8	6,5	7,05	7,1
Потеря в массе при высушивании (%) МУК 4.1/4.2.588-96	0,5	0,2	0,5	1,3	0,5	0,2	0,3	0,5
Белок (мг/мл)	0,050	0,044	0,050	0,048	0,044	0,041	0,048	0,045
Стерильность	стерилен				стерилен			
Пирогенность*	апирогенен				апирогенен			
Провоспалительная активность*	отсутствует				отсутствует			
Миелостимулирующая активность*	менее 2				менее 2			
Специфическая	1	1	1	1	1	1	1	1

активность (ед.)*								
-------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

*описано в гл. 4

Сравнительная характеристика «Стафилолейкина» и «Аффинолейкина» по показателям качества приведена в таблице 10.

Результаты оценки качества разработанного препарата «Стафилолейкин» показали, что препарат представляет собой аморфную массу белого цвета, быстро растворимую в 0,9 % растворе натрия хлорида, образующую прозрачный, бесцветный раствор с максимальным поглощением при (205 ± 5) нм, которое снижается при (240 ± 5) нм, со слабым дополнительным поглощением в области 260 – 290 нм и малой величиной соотношения ОП 260/280. При контроле по показателю «цветность» препарат «Стафилолейкин» в изотоническом растворе натрия хлорида, содержащий одну единицу активности, имеет оптическую плотность при длине 400 нм (E_{400}) не более 0,09, Спектрофотометрические характеристики «Стафилолейкина» подобны «Аффинолейкину» и типичны для низкомолекулярных белков без примесей метаболитов нуклеиновых кислот. По аналогии с коммерческим препаратом «Аффинолейкин» оценку специфической активности проводили на мышах с помощью реакции конгломерации лейкоцитов. Доза «Стафилолейкина», дающая «индекс переноса», равный 100 (D_{100}), не должна превышать 50 мкг/мышь, условно эта величина принята за 1 единицу. Концентрация белка в исследованных образцах варьировала от 40 до 50 мкг/мл. Значения осмомолярности полученных серий препарата находились в диапазоне 362-370 mOsmo/л, что соответствует физиологической норме.

Таким образом, разработанная технология обеспечивает получение стерильного, апиrogenного, не обладающего миелостимулирующей и провоспалительной активностью инъекционного противостафилококкового препарата, что позволило составить проект ФСП, в котором определены требования к готовому препарату (табл. 11).

Спецификация
на препарат «Стафилолейкин» из проекта ФСП

Показатель	Значение
Описание	Аморфная масса белого цвета
Подлинность	УФ-спектр раствора препарата в 0,9% растворе натрия хлорида должен иметь максимум поглощения в диапазоне 205-240 нм со слабым дополнительным поглощением в области 260-290 нм
Растворимость	Полностью растворяется в 1 мл 0,9% натрия хлорида в течение не более 15 сек.
Прозрачность	Раствор препарата, содержащий 1 ед. Стафилолейкина в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида, выдерживает сравнение с эталоном 1
Цветность	Раствор препарата, содержащий 1 ед. Стафилолейкина в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида, должен иметь оптическую плотность при длине волны 400 нм не более 0,09
Механические включения	Препарат должен выдерживать требования «Инструкции по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств» (РД 42-501-98)
рН раствора	От 6,3 до 7,3
Потеря в массе при высушивании	Не более 2%
Белок	Не более 0,15 мг белка в 1 мл раствора, содержащего 1 единицу «Стафилолейкина»
Стерильность	Препарат должен быть стерильным
Провоспалительная активность	Не должен вызывать местной воспалительной реакции и увеличения регионарных лимфоузлов при подкожной инъекции
Миелостимулирующая активность	Не должен вызывать активации лейкопоза (показатель миелостимулирующей активности не более 2)
Пирогенность	Препарат должен быть апиrogenным
Специфическая активность	Доза «Стафилолейкина», дающая «индекс переноса» равный 100 (D_{100}), должна быть меньше или равна 1 ед. (Если D_{100} препарата, номинально содержащего в ампуле 1 или 2 ед. препарата, превысит 1 ед., но будет менее 2 ед., то он может быть маркирован как содержащий в ампуле соответственно 0,5 или 1 ед.)

В результате проведенных исследований нами разработана оригинальная технология получения препарата низкомолекулярных цитокинов из отходов

серийного производства противостафилококкового иммуноглобулина, обоснованы методы контроля и доказана его стабильность при длительном хранении.

Следует отметить, что используя в качестве сырья осадок Б, полученный из плазмы крови доноров, иммунизированных против других инфекций, например, дифтерии, клещевого энцефалита, гепатита В и др, возможно получение по разработанной технологии препаратов антигенспецифичных цитокинов соответствующей направленности.

ГЛАВА 4. ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТА «СТАФИЛОЛЕЙКИН»

Исследования разработанного препарата проводились на базах НИИ вакцин и сывороток им И.И. Мечникова РАМН и Пермского НПО «Биомед».

4.1. Изучение влияния препарата «Стафилолейкин» на формирование противостафилококкового клеточного иммунитета.

Оценку влияния «Стафилолейкина» на формирование специфического клеточного иммунитета определяли в опытах *in vivo* методами переноса ГЗТ, выявляемого по оценке кожной пробы и по регистрации переноса ГЗТ с использованием антигензависимой реакции конгломерации лейкоцитов, которая рассматривается как аналог реакции торможения миграции лейкоцитов крови – классического теста оценки клеточного иммунитета.

4.1.1. Перенос ГЗТ, регистрируемый по кожным пробам со стафилококковым белком А (СБА), адсорбированным на алюмо-калиевых квасцах

Оценивая активность «Стафилолейкина» с помощью переноса ГЗТ, регистрируемого по кожным пробам, эксперименты проводили на мышах BALB/c (самцы весом (24 ± 2) г) по методике Brummer E. et al., модифицированной А.Н. Мацем [1, 13]. «Стафилолейкин» вводили интраплантарно в четыре лапки в объёме 50 мкл. Предварительно определенная оптимальная доза составила 8 мкг «Стафилолейкина» на мышь. За сутки до постановки кожной пробы у мышей на боковой поверхности туловища выстригали шерсть и наносили крем для эпиляции. При постановке пробы внутрикожно вводили 13 мкг стафилококкового белка А (СБА) (Pharmacia- Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), адсорбированного на алюмо-калиевых квасцах, в объёме 10 мкл. Кожные реакции (положительной считали папулу диаметром не менее 4 мм) учитывали через 24 и 48 часов.

В трёх группах по 20 мышей, которым вводили «Стафилолейкин», положительная замедленная кожная реакция на СБА отмечена, соответственно, у 12, 15 и 16 животных в отличие от контрольных мышей, которым в лапки вводили 0,9% раствор натрия хлорида, при $p < 0,05$. Введение трём группам по 20 мышей препарата сравнения «Аффинолейкин», вызвало положительную реакцию ГЗТ на СБА у 13, 14 и 15 животных этих групп при отсутствии образования папул у животных контрольной группы.

Оба препарата «Стафилолейкин» и «Аффинолейкин» индуцируют у мышей ГЗТ к СБА с похожей частотой, что свидетельствует о сходном присутствии в них НАСЦ антистафилококковой специфичности. СБА, подобно туберкулину, – классический антиген иммунологической памяти человека. В то же время он – поверхностный соматический антиген большинства вирулентных штаммов *S. aureus*, вызывающий иммунный ответ у каждого индивида с ненарушенным иммунологическим статусом. Колонизация стафилококком кожи и слизистых оболочек начинается вскоре после рождения и эта латентная инфекция рассматривается как причина появления специфичных к СБА НАСЦ, выявляемых в образцах «Аффинолейкина».

4.1.2. Изучение активности препарата с помощью переноса ГЗТ, регистрируемого в реакции СБА-зависимой конгломерации лейкоцитов мышей после введения «Стафилолейкина»

Эксперименты проведены на мышах BALB/c (самцы весом (24 ± 2) г) Аналогично препарату «Аффинолейкин», активность «Стафилолейкина» выражали величиной его дозы в мкг, введение которой мышам в 100 раз снижало пороговую концентрацию СБА, вызывавшую конгломерацию циркулирующих лейкоцитов, в сравнении с эффектом введения неспецифического иммуностимулятора – натрия нуклеината (табл. 12). Также как и для коммерческого препарата «Аффинолейкин»,

доза «Стафилолейкина», дающая «индекс переноса», равный 100 (D_{100}), не должна превышать 50 мкг/мышь. Условно эта величина принята за единицу.

Величина D_{100} должна быть меньше или равна 1,0 ед. (50 мкг). Если D_{100} препарата, номинально содержащего в ампуле 1,0 или 2,0 ед. «Стафилолейкина», превысит 1,0 ед., но будет менее 2,0 ед., то он может быть маркирован как содержащий в ампуле соответственно 0,5 или 1,0 ед. Препарат с D_{100} , равной или превышающей 2,0 ед., считается неактивным. Умножив показатель активности на 50, можно его выразить в дозе мкг/мышь.

Таблица 12

Расчёт дозы «Стафилолейкина»,
обеспечивающей индекс переноса, равный 100

Группа	Доза нуклеината натрия или «Стаффинолейкина»	№ мышей	Пороговая концентрация СБА, вызвавшая коагуляцию лейкоцитов	Средняя пороговая концентрация СБА, мкг/мл (СПК)	Индекс переноса	И × Д
1	20 мкг нуклеината натрия	1	3,2	$СПК_1 = \sqrt[3]{ПК_1 \times ПК_2 \times ПК_3}$ $= 5,1$	—	—
		2	6,4			
		3	6,4			
2	Стафилолейкин 0,08 ед	4	0,8	$СПК_2 = \sqrt[3]{ПК_4 \times ПК_5 \times ПК_6}$ $= 0,6$	$И_1 = \frac{СПК_1}{СПК_2}$ $= 8,5$	$И_1 \times 0,08$ $= 0,7$
		5	0,4			
		6	0,8			
3	Стафилолейкин 0,4 ед	7	0,16	$СПК_3 = \sqrt[3]{ПК_7 \times ПК_8 \times ПК_9}$ $= 0,07$	$И_2 = \frac{СПК_1}{СПК_3}$ $= 73$	$И_2 \times 0,4$ $= 29$
		8	0,05			
		9	0,05			
4	Стафилолейкин 2,0 ед	10	0,018	$СПК_4 = \sqrt[3]{ПК_{10} \times ПК_{11} \times ПК_{12}}$ $= 0,008$	$И_3 = \frac{СПК_1}{СПК_4}$ $= 638$	$И_3 \times 2,0$ $= 1275$
		11	0,018			
		12	0,002			

$D_{100} = \frac{\Sigma(I \times D) + 260 - 1,7 \Sigma I}{1,2 \Sigma(I \times D) - \Sigma I} = 0,4 \text{ (ед)}$	$\Sigma I =$ 720	$\Sigma(I \times D) =$ 1305
--	---------------------	--------------------------------

Таким образом, как показывают приведенные расчеты, специфическая активность «Стафилолейкина» $D_{100} = 0,4 \text{ ед} = 20 \text{ мкг/мышь}$. В 1 ампуле $50 \text{ мкг} = 1 \text{ ед}$. активности в ампуле.

Таблица 13

Результаты определения D_{100} «Стафилолейкина» и «Аффинолейкина» в реакции конгломерации мышинных лейкоцитов с СБА, по сравнению с нуклеинатом натрия в четырех экспериментах

D_{100} «Стафилолейкин» мкг/мышь	D_{100} «Аффинолейкин» мкг/мышь
6(4 ÷ 32)	12(2 ÷ 16)

Судя по результатам переноса ГЗТ к СБА, регистрируемого в реакции СБА-зависимой конгломерации лейкоцитов мышей (таб. 13), «Стафилолейкин» индуцирует более выраженный антистафилококковый клеточный иммунитет, чем коммерческий полиспецифичный «Аффинолейкин».

4.2. Изучение специфических свойств препарата «Стафилолейкин» с помощью иммуноферментного анализа

Для изучения влияния разработанного препарата на аффинность связывания стафилококковых антител с антигенами в системе *in vitro* нами был выбран широко используемый в медицине и биологии иммуноферментный анализ (ИФА).

На полистироловых планшетах адсорбировали стафилококковый анатоксин. В качестве антитоксина использовали разведения коммерческого антистафилококкового иммуноглобулина человека. Связавшиеся с анатоксином антитела выявляли конъюгатом – биотинилированным стафилококковым белком А. На рисунке 14 показана схема постановки ИФА и расположения проб на планшете.

При использовании коммерческой тест-систем (MONOLISA® anti-HBs, производства фирмы «BIO-RAD») применяли ту же схему проведения ИФА:

1. АГ + АТ + КФБ + К - положительный контроль 1;
2. АГ + КФБ + АТ + К – положительный контроль 2;
3. АГ + Стаф + АТ + К;
4. АГ + АТ + Стаф + К;
5. АГ + КФБ + ОК + К – отрицательный контроль.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	АГ + АТ + КФБ + К	АГ + АТ + КФБ + К	АГ + КФБ + АТ + К	АГ + КФБ + АТ + К	АГ + Стаф + АТ + К	АГ + Стаф + АТ + К	АГ + АТ + Стаф + К	АГ + АТ + Стаф + К
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H	АГ + КФБ + ОК + К							

Рис. 14. Схемы постановки ИФА. Обозначения: АГ – иммобилизованный антиген (анатоксин); АТ – антитела; Стаф – исследуемый препарат «Стафилолейкин»; ОК – отрицательный контрольный образец; К- конъюгат

При постановке реакции по вариантам 1, 2, 3 и 4 выяснилось, что «Стафилолейкин» специфически повышал функциональную аффинность стафилококкового антитоксина, но лишь при одном условии, когда его наносили на иммобилизованный анатоксин до наслоения антител (вариант 3). Это сдвигало конечную точку титрования на 2 – 3 лунки к концу ряда (рис. 15). В то же время, наслоение «Стафилолейкина» после антитоксина перед наслоением конъюгата не влияло на результаты реакции (вариант 4).

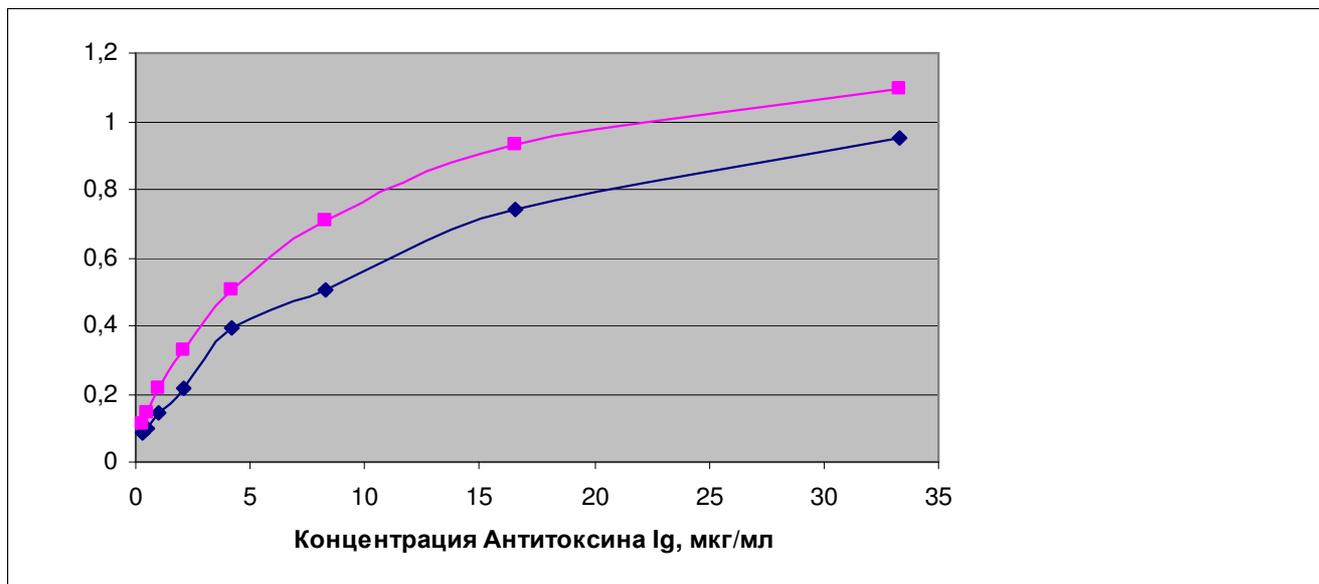


Рис. 15. Увеличение связывания стафилококкового антитоксина с иммобилизованным анатоксином после наложения «Стафилолейкина». По оси ординат оптическая плотность раствора хромогена в иммуноферментном анализе. Верхняя кривая - результат постановки реакции по варианту 3, нижняя по варианту 4

Целесообразным являлось оценить влияние глицина на результат реакции, так как он входит в состав препарата. Для этого была разработана и использована следующая схема реакции: АГ + глицин + АТ + К.

Глицин добавляли в различных концентрациях: 54 мкг/мл, 27 мкг/мл, 13,5 мкг/мл, 6,75 мкг/мл, 3,5 мкг/л. ИФА, проведенный с использованием разработанной схемы, показал, что глицин не влиял на результат реакции.

Далее мы изучали влияние концентрации «Стафилолейкина» на результат иммуноферментной реакции.

Для этого на полистироловом планшете, в первых двух рядах, анализ проводили по вариантам 1 и 2, а в рядах с 3 по 7 - по варианту 3, используя различные концентрации «Стафилолейкина». Схема постановки реакции и расположение проб на планшете показаны на рисунке 16.

1. АГ + АТ + КФБ + К - положительный контроль 1;
2. АГ + КФБ + АТ + К – положительный контроль 2;

3. АГ + Стаф + АТ + К;

5. АГ + КФБ + ОК + К – отрицательный контроль;

	1	2	3	4	5	6	7
A	АГ + АТ + КФБ + К	АГ + КФБ + АТ + К	АГ + Стаф + АТ + К (концентрация Стафилолейкина 0,5 мкг/мл)	АГ + Стаф + АТ + К (концентрация Стафилолейкина 1,0 мкг/мл)	АГ + Стаф + АТ + К (концентрация Стафилолейкина 2,0 мкг/мл)	АГ + Стаф + АТ + К (концентрация Стафилолейкина 4,0 мкг/мл)	АГ + Стаф + АТ + К (концентрация Стафилолейкина 8,0 мкг/мл)
B							
C							
D							
E							
F							
G							
H	АГ + КФБ + ОК + К						

Рис. 16. Схемы постановки ИФА. Обозначения: АГ – иммобилизованные антигены; АТ – антитела; Стаф – исследуемый препарат «Стафилолейкин»; ОК – отрицательный контрольный образец; К- конъюгат

При анализе полученных данных было выявлено, что результат реакции зависел от концентраций «Стафилолейкина» и антистафилококкового иммуноглобулина.

На графике (рис. 17) вершинами парабол этой зависимости отмечены их оптимальные концентрации.

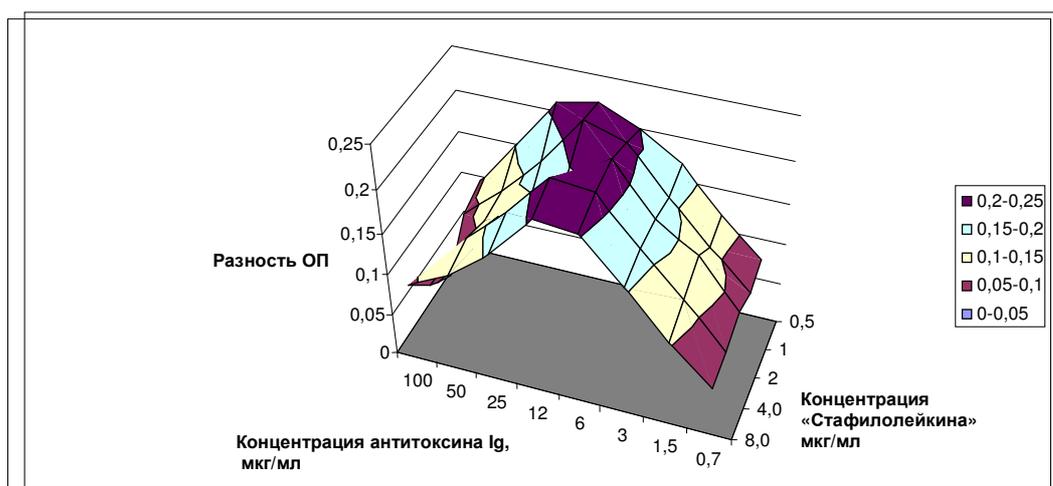


Рис. 17. Разность ОП между первым вариантом нанесения реагентов: анатоксин + «Стафилолейкин» + антитоксин Ig + конъюгат, и вторым: анатоксин + антитоксин Ig + «Стафилолейкин» + конъюгат характеризует увеличение аффинности антистафилококковых антител, оптимально проявляющееся при 3 – 25 мкг/мл антител и 0,15 – 0,25 мкг/мл «Стафилолейкина»

Усиление аффинности связывания антистафилококковых антител с иммобилизованным анатоксином под воздействием «Стафилолейкина» проявлялось только в специфичной системе «стафилококковый анатоксин – антитоксин», но не при взаимодействии антигена и антител другой специфичности, то есть, связывание «Стафилолейкина» с иммобилизованным анатоксином увеличивало его комплементарность в отношении антител по типу дополнительного слабоаффинного пептид-белкового взаимодействия.

При изучении свойств «Стафилолейкина» с помощью иммуноферментного анализа на планшетах с адсорбированным стафилококковым анатоксином и стандартными препаратами стафилококковых антител нами был обнаружен феномен усиления сигнала и сдвига конечной точки титрования на 1 – 2 лунки к концу ряда. То есть, в присутствии НАСЦ, возможно, возрастала аффинность специфических антител, или критическая концентрация антител, связывающихся с антигеном, необходимая для получения регистрируемой реакции, становилась меньше, или чувствительность ИФА повышалась.

Обнаруженное взаимодействие антистафилококковых антител со «Стафилолейкином» даёт новую интерпретацию механизма иммуноспецифического эффекта НАСЦ – повышение аффинности связывания антител и Т- клеточных рецепторов с номинальным (непроцессированным) антигеном. Это новый взгляд с элементом фундаментальности. Но есть и важная практическая сторона: усовершенствование данной методики определения иммуноспецифической активности «Стафилолейкина» *in vitro* создаст в дальнейшем возможность обходиться без использования мышей. Тем более, что все конвенциональные по микробиологическому статусу мыши с новорожденности – носители *S. Aureus*.

По-видимому, данный специфический шапероноподобный эффект «Стафилолейкина» лежит в основе его иммуноадьювантного и иммунокорректирующего действия *in vivo*.

4.3. Реализация иммуноспецифической активности «Стафилолейкина» в переносе антистафилококковой резистентности

Активность препарата «Стафилолейкин» в переносе противостафилококковой резистентности была исследована на разработанной Мацем А.Н. [14] модели подострого стафилококкового менингоэнцефалита у мышей, заражённых интрацеребрально *S. aureus* МТ-1 [1].

«Стафилолейкин» и препарат сравнения «Аффинолейкин» вводили мышам СВА/Sto (самцы весом (24 ± 2) г) интраплантарно в четыре лапки в дозе 0,04 ед. (8 мкг), оптимальной для переноса ГЗТ к СБА (раздел 5.2.1), и в разные сроки после этого заражали мышей в мозг *S. aureus* МТ-1, вводя 20 – 100 LD_{50} . Гибель животных учитывали в течение 1 месяца. Введение «Стафилолейкина» и «Аффинолейкина» за неделю до заражения защищало в разных опытах от 20 до 25% животных (отличие от контроля незначимо). Однако введение этих препаратов за 1 день до заражения защищало в трёх опытах 30 – 60% мышей. В двух опытах при введении стафилолейкина выжили 55 и 60% мышей ($p < 0,025$; критерий Фишера).

Наибольшую протективную активность (70 – 80% выживших мышей, $p < 0,01$; критерий Фишера) проявлял «Стафилолейкин» при введении в мозг в одном шприце с заражающей дозой. Полученные данные свидетельствуют о высокой иммуноспецифической активности этих препаратов в защите от стафилококковой инфекции. Сходство протективной активности «Стафилолейкина» и «Аффинолейкина» свидетельствует о том, что для присутствия НАСЦ, специфичных к антигенам стафилококка, в препарате естественная латентная стафилококковая инфекция имеет едва ли не большее значение, чем вакцинация.

4.4. Оценка потенциала «Стафилолейкина» в терапии язвенных поражений роговицы стафилококковой этиологии

Терапевтическая активность нового препарата была показана на примере модели стафилококкового гнойного кератита на 10 кроликах породы «Шиншилла» самцах весом ($2,5 \pm 0,3$) кг. Под местной анестезией скальпелем с алмазным лезвием делали надрез роговицы. Затем микрохирургическим шпателем, расслаивая строму, создавали полость, в которую вводили 0,1 мл взвеси *S.aureus* МТ-1 (10 ед./мл по стандарту мутности).

Ежедневно давали бальную оценку гиперемии конъюнктивы век, перикорнеальной инъекции сосудов, смешанной инъекции, инфильтрации роговицы. Инстилляцией «Стафилолейкина» (по 2 капли, содержащие 0,1 ед. или 10 мкг, в конъюнктивальный мешок обоих глаз 4 раза в день) начинали через 1 сутки после заражения, когда развивалась выраженная одинаковая в опытной и контрольной группе картина воспаления с образованием инфильтрата в строме роговицы. В контрольной группе инстиллировали 0,9% раствор натрия хлорида.

Через трое суток лечения была отмечена заметная (значимая по баллам) разница тяжести воспалительного процесса в опытной и контрольной группе животных. К концу недели в половине глаз опытной группы признаки воспаления отсутствовали, тогда как в контрольной у всех животных имел место

воспалительный процесс. На девятые сутки у животных опытной группы воспалительный процесс был завершен, а в контрольной - у всех животных отмечались его слабо выраженные признаки. Через две недели в глазах кроликов опытной группы образовались легкие помутнения со слабо выраженными новообразованными сосудами. У животных контрольной группы – отмечались грубые помутнения с выраженными новообразованными сосудами, что свидетельствовало о тяжести прошедшего воспалительного процесса. Инстилляции «Стафилолейкина» в конъюнктивальный мешок на неделю, по сравнению с контролем, ускоряли заживление при значимом различии бальных оценок.

4.5. Изучение токсических свойств препарата «Стафилолейкин»

4.5.1. Определение острой и хронической токсичности препарата

Исследования по изучению острой и хронической токсичности «Стафилолейкина» проведены на лабораторных животных в соответствии с требованиями «Руководства по доклиническим испытаниям новых медицинских иммунобиологических препаратов», РД 42-28-8-89 и СП 3.3.2.561-96. Изучение токсических свойств «Стафилолейкина» проводили на двух видах животных – морских свинках массой 240 - 260 г и белых беспородных мышах массой 18 – 20 г. Для исследования использованы три экспериментально-производственные серии [26, 33].

В готовой лекарственной форме «Стафилолейкин» содержит 0,54% глицина, который и определяет осмотические свойства препарата. Для мышей и морских свинок изотоничная концентрация глицина в плазме крови 2,5%. Поэтому, растворяя эти препараты в воде, их можно сконцентрировать в 5 раз без утраты изотонии. К тому же, как правило, превышение изотонии малых объёмов инъекционного раствора вдвое не вызывает каких-либо повреждений тканей в месте введения.

Расчет доз для введения животным проводили по следующей формуле:

предполагаемая доза для человека (на 1 кг веса) x 39 (коэффициент для человека)
коэффициент для используемого лабораторного животного

В качестве предполагаемой дозы для человека была выбрана доза, равная 1 ед. активности, или 50 мкг. Следовательно, используя коэффициенты для морской свинки массой (250 ± 10) г - 5,6 и мыши массой (20 ± 2) г - 3,0, были вычислены дозы для данных видов животных. Одна доза для морской свинки составила 1,24 мкг, для мыши 0,19 мкг. Так как определить LD50 не удалось, нами были взяты для введения следующие количества препарата:

при определении острой токсичности

для морской свинки массой (250 ± 10) г - 700 мкг или 14 человеческих доз, или 565 доз для животного;

для белой мыши массой (20 ± 2) г - 107 мкг или 2,14 человеческих доз, или 565 доз для животного;

при определении хронической токсичности

для морской свинки массой (250 ± 10) г - 70 мкг или 1,4 человеческих доз, или 56,5 дозы в пересчете на вес животного в течение 20 дней (суммарно 1400 мкг или 1129 доз в пересчете на вес животного);

для белой мыши массой (20 ± 2) г - 10,7 мкг или 0,214 человеческой дозы, 56,3 дозы в пересчете на вес животного в течение 20 дней (суммарно 214 мкг или 1126 доз в пересчете на вес животного).

Наблюдение за подопытными животными проводили в период введения препарата и далее в течение 14 суток. Ежедневной регистрации подлежали: гибель животных, их масса, а также наличие клинических симптомов интоксикации. Состояние животных оценивалось по внешнему виду, поведению, изменению массы тела и пищевой активности. При этом ежедневно у животных регистрировали следующие показатели:

поведение (активность – повышенная или пониженная);

походка (мышечный тонус, тремор, балансирование);

внешний вид (истощение, ожирение);
состояние шерстного покрова (выпадение шерсти, шерсть торчащая, пятнистая, тусклая, гладкая, блестящая);
глаза (слезотечение, воспаление, помутнение роговицы);
уши (воспаление, цвет – бледность или покраснение);
конечности (цвет, отек);
физиологические функции – дыхание (скорость, характер, особенности),
экскреция (цвет и консистенция).

Через 24 часа, 7 суток и 14 суток после последнего введения препарата по 10 морских свинок (5 самцов и 5 самок) из опытных и контрольной групп подвергали эвтаназии, вскрывали для проведения макроскопических и гистологических исследований внутренних органов (тимус, сердце, легкие, печень, селезенка, почки с надпочечниками, паховые и брыжеичные лимфатические узлы, яичники у самок, семенники у самцов, головной мозг). На момент эвтаназии животных определяли массы тела и органов. Далее вычисляли коэффициент масс (КМ), проводили статистический анализ КМ и оценку достоверности полученных результатов с помощью t критерия Стьюдента.

4.5.1.1. Определение острой токсичности на морских свинках

При изучении острой токсичности «Стафилолейкин» был введен морским свинкам подкожно однократно (на боковых поверхностях туловища) в два места по 0,25 мл (всего 0,5 мл), содержащего 14 человеческих доз или 565 доз в пересчете на животное. Контрольной группе животных подкожно однократно вводили 0,9% раствор натрия хлорида в том же объеме.

Результаты наблюдения показали, что однократное подкожное введение 565 доз препарата не вызывало гибели животных, не приводило к снижению массы тела, изменениям волосяного покрова и каким-либо нарушениям состояния и поведения животных. Состояние животных в опытных группах не отличалось от состояния и

поведения животных контрольной группы. При вскрытии каких-либо патологических изменений выявлено не было. Полученные результаты представлены в таблицах 14 и 15.

Таблица 14

Динамика изменения массы тела морских свинок при изучении острой токсичности препарата «Стафилолейкин»

Срок эвтанази ии	Группа	Масса тела, г				
		исходная	24 часа	7 суток	14 суток	прирост
24 часа	Контроль (физиологический раствор)	284,17± 19,29	290,00± 18,09			5,83±1,23
	«Стафилолейкин» с. 1	280,00± 22,56	286,67± 23,48			6,67±1,56
	«Стафилолейкин» с. 2	279,17± 15,05	284,17± 12,40			5,00±1,23
	«Стафилолейкин» с. 3	275,83± 13,11	280,00± 12,79			4,17±1,96
7 суток	Контроль (физиологический раствор)	279,17± 17,30		320,83± 21,09		41,67±2,93
	«Стафилолейкин» с. 1	284,17± 17,82		325,83± 19,17		41,67±3,56
	«Стафилолейкин» с. 2	277,50± 12,88		318,75± 19,08		41,25±3,45
	«Стафилолейкин» с. 3	270,83± 9,96		311,67± 14,03		40,83±2,66
14 суток	Контроль (физиологический раствор)	280,00± 23,74			352,08± 31,87	72,08±3,25
	«Стафилолейкин» с. 1	271,67± 19,46			335,42± 29,81	63,75±3,47
	«Стафилолейкин» с. 2	277,50± 13,57			341,67± 17,49	64,17±2,88
	«Стафилолейкин» с. 3	268,33± 17,49			330,00± 21,32	61,67±3,51

Динамика изменения коэффициента массы органов морских свинок при изучении острой токсичности препарата «Стафилолейкин»

Срок эвтаназии	Группа	Коэффициент массы органа, %				
		головной мозг	сердце	печень	селезенка	почки
24 часа	Контроль (физиологический раствор)	0,99± 0,12	0,41± 0,07	5,04± 0,60	0,15± 0,04	0,86± 0,07
	«Стафилолейкин» с. 1	0,97± 0,18	0,43± 0,07	4,89± 0,45	0,16± 0,04	0,84± 0,08
	«Стафилолейкин» с. 2	0,99± 0,12	0,42± 0,06	5,18± 0,56	0,14± 0,03	0,84± 0,07
	«Стафилолейкин» с. 3	1,01± 0,09	0,39± 0,07	4,85± 0,56	0,15± 0,03	0,89± 0,08
7 суток	Контроль (физиологический раствор)	0,97± 0,04	0,45± 0,04	4,85± 0,37	0,17± 0,04	0,83± 0,09
	«Стафилолейкин» с. 1	0,95± 0,07	0,46± 0,06	4,63± 0,61	0,21± 0,07	0,89± 0,08
	«Стафилолейкин» с. 2	0,95± 0,09	0,48± 0,06	4,69± 0,37	0,21± 0,06	0,87± 0,10
	«Стафилолейкин» с. 3	0,98± 0,05	0,43± 0,05	4,71± 0,44	0,18± 0,03	0,87± 0,11
14 суток	Контроль (физиологический раствор)	0,90± 0,08	0,41± 0,05	4,93± 0,64	0,20± 0,06	0,81± 0,11
	«Стафилолейкин» с. 1	0,97± 0,13	0,50± 0,14	5,10± 0,91	0,25± 0,12	0,91± 0,14
	«Стафилолейкин» с. 2	0,95± 0,09	0,49± 0,15	4,97± 0,76	0,24± 0,12	0,89± 0,12
	«Стафилолейкин» с. 3	0,96± 0,09	0,43± 0,07	4,80± 0,65	0,23± 0,07	0,87± 0,11

Как видно из приведенных данных, динамика массы тела на протяжении всего эксперимента у животных всех групп была положительной, статистически значимых различий с контрольными животными, получившими физиологический раствор, не установлено. При сравнительном анализе коэффициентов масс органов

статистически значимых различий с контрольными животными также не было выявлено.

4.5.1.2. Определение острой токсичности на мышах

При определении острой токсичности «Стафилолейкин» мышам опытной группы вводили в количестве, равном 2,14 человеческих доз, или 565 дозам в пересчете на животное. Мышам контрольной группы вводили 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Мышиный хвост на 30 секунд погружали в воду, подогретую до 40 °С, и в набухшую вену медленно вводили препарат. За мышами наблюдали в течение часа непосредственно после инъекции, затем через 24 часа, 7 суток и 14 суток.

По результатам ежедневного взвешивания определили, что введение «Стафилолейкина» не вызывало падения массы тела мышей и не тормозило её физиологическое увеличение с возрастом. Ни одно животное не погибло, и не было замечено каких-либо симптомов интоксикации. Полученные результаты представлены в таблице 16.

Динамика изменения массы тела мышей при изучении
острой токсичности препарата «Стафилолейкин»

Срок эвтанази и	Группа	Масса тела, г				
		исходная	24 часа	7 суток	14 суток	прирост
24 часа	Контроль (физиологический раствор)	19,91± 1,07	20,24± 1,06			0,33±0,14
	«Стафилолейкин» с. 1	19,87± 1,94	20,43± 2,07			0,34±0,24
	«Стафилолейкин» с. 2	19,07± 1,33	19,41± 1,39			0,44±0,18
	«Стафилолейкин» с. 3	19,39± 2,04	19,83± 2,1			0,36±0,13
7 суток	Контроль (физиологический раствор)	19,23± 1,67		21,52± 2,13		2,29±0,7
	«Стафилолейкин» с. 1	18,69± 0,73		20,78± 1,36		2,09±0,93
	«Стафилолейкин» с. 2	18,97± 1,72		21,26± 2,19		2,29±0,82
	«Стафилолейкин» с. 3	18,64± 1,36		21,66± 1,67		3,02±1,85
14 суток	Контроль (физиологический раствор)	18,69± 1,58			23,52± 2,06	4,83±1,29
	«Стафилолейкин» с. 1	18,97± 1,72			23,63± 2,34	4,66±1,49
	«Стафилолейкин» с. 2	19,97± 1,54			24,77± 2,09	4,08±2,09
	«Стафилолейкин» с. 3	20,18± 1,57			24,77± 2,09	4,59±2,95

При проведении макроскопических исследований также не было выявлено патологических изменений: поверхности печени, почек и селезёнки оставались гладкими, при осмотре брюшной полости и брыжейки не было замечено петехиальных кровоизлияний. Полученные данные представлены в таблице 17.

Динамика изменения коэффициентов масс органов мышей при изучении острой токсичности препарата «Стафилолейкин»

	Группа	Коэффициент массы органа ((массы органа, г/массы тела животного, г)×100), %							
		Головной мозг	Сердце	Печень	Селезенка	Легкие	Почки	Тимус	Паховые лимф узлы, ×10 ⁻¹
24 часа	Контроль (физиологический раствор)	1,83± 0,13	0,50± 0,10	6,01± 0,49	0,64± 0,23	1,40± 0,20	1,59± 0,26	0,39± 0,08	0,23± 0,13
	«Стафилолейкин» с. 1	1,83± 0,19	0,55± 0,08	6,56± 0,88	0,63± 0,16	1,55± 0,40	1,52± 0,19	0,36± 0,07	0,27± 0,07
	«Стафилолейкин» с. 2	1,97± 0,21	0,56± 0,10	6,59± 1,14	0,71± 0,23	1,41± 0,45	1,56± 0,39	0,43± 0,11	0,28± 0,10
	«Стафилолейкин» с. 3	1,90± 0,20	0,55± 0,06	6,80± 0,93	0,68± 0,20	1,28± 0,34	1,61± 0,35	0,39± 0,18	0,29± 0,15
7 суток	Контроль (физиологический раствор)	1,80± 0,19	0,50± 0,06	6,24± 0,81	0,67± 0,22	1,16± 0,22	1,49± 0,35	0,29± 0,06	0,21± 0,04
	«Стафилолейкин» с. 1	1,81± 0,13	0,55± 0,05	6,78± 1,33	0,62± 0,25	1,31± 0,30	1,53± 0,36	0,36± 0,15	0,22± 0,10
	«Стафилолейкин» с. 2	1,78± 0,19	0,52± 0,11	6,68± 1,89	0,80± 0,41	1,09± 0,35	1,36± 0,27	0,33± 0,08	0,17± 0,06
	«Стафилолейкин» с. 3	1,66± 0,21	0,52± 0,12	6,83± 0,90	0,79± 0,22	1,08± 0,37	1,52± 0,48	0,35± 0,13	0,21± 0,10
14 суток	Контроль (физиологический раствор)	1,56± 0,18	0,54± 0,11	5,82± 1,68	0,74± 0,26	1,24± 0,18	1,23± 0,26	0,28± 0,10	0,17± 0,09
	«Стафилолейкин» с. 1	1,50± 0,15	0,46± 0,09	5,98± 1,58	0,71± 0,37	1,08± 0,23	1,34± 0,41	0,30± 0,08	0,22± 0,12
	«Стафилолейкин» с. 2	1,54± 0,21	0,44± 0,08	5,30± 0,87	0,65± 0,20	1,23± 0,29	1,16± 0,25	0,29± 0,07	0,25± 0,08
	«Стафилолейкин» с. 3	1,52± 0,16	0,44± 0,10	5,98± 0,88	0,62± 0,18	1,05± 0,20	1,27± 0,29	0,33± 0,11	0,27± 0,18

M ± m - среднее арифметическое ± стандартное отклонение.

* Различия достоверны по сравнению с контролем (p<0,05 при доверительном интервале измерения 95%)

4.5.1.3. Изучение хронической токсичности на морских свинках

Для изучения хронической токсичности морским свинкам был введен препарат «Стафилолейкин» в количестве 1 129 доз в пересчете на животное (внутримышечно ежедневно в течение 20 дней по 56,5 дозы/0,5 мл в пересчете на животное). Животным контрольной группы вводили по 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида (внутримышечно ежедневно в течение 20 дней).

Наблюдение за животными проводили в течение периода введения препарата и далее в течение 14 суток. При этом ежедневно у животных регистрировали те же показатели, что и при определении острой токсичности.

В результате проведенных наблюдений было установлено, что двадцатикратное введение препарата не сказывалось на поведении, состоянии кожи, шерстного покрова, видимых слизистых оболочек подопытных животных. Существенных различий в поведении, потреблении корма и воды у животных опытных и контрольной групп не выявлены.

При вскрытии животных каких-либо патологических изменений внутренних органов визуально не обнаружено.

В таблицах 18 и 19 представлены полученные результаты статистического анализа КМ и оценка достоверности полученных результатов с помощью *t* критерия Стьюдента.

Таблица 18

Динамика изменения массы тела морских свинок при изучении хронической токсичности препарата «Стафилолейкин»

Срок эвтаназии	Группа	Масса тела, г				
		исходная	24 часа	7 суток	14 суток	прирост
24 часа	Контроль (физиологический раствор)	277,92±14,99	329,17±21,30			51,25±2,56
	«Стафилолейкин» с. 1	281,67±23,29	329,58±23,98			47,92±2,48
	«Стафилолейкин» с. 2	277,50±21,37	324,17±20,65			46,67±3,12
	«Стафилолейкин» с. 3	275,83±17,82	326,67±17,23			50,83±3,22
7 суток	Контроль (физиологический раствор)	285,00±19,77		362,50±25,18		77,50±3,86
	«Стафилолейкин» с. 1	288,33±18,50		369,17±22,55		80,83±4,21
	«Стафилолейкин» с. 2	274,17±16,76		349,17±25,39		75,00±4,36
	«Стафилолейкин» с. 3	274,17±18,81		350,00±18,09		75,83±4,26
14 суток	Контроль (физиологический раствор)	285,00±16,24			429,58±39,97	144,58±5,12
	«Стафилолейкин» с. 1	278,33±17,49			404,17±27,95	125,83±7,23
	«Стафилолейкин» с. 2	275,83±16,76			418,33±32,43	142,50±6,51
	«Стафилолейкин» с. 3	276,67±18,26			428,33±20,82	151,67±5,63

Таблица 19

Динамика изменения коэффициентов масс органов морских свинок при изучении хронической токсичности препарата «Стафилолейкин»

Срок эвтаназии	Группа	Коэффициент массы органа, %				
		гол мозг	сердце	печень	селезенка	почки
24 часа	Контроль (физиологический раствор)	0,90± 0,10	0,51± 0,05	5,10± 0,64	0,16± 0,04	0,77± 0,04
	«Стафилолейкин» с. 1	0,90± 0,10	0,44± 0,07*	5,01± 0,53	0,15± 0,03	0,77± 0,05
	«Стафилолейкин» с. 2	0,91± 0,05	0,46± 0,07	5,21± 0,48	0,15± 0,03	0,79± 0,06
	«Стафилолейкин» с. 3	0,88± 0,08	0,42± 0,06*	4,93± 0,45	0,17± 0,04	0,77± 0,08
7 суток	Контроль (физиологический раствор)	0,89± 0,07	0,42± 0,05	4,87± 0,71	0,14± 0,04	0,73± 0,06
	«Стафилолейкин» с. 1	0,83± 0,14	0,46± 0,10	5,08± 0,53	0,15± 0,03	0,76± 0,03
	«Стафилолейкин» с. 2	0,85± 0,07	0,44± 0,05	5,19± 0,39	0,13± 0,03	0,74± 0,08
	«Стафилолейкин» с. 3	0,93± 0,05	0,44± 0,05	4,71± 0,53	0,16± 0,04	0,73± 0,06
14 суток	Контроль (физиологический раствор)	0,74± 0,09	0,40± 0,04	4,32± 0,52	0,14± 0,05	0,69± 0,05
	«Стафилолейкин» с. 1	0,79± 0,08	0,38± 0,07	4,11± 0,61	0,15± 0,03	0,73± 0,05
	«Стафилолейкин» с. 2	0,72± 0,05	0,41± 0,05	4,32± 0,31	0,13± 0,03	0,68± 0,06
	«Стафилолейкин» с. 3	0,71± 0,05	0,42± 0,05	4,38± 0,33	0,14± 0,03	0,66± 0,05

* Примечание – различия достоверны по сравнению с контролем

Данные, представленные в таблице 19, отражают положительную динамику массы тела на протяжении всего эксперимента у животных всех групп. Статистически значимых различий с контрольными животными не установлено. При сравнительном анализе КМ органов выявлены только незначительные различия показателей коэффициентов масс сердца через 24 часа по сравнению с контролем.

На 14 сутки наблюдения статистически значимые различия отсутствовали. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии токсических свойств препарата «Стафилолейкин».

4.5.1.4. Изучение хронической токсичности препарата «Стафилолейкин» на белых беспородных мышах

Для изучения «хронической» токсичности на белых беспородных мышах «Стафилолейкин» вводили в течение 20 дней по 56,3 дозы в пересчете на животное, суммарно за весь период - 1 126 доз. Животным контрольной группы введено по 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида (внутримышечно ежедневно в течение 20 суток).

Двадцатикратное введение препарата не оказывало влияние на поведение, состояние кожи, шерстного покрова, видимые слизистые оболочки подопытных животных. Существенных различий в поведении, потреблении корма и воды между животными отдельных групп не установлено.

Макроскопическое исследование органов показало, что в контрольной группе и опытных группах внутренние органы животных имели все характерные признаки, расположение и строение. Оболочки, выстилающие внутренние полости, влажные, серовато-розового цвета, без признаков воспаления.

Результаты представлены в таблицах 20 и 21.

Динамика изменения массы тела мышей при изучении хронической токсичности препарата «Стафилолейкин»

Срок эвта нази и	Группа	Масса тела , г				
		Исходная	24 часа	7 суток	14 суток	Прирост
24 часа	Контроль (физиологический раствор)	19,14±1,23	23,70±1,86			4,56±1,37
	Стафилолейкин с 1	19,93±1,59	23,66±1,76			3,73±0,71
	Стафилолейкин с 2	20,24±24	24,83±1,23			4,59±1,08
	Стафилолейкин с 3	20,09±1,37	25,07±1,30			4,98±1,20
7 суто к	Контроль (физиологический раствор)	19,29±1,01		26,73±1,83		7,44±1,11
	Стафилолейкин с 1	19,84±0,92		27,06±2,38		7,22±1,74
	Стафилолейкин с 2	20,04±0,87		26,22±2,51		6,18±1,90
	Стафилолейкин с 3	20,18±1,58		26,97±2,13		6,79±2,28
14 суто к	Контроль (физиологический раствор)	20,02±0,45			30,54±1,5 8	10,52±1,2 6
	Стафилолейкин с 1	19,49±0,65			30,59±1,1 5	11,10±1,3 0
	Стафилолейкин с 2	20,06±1,05			31,02±1,4 9	10,96±1,9 0
	Стафилолейкин с 3	19,72±0,91			30,84±1,4 5	11,12±1,8 6

Из представленных в таблице данных видно, что динамика массы тела в течение эксперимента у всех животных была положительной. Статистически значимых различий с группой контрольных животных не обнаружено.

Таблица 21

Динамика изменения коэффициентов масс органов мышей при изучении хронической токсичности
препарата «Стафилолейкин»

	Группа	Коэффициент массы органа ((массы органа, г/массы тела животного, г)×100), %								
		гол мозг	сердце	печень	селез- ка	легкие	почки	тимус	паховые лимф узлы, ×10 ⁻¹	брыжеечн лимф узлы, ×10 ⁻¹
24 часа	Контроль (физиологический раствор)	1,43± 0,22	0,51± 0,13	6,28± 1,37	0,75± 0,11	1,14± 0,35	1,28± 0,23	0,31± 0,12	0,17± 0,06	0,16± 0,07
	«Стафилолейкин» с. 1	1,47± 0,18	0,50± 0,09	6,04± 0,77	0,84± 0,24	1,19± 0,43	1,21± 0,12	0,26± 0,16	0,26± 0,06	0,18± 0,09
	«Стафилолейкин» с. 2	1,49± 0,19	0,45± 0,07	5,33± 1,08	0,72± 0,30	1,15± 0,44	1,10± 0,26	0,26± 0,10	0,18± 0,04	0,18± 0,05
	«Стафилолейкин» с. 3	1,42± 0,29	0,45± 0,07	6,27± 1,37	0,72± 0,12	1,05± 0,28	1,10± 0,28	0,29± 0,10	0,18± 0,05	0,17± 0,04
7 суток	Контроль (физиологический раствор)	1,44± 0,12	0,50± 0,06	6,20± 0,59	0,84± 0,19	1,18± 0,30	1,25± 0,20	0,27± 0,06	0,22± 0,09	0,19± 0,04
	«Стафилолейкин» с. 1	1,40± 0,13	0,48± 0,05	6,65± 1,06	0,76± 0,39	1,26± 0,26	1,31± 0,28	0,24± 0,06	0,23± 0,09	0,19± 0,09
	«Стафилолейкин» с. 2	1,48± 0,16	0,51± 0,10	6,05± 1,42	0,82± 0,16	1,10± 0,31	1,24± 0,32	0,25± 0,06	0,19± 0,08	0,19± 0,07
	«Стафилолейкин» с. 3	1,43± 0,22	0,46± 0,10	6,67± 1,50	0,84± 0,12	1,08± 0,28	1,11± 0,25	0,25± 0,08	0,18± 0,04	0,19± 0,04
14 суток	Контроль (физиологический раствор)	1,32± 0,10	0,46± 0,05	6,63± 0,54	0,83± 0,13	1,02± 0,09	1,30± 0,17	0,25± 0,05	0,18± 0,08	0,17± 0,05
	«Стафилолейкин» с. 1	1,32± 0,13	0,41± 0,05	6,61± 0,53	0,83± 0,08	1,10± 0,14	1,33± 0,24	0,23± 0,05	0,25± 0,07	0,18± 0,07
	«Стафилолейкин» с. 2	1,30± 0,14	0,41± 0,08	5,79± 1,24	0,84± 0,13	1,12± 0,17	1,12± 0,23	0,21± 0,07	0,17± 0,04	0,19± 0,09
	«Стафилолейкин» с. 3	1,34± 0,15	0,42± 0,06	6,25± 0,30	0,81± 0,10	1,11± 0,20	1,18± 0,11	0,23± 0,04	0,17± 0,05	0,20± 0,10

M ± m - среднее арифметическое ± стандартное отклонение.

* Различия достоверны по сравнению с контролем (p<0,05 при доверительном интервале измерения 95%)

Проведенные патоморфологические исследования внутренних органов при изучении острой и хронической токсичности не выявили морфологических признаков токсичности (некрозы, выраженные дистрофические изменения, тяжелые расстройства кровообращения). Отмеченные слабо выраженные признаки гиперплазии лимфоидной ткани тимуса, селезенки, лимфатических узлов свидетельствует о проявлении иммунного ответа на введение препарата. Наличие очаговой белковой (зернистой и гидропической) дистрофии гепатоцитов наряду с гиперплазией ретикулоэндотелиальных клеток и очаговыми лимфоцитарными инфильтратами можно расценить как реактивные. Расстройства кровообращения в виде полнокровия сосудов почек, печени можно объяснить проявлениями перераспределения крови в агональном периоде.

Таким образом, при изучении острой и хронической токсичности введение «Стафилолейкина» не вызывало интоксикации и гибели подопытных животных. В течение всего периода наблюдения за подопытными и контрольными животными не было установлено видимых признаков изменения общего клинического состояния: поведенческие реакции, двигательная активность, а также потребление корма и воды у животных опытных групп существенно не отличались и соответствовали показателям нормы для данного вида животных. Динамика массы тела на протяжении курса введения препарата и срока наблюдения у всех групп животных была положительной, статистически значимых различий с контрольными животными не установлено.

На основании полученных результатов изучения общетоксического действия препарата «Стафилолейкин» не установлено признаков токсического воздействия препарата на организм подопытных животных.

4.6. Определение нежелательной миелостимулирующей активности «Стафилолейкина»

Миелостимулирующую активность «Стафилолейкина» (способность вызывать активацию лейкопоеза), выражающуюся увеличением степени спонтанной конгломерации лейкоцитов (лейкергии), определяли на мышах одновременно с оценкой специфической активности путем дополнительного сопоставления протокольных данных о числе клеток, образующих максимальные лейкоцитарные агломераты в «толстых каплях» крови из лунок «А» (см. разд. «Материалы и методы»). Для вычисления показателя миелостимулирующей активности (ПМА) препарата усредненное число клеток в трех самых крупных агломератах у мышей 4-ой группы (получавших 2 ед. препарата), которым ввели 100 мкг «Стафилолейкина», делили на усредненное число клеток в трех самых крупных агломератах у мышей контрольной группы, получивших натрий нуклеинат, по формуле:

$$\text{ПМА} = \frac{\sqrt[3]{A_{10} \cdot A_{11} \cdot A_{12}}}{\sqrt[3]{A_1 \cdot A_2 \cdot A_3}},$$

где $A_1 - A_{12}$ – это средние арифметические числа лейкоцитов в трех самых крупных агломератах, найденных в «толстой капле» крови из лунки «А» с соответствующим индексом. Результаты исследования приведены в таблице 22.

Таблица 22

Результаты микроскопии «толстых» капель
(усредненное число лейкоцитов в трех самых крупных агломератах)

Вертикальный индекс лунки		<i>H</i>	<i>G</i>	<i>F</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>C</i>	<i>B</i>	<i>A</i>	Горизонтальный индекс лунки
Концентрация → стафилококкового белка А (мкг/мл)		6,4	3,2	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	—	
Группа	№ мыши									
	1	7	8+	6	5	4	4	5	5	<i>I</i>

1	2	5+	3	3	4	3	4	3	3	2
	3	6+	5	6	5	5	6	5	5	3
2	4	6	6	8	7+	5	5	4	4	4
	5	7	6	6	8	8+	6	5	5	5
	6	6	6	6	7+	6	5	6	5	6
Концентрация → стафилококкового белка А (мкг/мл)		4,3	1,4	0,5	0,16	0,05	0,018	0,006	–	
3	7	8	10	8	8+	7	7	6	6	7
	8	7	8	8	7	8+	6	6	5	8
	9	20	15	10	11	12+	9	8	8	9
4	10	12	10	10	8	8	7+	5	4	10
	11	7	6	8	8	8	7+	6	5	11
	12	7	8	10	7	8	10	10+	5	12

Ни один из 4 исследованных образцов «Стафилолейкина» не дал ПМА, превышающий 2,0. То есть миелостимулирующая активность 100 мкг «Стафилолейкина» была значимо ниже активности 20 мкг нуклеината натрия.

Таким образом, по данному показателю исследуемый препарат можно считать безопасным.

4.7. Определение провоспалительной активности «Стафилолейкина»

Одним из важных показателей безопасности препарата является оценка его провоспалительной активности.

Исследования проводили на мышах одновременно с оценкой иммуноспецифической активности. После взятия крови вскрывали трёх мышей из 4-

й группы (см. раздел 4.4.2. Изучение активности препарата с помощью переноса ГЗТ, регистрируемого в реакции СБА-зависимой конгломерации лейкоцитов мышей после введения «Стафилолейкина»), которым за сутки до исследования ввели под кожу основания хвоста 100 мкг (2 ед.) «Стафилолейкина», растворенного в (0,2 ± 0,05) мл воды очищенной. Осматривали место инъекции препарата, подкожную клетчатку передней стенки живота и паховых областей, сосуды и лимфоузлы, расположенные под фасцией, выстилающей подкожную клетчатку изнутри, с целью выявления признаков воспаления: отек тканей, гиперемию и увеличение регионарных лимфоузлов.

Таблица 23

Результаты вскрытия мышей через сутки после введения «Стафилолейкина»

Группа	№№ мышей	Введено	Отек	Гиперемия	Увеличение лимфоузлов (мм)	Другие признаки воспаления
1	1	Натрий нуклеинат 20 мкг	–	–	2 × 3/2 × 3	–
	2		–	–	5 × 3/3 × 3	–
	3		–	–	2 × 2/2 × 2 2,8 / 2,5*	–
2	4	Стафилолейкин 0,08 ед.	–	–	2 × 3/4 × 3	–
	5		–	–	2 × 3/2 × 4	–
	6		–	–	3 × 4 / 3 × 5 2,8/3,4*	–
3	7	Стафилолейкин 0,4 ед.	–	–	2 × 3 / 3 × 5	–
	8		–	–	3 × 4/4 × 4	–
	9		–	–	3 × 5/3 × 5 3,3/3,9*	–
4	10	Стафилолейкин 2,0 ед.	–	–	3 × 4/2 × 3	–
	11		–	–	4 × 5/3 × 5	–
	12		–	–	3 × 4/ 2 × 3 3,8/2,9*	–

* Среднеарифметический квадратный корень из произведений диаметров

Как видно из таблицы 23, увеличение лимфоузлов наблюдается во всех группах, но в группах «Стафилолейкина» оно более выражено на стороне инъекции и зависит от дозы. Других признаков воспаления не обнаружено. Таким образом, «Стафилолейкин» не вызывал у мышей признаков воспаления, кроме зависящего от дозы увеличения регионарного к месту введения (пахового) лимфоузла. Это увеличение – лимфопролиферативная реакция, обусловленная предсуществующей стафилококковой колонизацией мышей, находящихся в конвенциональном микробиологическом статусе, воспроизводилось лишь у некоторых партий животных, и было интерпретировано не как неспецифическая провоспалительная активность препарата, а как проявление специфической реакции.

4.8. Определение пирогенных свойств «Стафилолейкина»

Пирогенные свойства обуславливаются веществами, которые являются продуктами обмена и распада микроорганизмов и относятся к соединениям типа комплексных белков, полисахаридов или липополисахаридов. Растворы для инъекций, обладающие пирогенными свойствами, могут вызывать у больных при введении повышение температуры, озноб и другие болезненные реакции, а при высоком содержании пирогенных веществ даже приводить к летальному исходу.

В связи с этим Государственная фармакопея XI издания требует, чтобы пирогенные вещества отсутствовали в растворах лекарственных веществ для инъекций.

Пирогенные свойства образцов «Стафилолейкина» определяли на кроликах (масса тела $(2,0 \pm 0,2)$ кг). Препарат вводили внутривенно по 25 мкг препарата на кг массы животного. «Стафилолейкин» растворяли из расчета 25 мкг в 2 мл 0,9% раствора натрия хлорида.

Данные, полученные при оценке пирогенности четырех серий препарата «Стафилолейкин», представлены в таблице 24.

Оценка пирогенных свойств «Стафилолейкина»

№ серии препарата	№ кролика	Вес кролика, кг	Температура до введения, °С	Температура через 1 час, °С	Температура через 2 часа, °С	Температура через 3 часа, °С	Сумма макс. изменений температуры, °С
1	1	2,50	39,5	39,4	39,4	39,5	0,3
	2	2,05	39,2	39,2	39,2	39,2	
	3	2,25	39,4	39,5	39,5	39,5	
2	1	2,3	39,2	39,2	39,3	39,2	0,4
	2	2,35	39,4	39,6	39,0	39,1	
	3	2,15	38,8	39,3	39,2	39,1	
3	1	2,5	39,3	39,1	39,4	39,4	0,5
	2	2,4	39,4	39,4	39,3	39,2	
	3	2,41	39,4	39,3	39,3	39,3	
4	1	2,2	39,3	39,4	39,3	39,3	0,5
	2	2,25	38,9	39,1	39,2	39,1	
	3	2,1	39,3	39,2	39,3	39,3	

Все исследованные образцы были апиrogenны: сумма максимальных изменений температуры (без учета знаков) у животных не превышала 0,5 °С.

Таким образом, результаты проведенных лабораторно-экспериментальных исследований показали, что новый антистафилококковый препарат «Стафилолейкин» индуцирует специфический клеточный иммунитет, защищает мышей от подострого менингоэнцефалита, способствует излечению стафилококкового кератита у кроликов. Доказано отсутствие пирогенных и токсических свойств «Стафилолейкина». Препарат в опытах по определению острой и хронической токсичности не вызывал гибели животных, изменения поведения,

снижения двигательной активности, снижения аппетита, изменения волосяного покрова и не приводило к снижению массы тела, что свидетельствует об отсутствии симптомов интоксикации. Проведенное макроскопическое и гистоморфологическое исследование систем и органов лабораторных животных на введение «Стафилолейкина» показало, что препарат не вызывает развития патологических, в том числе дистрофических и некробиотических изменений во внутренних органах животных. Также было установлено отсутствие миелостимулирующей и провоспалительной активности. С помощью иммуноферментного анализа установлено уникальное иммунобиологическое свойство «Стафилолейкина» повышать функциональную аффинность гомологичных антител.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на успехи, достигнутые в последние десятилетия в лечении и профилактике инфекционных болезней, инфекции остаются ведущей причиной ухудшения здоровья миллионов людей во всем мире и одной из главных причин смерти. Золотистый стафилококк - чрезвычайно распространенный представитель микрофлоры кожи и слизистых человека. Как патогенный возбудитель инфекции он был идентифицирован одним из первых. Стафилококк вызывает множество инфекций, таких как поверхностные и глубокие гнойные инфекции, интоксикации, инфекции мочевых путей и др. Среди возбудителей больничных инфекций он занимает второе по частоте место. Золотистый стафилококк чрезвычайно устойчив и обладает большими адаптационными возможностями.

Эффективный противостафилококковый иммунный ответ в большей степени основан на механизмах клеточного иммунитета, чем на функциях антител, поскольку для *S. aureus* характерно как вне -, так и внутриклеточное паразитирование [5, 24]. Судя по отдельным наблюдениям при атопической экземе с пиогенизацией, хроническом тонзиллите, отите, стафилококковом сепсисе и пневмонии более успешную серотерапию антирезистентной стафилококковой инфекции можно осуществить препаратами низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов.

Основной задачей наших исследований была разработка технологии производства и создание нового биофармацевтического препарата для иммунотерапии хронической, устойчивой к антибиотикам, очаговой и септической стафилококковой инфекции.

Впервые создана оригинальная технология производства антистафилококкового препарата из плазмы крови доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином. По данной технологии был получен новый препарат «Стафилолейкин», который представляет собой комплекс низкомолекулярных (5 – 8 кД) белков.

С помощью проведенных исследований нами было показано, что новый препарат по молекулярным параметрам и физико-химическим показателям подобен коммерческому препарату - полиспецифичному «Аффинолейкину». «Стафилолейкин» обладает иммуноспецифической активностью в переносе (индукции) иммунореактивности в отношении стафилококкового белка А на мышах и в переносе (индукции) противостафилококковой резистентности на модели подострого стафилококкового менингоэнцефалита у мышей и при иммунотерапии стафилококкового гнойного кератита у кроликов.

«Стафилолейкин» не проявляет ни острой, ни хронической токсичности, ни провоспалительного, ни миелостимулирующего действия.

Результаты доклинических исследований можно рассматривать как предпосылку для клинических испытаний «Стафилолейкина» при иммунотерапии хронической, устойчивой к антибиотикам, очаговой и септической стафилококковой инфекции.

В связи с необходимостью применения новых, без использования животных, экспрессных методов для контроля специфической активности был разработан способ на основе иммуноферментного анализа. Сконструирована иммуноферментная тест-система.

В ИФА «Стафилолейкин» специфически повышал функциональную аффинность стафилококкового антитоксина лишь при одном условии, когда его наносили на иммобилизованный анатоксин до наслоения антител. Это сдвигало конечную точку титрования на 2 – 3 лунки к концу ряда.

Усиление аффинности связывания антистафилококковых антител с иммобилизованным анатоксином под влиянием «Стафилолейкина» проявлялось только в специфичной системе «стафилококковый анатоксин – антитоксин», но не при взаимодействии антигена и антител другой специфичности, то есть, связывание «Стафилолейкина» с иммобилизованным анатоксином увеличивало его

комплементарность в отношении антител по типу дополнительного слабоаффинного пептид-белкового взаимодействия.

Учитывая данную особенность можно рассчитать активность препарата в единицах, используя в качестве контрольного образца серию, прошедшую контроль на животных.

Подготовлены проекты Фармакопейной статьи предприятия, Регламента производства препарата и Протокола клинических испытаний эффективности и безвредности «Стафилолейкина» в иммунотерапии тяжёлого и среднетяжёлого atopического дерматита, осложнённого стафилококковой пиодермией (в дополнение к стандартной фармакотерапии топическими кортикостероидами, антигистаминными препаратами, антибиотиками).

ВЫВОДЫ

1. Разработан оригинальный способ получения низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов из осадка Б – отхода серийного производства противостафилококкового иммуноглобулина. Способ универсален и перспективен для получения цитокиновых препаратов различной направленности из отходов производства специфических иммуноглобулиновых препаратов (против гепатита В, против клещевого энцефалита и др.).
2. Разработаны состав и технология лиофилизированной лекарственной формы «Стафилолейкина». Установленный срок годности препарата составляет 36 месяцев при температуре хранения $(6\pm 2)^\circ\text{C}$.
3. Проведена стандартизация и разработана спецификация на лекарственную форму препарата «Стафилолейкин» - лиофилизат комплекса низкомолекулярных полипептидов с молекулярной массой 5 – 8 кДа и концентрацией белка не более 50 мкг/мл, содержащем одну единицу активности в ампуле. Составлены нормативные документы (лабораторный регламент, проект ФСП).
4. Специфическая активность полученных экспериментально-производственных образцов препарата доказана в тестах переноса гиперчувствительности замедленного типа, а также в иммуноферментном анализе по увеличению аффинности противостафилококковых антител.
5. Установлена иммунотерапевтическая активность «Стафилолейкина» в эксперименте: препарат способствовал излечению стафилококкового гнойного кератита у кроликов и защищал мышей от подострого стафилококкового менингоэнцефалита. «Стафилолейкин» не обладает пирогенными свойствами, ни острой и ни хронической токсичностью, не проявляет провоспалительного действия, не вызывает активации миелопоэза, индуцирует противостафилококковый клеточный иммунитет. Результаты проведенных исследований являются основанием для проведения I фазы клинических испытаний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аффинолейкин – биофармацевтический препарат для инструктивной противомикробной иммунотерапии при недостаточности клеточного иммунитета / А. Н. Мац [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1998. – № 2. – С. 78–83.
2. Аффинолейкин в иммунотерапии атопического дерматита / М. А. Мокроносова [и др.] // Мед. иммунология. – 2002. – Т. 4, № 4–5. – С. 592–600.
3. Аффинолейкин – иммунотерапевтический адъювант при лечении туберкулеза легких у подростков / Л. И. Мордовская [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – № 6. – С. 40–44.
4. Бурков, А. Н. Методология конструирования коммерческих тест-систем для диагностики инфекционных заболеваний : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.09 / А. Н. Бурков. – Москва, 2004. – 37 с.
5. Бухвальд, З. Аллергия замедленного типа и противостафилококковая резистентность – диссоциирующие проявления клеточной иммунореактивности / З. Бухвальд, А. Н. Мац, О. В. Перелыгина // Препараты и методы для лечения и диагностики аллергии. – Москва, 1985. – С. 14–18.
6. Выделение растворимых антигенспецифичных Т-клеточных иммунопротеинов из балластного осадка при производстве препаратов иммуноглобулина / А. Н. Мац [и др.] // Актуальные вопросы вакцинно-сывороточного дела в 21 веке : материалы Всерос. науч. конф., посвящ. 105-летию Перм. науч. производств. об-ния «Биомед». – Пермь, 2003. – С. 135–138.
7. Гамма-глобулин // Руководство по вакцинному и сывороточному делу / Н. В. Холчев [и др.] ; под ред. П. Н. Бургасова. – Москва, 1978. – С. 324–340.
8. Голубцова, О. И. Клинико-иммунологическая эффективность включения «Пневмо 23» и «Аффинолейкина» в терапию рецидивирующего бронхита у детей :

дис. ... канд. мед. наук : 14.00.09 / ЧТУ им. И. Н. Ульянова. – Чебоксары, 2007. – 138 с.

9. Дианова, Д. Г. Иммунодиагностика и иммунокоррекция вторичных иммунодефицитов при вирусных заболеваниях глаз : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.36. – Пермь, 2001. – 21 с.

10. Задионченко, Е. В. Т-(гамма-дельта)-ориентированная иммунотерапия атопического дерматита : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.36 / Е. В. Задионченко. – Москва, 2005. – 111 с.

11. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля. – Москва : Медицина, 1987. – 321 с.

12. Иммунотерапевтическая эффективность Аффинолейкина при атопическом дерматите / Е. В. Задионченко [и др.] // Биопрепараты. – 2004. – Т. 4 (16). – С. 25–31.

13. Клиническая характеристика применения Аффинолейкина и вакцины «Пневмо-23» у детей с рецидивирующими бронхитами / О. И. Голубцова [и др.] // Аллергология. – 2006. – № 3. – С. 29–33.

14. Кусельман, А. И. Иммунотерапевтический препарат «Аффинолейкин» в лечении пневмонии у новорожденных: (пособие для врачей) / А. И. Кусельман, А. Н. Мац, М. Х. Кутбутдинова. – Ульяновск : Изд-во Ульянов. гос. ун-та, 2011. – 44 с.

15. Кусельман, А. И. Иммунотерапия новорожденных с пневмониями / А. И. Кусельман, А. Н. Мац, М. Х. Кутбутдинова // Аллергология и иммунология. – 2003. – Т. 4, № 4. – С. 12–17.

16. Левин, И. Служба крови и препараты плазмы / И. Левин, В. М. Русанов. Международный аналитический обзор. – Москва : Медпрактика, 2007. – 315с.

17. Лечение атопического дерматита с включением Аффинолейкина / И. Б. Трофимова [и др.] // Вестн. последипломного мед. образования. – 2002. – № 1. – С. 47–48.

18. Лечение больных псориазом и атопическим дерматитом с применением препарата тансферфакторной природы под контролем иммунных факторов

воспаления / В. А. Самсонов [и др.] // Эксперим. и клинич. дерматокосметология. – 2004. – № 3. – С 37–40.

19. Мац, А. Н. Концепция низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов и её новые практические приложения / А. Н. Мац, М. Н. Боков, М. Н. Кузьмина // Аллергология и иммунология. – 2008. – № 4. – С. 444–447.

20. Мац, А. Н. Природа «Трансфер-факторной» активности иммунотерапевтического препарата «аффинолейкин» // Биопрепараты. – 2004. – № 4 (16). – С. 7–13.

21. Мац, А. Н. «Трансфер-фактор» – это N-концевая часть «протомера» растворимого Т-клеточного антигенсвязывающего белка // Аллергология и иммунология. – 2005. – № 6 (2). – С. 140–143.

22. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: справочник : в 2 т. Т. 2 / под ред. А. Н. Карпищенко. – Санкт-Петербург : Интермедика, 1999. – 628 с.

23. Местный специфический иммунный ответ на белок А Staphylococcus aureus в лимфоидной ткани миндалин человека / З. Бухвальд [и др.]. – Журн. микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии. – 1985. – № 5. – С. 78.

24. Мокроносова, М. А. Противостафилококковая иммунотерапия у больных атопическим дерматитом // Вестн. дерматологии и венерологии. – 2009. – № 1. – С. 88–95 .

25. Мусалова, Н. М. Клинико-иммунологические особенности хронических средних отитов у больных туберкулезом легких : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.04 / Н. М. Мусалова. – Москва, 2009. – 127 с.

26. Николаева, А. М. Конструирование комбинированных вакцин и иммуноферментных тест-систем для профилактики и диагностики управляемых инфекций (дифтерия, столбняк, коклюш, гепатит В) : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 14.00.36 / А. М. Николаева. – Челябинск, 2003. – 44 с.

27. Оприщенко, С. А. Международные регулирующие документы и стандарты службы крови и производства препаратов плазмы / С. А. Оприщенко, В. В. Захаров, В. М. Русанов. – Москва : Медпрактика-М, 2008. – 464 с.

28. Оприщенко, С. А. Научное обоснование оптимизации обеспечения учреждений здравоохранения Российской Федерации лечебными препаратами донорской плазмы : дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.33 / С. А. Оприщенко. – Москва, 2009. – 249 с.

29. Патент RU 2076715, МПК А61К35/00. Способ получения препарата "аффинолейкин" для противоинойфекционной иммунотерапии / А. Н. Мац [и др.]. – 2076715 ; заявл. 05. 11.1991 ; опубл. 10.04.1997.

30. Протективные свойства противостафилококковых препаратов на модели внутримозговой стафилококковой инфекции у мышей / О. В. Перельгина [и др.]. // Бактериальные антигены. – Москва, 1983. –С. 139–149.

31. Пхакадзе, Т. Я. Оценка эффективности использования автоматизированной ПЦР-системы для выявления метициллинрезистентного и метициллинчувствительного золотистого стафилококка в клиническом материале травматолого-ортопедических больных / Т. Я. Пхакадзе, О. А. Дмитриенко // Клинич. лаборатор. диагностика. – 2013. – № 12. – С. 48–51.

32. Работникова, Г. И. Особенности диагностики, клинического течения и иммунотерапии хламидиоза при хронических воспалительных заболеваниях органов малого таза : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.01 / Г. И. Работникова ; Перм. гос. мед. акад. – Пермь, 2007. – 23 с.

33. РД 42-28-8-89. Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. – Москва, 1989.

34. Эпидемиология резистентности штаммов *S. Aureus*, выделенных от пациентов в ОРИТ российских стационаров: результаты многоцентрового исследования / А. В. Дехнич [и др.]. Клинич. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2008. – Т. 10, № 4. – Р. 333–344.

35. A controlled trial of bovine dialyzable leukocyte extract for cryptosporidiosis in patients with AIDS / A. McMeeking [et al.] / *J. Infect. Dis.* – 1990. – Vol. 161, № 1. – P. 108–112.
36. A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco, 2004–2005 / C. Liu [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 46. – P. 1637–1646.
37. Abdel-Haq, N. Retropharyngeal Abscess in Children: The Rising Incidence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* / N. Abdel-Haq, M. Quezada, B. I. Asmar // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2012. – Vol. 31 (7). – P. 696–699.
38. Acute osteomyelitis in children: the pathogenesis revisited? / J. L. Labbe [et al.] // *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* – 2010. – Vol. 96 (3). – P. 268–275.
39. Adhesin and Superantigen Genes and the Capacity of *Staphylococcus aureus* to Colonize the Infantile Gut / F. L. Nowrouzian [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 204 (5). – P. 714–721.
40. Anderson, G. G. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms / G. G. Anderson, G. A. O'Toole // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2008. – Vol. 322. – P. 85–105.
41. Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in mice / L. P. Tuchscher [et al.] // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76. – P. 5738–5744.
42. Anti-opsonic properties of staphylokinase / S. H. Rooijackers [et al.] // *Microbes Infect.* – 2005. – № 7. – P. 476–484.
43. Anti-staphylococcal humoral immune response in persistent nasal carriers and noncarriers of *Staphylococcus aureus* // N. J. Verkaik [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 199. – P. 625–632.
44. Bubeck Wardenburg, J. Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia / J. Bubeck Wardenburg, O. Schneewind // *J. Exp. Med.* – 2008. – Vol. 205. – P. 287–294.

45. Burnouf, T. Modern plasma fractionation // *Transfus Med Rev.* – 2007. – Vol. 21, № 2. – P. 101–117.
46. Carriage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a cohort of infants in southern Israel: risk factors and molecular features / A. Adler [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48 (2). – P. 531–538.
47. Changing incidence of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* skin abscesses in a pediatric emergency department / A. Pickett [et al.] // *Pediatr. Emerg. Care.* – 2009. – Vol. 25 (12). – P. 831–834.
48. Changing trends in acute osteomyelitis in children: impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections / J. Saavedra-Lozano [et al.] // *J. Pediatr. Orthop.* – 2008. – Vol. 28 (5). – P. 569–575.
49. Clinical and Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Catheter-Related Bacteremia in Children / M. A. Carrillo-Marquez [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2010. – Vol. 29 (5). – P. 410–414.
50. Clinical experience with daptomycin for the treatment of patients with osteomyelitis / K. C. Lamp [et al.] // *Am. J. Med.* – 2007. – Vol. 120 (10, Suppl. 1). – S. 13–20.
51. Clinical trials of dialyzable leukocyte extracts (RCTF-1) in Japan / S. Sasakawa [et al.] // *Institute of Virology Slovak Academy of Sciences.* – Bratislava, 1987. – P. 419–435.
52. Clinical trial of human leukocyte extracts in allergic diseases and the study of their transfer factor content / Y. Likura [et al.] // *Institute of Virology Slovak Academy of Sciences.* – Bratislava, 1987. – P. 460–477.
53. Clinical trial of safety and efficacy of INH-A21 for the prevention of nosocomial staphylococcal bloodstream infection in premature infants J / M. DeJonge [et al.] // *Pediatr.* – 2007. – Vol. 151. – P. 260–265.

54. Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Causing Orbital Cellulitis in Australian Children / V. L. Vaska [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2011. – Vol. 30 (11). – P. 1003–1006.

55. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in acute musculoskeletal infection in children: a game changer / K. L. Vander Have [et al.] // *J. Pediatr. Orthop.* – 2009. – Vol. 29 (8). – P. 927– 931.

56. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in pediatric intensive care unit. / A. M. Milstone [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 16 (4). – P. 647–655.

57. Comparative Effectiveness of Antibiotic Treatment Strategies for Pediatric Skin and Soft-Tissue Infections / D. J. Williams [et al.] // *Pediatrics.* – 2011. – Vol. 128, ISSUE 3. – P. 479–487.

58. Comparison of *Staphylococcus aureus* From Skin and Soft-Tissue Infections in US Emergency Department Patients, 2004 and 2008 / D. A. Talan [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 53 (2). – P. 144–149.

59. Cone, R. E. Soluble T-lymphocyte antigen-specific immunoproteins: a progress report / R. E. Cone, G. M Georgiou, C. H. Little // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). – 2002. – Vol. 227, № 7. – P. 438–444.

60. Corey, G. R. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis: the role of diagnostic evaluation // *Infect. Dis. Clin. Pract.* – 2011. – Vol. 19 (5). – P. 307–312.

61. Cutaneous Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Suburban Community Hospital Pediatric Emergency Department / N. Kairam [et al.] // *J. Emerg. Med.* – 2011. – Vol. 41 (5). – P. 460–465.

62. Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials / A. I. Fattom [et al.] // *Vaccine.* – 2004. – Vol. 22. – P. 880–887.

63. Dialysable leucocyte extracts (transfer factor) as adjuvant therapy for fungal keratitis / Santacruz-Valdes [et al.] // *The American Journal of Case Reports*. – 2010. – № 11. – P. 97–101.

64. Distinctive patterns in the human antibody response to *S. aureus* bacteremia revealed by a prospective and personalized immune proteome approach [Electronic resource] / J. Kolata [et al.] // *Proteomics*. – 2011. – Oct. 11(19). – P. 3914–3927. doi: 10.1002/pmic.201000760. Epub 2011 Sep. 7. – Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21805632>.

65. Distribution of capsular and surface polysaccharide serotypes of *Staphylococcus aureus* / C. Eiff, von [et al.] // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 58. – 297–302.

66. Dumonde, D. C. Eleventh Internationale Congress on Transfer Factors – March 1–4, 1999 – Monterrey, Nuevo Leon, Mexico / D. C. Dumonde, C. H. Kirkpatrick, G. Pizza // *J. Interferon Cytokin Research*. – 2000. – Vol. 20. – P. 439–441.

67. Dvoroznakova, E. Immune response of mice with alveolar echinococcosis to therapy with transfer factor, alone and in combination with albendazole / E. Dvoroznakova, J. Porubcová, Z. Ševčíková // *Parasitology Research*. – 2009. – Vol. 105, № 4. – P. 1067–1076.

68. Dwyer, J. M. Transfer factor in the age of molecular biology: a review // *Biotherapy*. – 1996. – Vol. 9, № 1–3. – P. 7–11.

69. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections as a common cause of hospitalization in United States children / C. R. Frei [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2010. – Vol. 45 (10). – P. 1967–1974.

70. Emergence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage in Children in Cambodia / E. K. Nickerson [et al.] // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2011. – Vol. 84 (2). – P. 313–317.

71. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Blood and Skin and Soft Tissue Infections in the US Military Health System, 2005–2010 *Staphylococcus aureus* in US Military / M. L. Landrum [et al.] // *JAMA*. – 2012. – Vol. 308 (1). – P. 50–59.

72. Ferrara, A. M. Treatment of hospital-acquired pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2007. – Vol. 30 (1). – P. 19–24.

73. Garcia-Lara, J. Anti-*Staphylococcus aureus* immunotherapy: current status and prospects / J. Garcia-Lara, S. J. Foster // *Curr. Opin Pharmacol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 552–557.

74. Hay, R. Panton-Valentine leucocidin and severe *Staphylococcus aureus* infections of the skin: sole culprit or does it have accomplices? / R. Hay, N. M. Noor // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 24 (2). – P. 97–99.

75. Healthcare-associated Versus Community-associated Infective Endocarditis in Children / D. Marom [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2011. – Vol. 30 (7). – P. 585–588.

76. Herpes Murine Model as a Biological Assay to Test Dialyzable Leukocyte Extracts Activity [Electronic resource] / Nohemí Salinas-Jazmín [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2015. – Vol. 2015 (2015), Article ID 146305. – 9 p. – Режим доступа : <http://dx.doi.org/10.1155/2015/146305>.

77. Heterogeneous in vivo expression of clumping factor A and capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*: Implications for vaccine design [Electronic resource] / J. S. Nanra [et al.] // *Vaccine*. – 2009. – May 26; 27(25–26). – P. 3276–3280. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.062. Epub 2009 Feb. 5. – Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

78. Higher prevalence of pharyngeal than nasal *Staphylococcus aureus* carriage in pediatric intensive care units / M. M. Nakamura [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48 (8). – P. 2957–2959.

79. Hink, J. H. Preparation and properties of a heat-treated human plasma protein fraction / J. H. Hink, J. Hidalgo, V. P. Seeberg // *Vox Sang.* – 1957. – Vol. 2, № 3. – P. 174–186.

80. Holtfreter, S. Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus* – the anti-*S. aureus* antibody response. *Int. J. S. Holtfreter, J. Kolata, B. M. Broker // J. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 300. – P. 176–192.

81. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests / I. Verdier [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45. – P. 725–729.

82. In vitro antibacterial activity of bovine dialyzable leukocyte extract / M. Armides Franco-Molina [et al.] // *Immunopharmacol Immunotoxicol.* – 2006. – Vol. 28, № 7. – P. 471–483.

83. Incidence and clinical characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing fasciitis in a large urban hospital / T. C. Lee [et al.] // *Am. J. Surg.* – 2007. – Vol. 194 (6). – P. 809–812. – Discussion : p. 812–813.

84. Incidence of invasive community-onset *Staphylococcus aureus* infections in children in Central New York / M. Suryadevara [et al.] // *J. Pediatr.* – 2010. – Vol. 156 (1). – P. 152–154.

85. Increasing Skin Infections and *Staphylococcus aureus* Complications in Children, England, 1997–2006 / S. Saxena [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 16 (3). – P. 530–533.

86. Induction of antibodies by *Staphylococcus aureus* nasal colonization in young children / N. J. Verkaik [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2010. – Vol. 16. – P. 1312–1317.

87. Inhibitory effects of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* / M. H. Lin [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55 (3) – P. 1021–1027.

88. Innate T-cell immunity in HIV infection: the role of Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes / F. Poccia [et al.] // *Cur. Mol. Med.* – 2002. – Vol. 2, № 8. – P. 769–781.

89. Jamal, N. Necrotizing fasciitis / N. Jamal, S. J. Teach // *Pediatr. Emerg. Care.* – 2011. – Vol. 27 (12). – P. 1195–1199. – Quiz. : p. 1200–1202.

90. Jaramillo, D. Infection: musculoskeletal // *Pediatr. Radiol.* – 2011. – Vol. 41, Suppl 1. – S. 127–134.
91. Kaminkova, J. Transfer factor and repeated otitis media / J. Kaminkova, C. F. Lange // *Cell Immunol.* – 1984. – Vol. 89, № 1. – P. 259–264.
92. Karchmer, A. W. Staphylococcus aureus bacteremia and native valve endocarditis: the role of antimicrobial therapy // *Infect. Dis. Clin. Pract.* – 2012. – Vol. 20 (2) – P. 100–108.
93. Kemper, A. R. Management of skin abscesses by primary care pediatricians / A. R. Kemper, R. J. Dolor, V. G. Jr. Fowler // *Clin. Pediatr., (Phila).* – 2011. – Vol. 50 (6). – P. 525–528.
94. Kern, W. V. Management of Staphylococcus aureus bacteremia and endocarditis: progresses and challenges // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 23 (4). – P. 346–358.
95. Kirkpatrick, Ch. H. Transfer Factors // *Encyclopedia of Immunology.* – Second Edition / eds. : P. J. Delves, I. M. Roitt. – 1998. – Vol. 4. – P. 2385–2389.
96. Kirkpatrick, C. H. Transfer Factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules // *Mol. Med.* – 2000. – Vol. 6 (4). – P. 332–341.
97. Kistler, P. Large scale production of human plasma fractions. Eight years experience with the alcohol fractionation procedure of Nitschmann, Kistler and Lergier / P. Kistler, H. Nitschmann // *Vox Sang.* – 1962. – № 7. – P. 414–424.
98. Lareau, S. M. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus as the most common cause of perineal abscesses / S. M. Lareau, L. Meyn, R. H. Beigi // *Infect. Dis. Clin. Pract.* – 2010. – Vol. 18 (4). – P. 258–260.
99. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network / B. J. Stoll [et al.] // *Pediatrics.* – 2002. – Vol. 111. – P. 85–91.
100. LeClaire, R. D. Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination / R. D. LeClaire, R. E. Hunt, S. Bavari // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70. – P. 2278–2281.

101. Left-sided endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*: a comparison of clinical and prognostic factors of patients with native and prosthetic valve endocarditis / M. L. Fernandez Guerrero [et al.] // *Infect. Dis. Clin. Pract.* – 2010. – Vol. 18 (5). – P. 308–312.

102. Lindsay, J. A. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? / J. A. Lindsay, M. T. Holden // *Trends Microbiol.* – 2004. – № 12. – P. 378–385.

103. Management of Osteoarticular Infections Caused by *Staphylococcus aureus* Is Similar to That of Other Etiologies: Analysis of 199 Staphylococcal Bone and Joint Infections / M. Pääkkönen [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2012. – Vol. 31 (5). – P. 436–438.

104. Methicillin-Resistant and Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Meningitis in Preterm Infants / A. L. Shane [et al.] // *Pediatrics.* – 2012. – Vol. 12. – P. 914–922.

105. Multicenter study to determine antibody concentrations and assess the safety of administration of INH-A21, a donor-selected human Staphylococcal immune globulin, in low-birth-weight infants / E. V. Capparelli [et al.] // *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy.* – 2005. – Vol. 49: – P. 4121–4127.

106. Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry / A. E. Waters [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 52 (10). – P. 1227–1230.

107. Needle aspiration for the etiologic diagnosis of children with cellulitis in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. / F. Patel Wylie [et al.] // *Clin. Pediatr., (Phila).* – 2011. – Vol. 50 (6). – P. 503–507.

108. Nontoxicogenic protein A vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice / H. K. Kim [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2010. – Vol. 207. – P. 1863–1870.

109. Ohlsen, K. Immunotherapeutic strategies to combat staphylococcal infections / K. Ohlsen, U. Lorenz // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 300. – P. 402–410.

110. O'Riordan, K. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides / K. O'Riordan, J. C. Lee // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2004. – Vol. 17. – P. 218–234.

111. Otto, M. How *Staphylococcus aureus* Breaches Our Skin to Cause Infection // *J. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 205 (10). – P. 1483–1485.
112. Otto, M. Novel targeted immunotherapy approaches for staphylococcal infection // *Expert Opin Biol. Ther.* – 2010. – Vol. 10. – P. 1049–1059.
113. Pastacaldi, C. Staphylococci and staphylococcal superantigens in asthma and rhinitis: a systematic review and meta-analysis / C. Pastacaldi, P. Lewis, P. Howarth // *Allergy.* – 2011. – Vol. 66 (4). – P. 549–555.
114. Pat. CA2086610A1 United States, US5840700A. Methods of producing transfer factor / C. H. Kirkpatrick, S. J. Rozzo. – US 08/441,973 ; заявл. 16.05.1995 ; опубл. 24.11.1998.
115. Patti, J. M. Vaccines and immunotherapy for staphylococcal infections // *International Journal of Artificial Organs.* – 2005. – Vol. 28. – P. 1157–1162.
116. Population-based assessment of intensive care unit-acquired bloodstream infections in adults: incidence, risk factors, and associated mortality rate / K. B. Laupland [et al] // *Crit. Care Med.* – 2002. – Vol. 30. – P. 2462–2467.
117. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids / E. Cohn [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1946. – № 68. – P. 459–475.
118. Preparation, characterization, and determination of immunological activities of transfer factor specific to human sperm antigen [Electronic resource] / J. Zhou [et. al.] // *BioMed Research International.* – 2013. – Vol. 2013. – 7 p. : article ID 126923. Режим доступа : <http://dx.doi.org/10.1155/2013/126923>.
119. Preventing *Staphylococcus aureus* bacteremia and sepsis in patients with *Staphylococcus aureus* colonization of intravascular catheters: a retrospective multicenter study and meta-analysis / D. J. Hetem [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2011. – Vol. 90 (4). – P. 284–288.
120. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. / A. Belkum van [et al] // *J. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 199. – P. 1820–1826.

121. Ritz, N. The Role of Panton-Valentine Leukocidin in *Staphylococcus aureus* Musculoskeletal Infections in Children / N. Ritz, N. Curtis // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2012. – Vol. 31 (5). – P. 514–518.

122. Safety and immunogenicity of a booster dose of *Staphylococcus aureus* types 5 and 8 capsular polysaccharide conjugate vaccine (StaphVAX) in hemodialysis patients / A. Fattom [et al.] // *Vaccine.* – 2004. – Vol. 23. –P. 656–663.

123. Sánchez-González, D. J. Transfer factors in medical therapy [Electronic resource] / D. J. Sánchez-González, C. A. Sosa-Luna, I. Vásquez-Moctezuma // *Med. Clin. (Barc).* – 2010. – (17). – URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/term//20561650>.

124. Schaffer, A. C. Staphylococcal vaccines and immunotherapies / A. C. Schaffer, J. C. Lee // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2009. – Vol. 23. – P. 153–171.

125. Schaffer, A. C. Vaccination and passive immunisation against *Staphylococcus aureus* / A. C. Schaffer, J. C. Lee // *J. Antimicrob. Agents.* – 2008. – Vol. 32, Suppl 1. – S. 71–78.

126. Shinefield, H. R. Use of a conjugate polysaccharide vaccine in the prevention of invasive staphylococcal disease: is an additional vaccine needed or possible? // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24, Suppl 2. – P. 9–65.

127. Singh-Grewal, D. Prospective study of the immediate and delayed adverse events following intravenous immunoglobulin infusions / D. Singh-Grewal, A. Kemp, M. A. Wong // *Archives of Disease of Childhood.* – 2006. – Vol. 91. – P. 651–654.

128. Skin and soft tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone / J. K. Johnson [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 13. – P. 1195–1200.

129. Spellberg, B. Skin and soft-tissue infections: modern evolution of an ancient problem // *Clin. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 51 (8). – P. 904–906.

130. Splawski, J. B. Delineation of the functional capacity of human neonatal lymphocytes / J. B. Splawski, D. F. Jelinek, P. E. Lipsky // *Journal of Clinical Investigations.* – 1991. – Vol. 87. – P. 545–553.

131. Staphylococcus aureus-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care / L. F. McCaig [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12. – P. 1715–1723.
132. Staphylococcus aureus capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge / A. I. Fattom [et. al.] // *Infect. Immun.* – 1996. – Vol. 64. – P. 1659–1665.
133. Staphylococcus aureus Infections in Pediatric Oncology Patients: High Rates of Antimicrobial Resistance, Antiseptic Tolerance and Complications / J. C. McNeil [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2012. – Vol. 11. – P. 124–128.
134. Staphylococcus aureus Pneumonia in Children in the Era of Community-acquired Methicillin-resistance at Texas Children's Hospital / M. A. Carrillo-Marquez [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 2011. – Vol. 30 (7). – P. 545–550.
135. Staphylococcus aureus types 5 and 8 capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines / J. B. Robbins [et al.] // *Am. Heart J.* – 2004. – Vol. 147. – P. 593–598.
136. Staphylococcus aureus virulence factors associated with infected skin lesions: influence on the local immune response / P. M. Mertz [et al.] // *Arch. Dermatol.* – 2007. – Vol. 143 (10). – P. 1259–1263.
137. Steele, R. W. Immune modulators as antiviral agents / R. W. Steele, R. K. Charlton // *Clin. Lab. Med.* – 1987. – Vol. 7, № 4. – P. 911–924.
138. Successful use of daptomycin and linezolid, without surgical intervention, in the treatment of extensive epidural abscess and bacteremia due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) / J. W. Lane [et. al.] // *Infect. Dis. Clin. Pract.* – 2011. – Vol. 19 (5). – P. 362–364.
139. Synthesis and immunologic properties in mice of vaccines composed of Staphylococcus aureus type 5 and type 8 capsular polysaccharides conjugated to Pseudomonas aeruginosa exotoxin A / A. Fattom [et. al.] // *Infect. Immun.* – 1990. – Vol. 58. – P. 2367–2374.

140. The epidemiology of and risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections in western Sweden / G. Jacobsson [et al.] // *Scand. J. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 39. – P. 6–13.

141. The impact of the current epidemiology of pediatric musculoskeletal infection on evaluation and treatment guidelines / O. A. Gafur [et al.] // *J. Pediatr. Orthop.* – 2008. – Vol. 28 (7). – P. 777–785.

142. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis / D. Mack [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178. – P. 175–183.

143. The Panton–Valentine leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300 / E. L. Brown [et. al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2009. – Vol. 15. – P. 156–164.

144. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections / H. F. Wertheim [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2005. – № 5. – P. 751–762.

145. Torres, A. Antibiotic Treatment Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Hospital- and Ventilator-acquired Pneumonia: A Step Forward but the Battle Continues // *Clin. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 54 (5). – P. 630–632.

146. Transfer of delayed hypersensitivity to staphylococcal protein A and antistaphylococcal resistance by means of leukocyte ultrafiltrates / N. P. Perepechkina // *Proc. 9th International Workshop on Transfer Factor «Current Researches in Transfer Factor»* / Eds. Huo Baolai, Zou Zhaofen; The National Natural Sciences Fund Committee of China. – Beijing, 1993. –P. 120– 130.

147. Transfer of DTL to SK-SD and tetanus toxoid in BALB mice by Transfer Factor prepared from purified subpopulations-of murine lymphocytes / N. Bhardwaj [et al.] // *Immune Regulators in Transfer Factor.*– New-York [ets.], 1979. – P. 285.

148. Treatment of cryptosporidiosis with oral bovine transfer factor / E Louie [et al.] // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1987. – Vol. 44, № 3. – P. 329–334.

149. Treatment of gram-positive nosocomial pneumonia. Prospective randomized comparison of quinupristin/dalfopristin versus vancomycin. Nosocomial Pneumonia Group / J. Fagon [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 161 (3, Pt. 1). – P. 753–762.

150. Tropical pyomyositis and necrotizing fasciitis / H. Chou [et al.] // *Semin. Musculoskelet Radiol.* – 2011. – Vol. 15 (5). – P. 489–505.

151. Ultrasound soft-tissue applications in the pediatric emergency department: to drain or not to drain? / D. Ramirez-Schrempp [et al.] // *Pediatr. Emerg. Care.* – 2009. – Vol. 25 (1). – P. 44–48.

152. Use of a *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis / H. Shinefield [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 346. – P. 491–496.

153. Vaccine review: “*Staphylococcus aureus* vaccines: problems and prospects” / K. U. Jansen [et al.] // *Vaccine.* – 2013. – № 31. – P. 2723–2730.

154. WHO Recommendation for the production, control and regulation of human plasma for fractionation [Electronic resource]. – Fifty-sixth Report, 2007. – Электрон. дан. – Режим доступа: // <http://www.who.int/biologicals/expertcommittee/Full%20Text%20TRS941.pdf>.

155. Yung, S. C. Host chemokines bind to *Staphylococcus aureus* and stimulate protein A release / S. C. Yung, D. Parenti, P. M. Murphy // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 7. – P. 5069–5077.

ПРИЛОЖЕНИЕ

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебно-воспитательной работе
ГБОУ ВПО «Пермская государственная
фармацевтическая академия» Минздрава России,
доцент, к.ф.н.  А.Ю.Турышев
«19» февраля 2015 г.

АКТ

внедрения результатов диссертационной работы

Афанасьевой Татьяны Михайловны

на тему «Противостафилококковый препарат «Стафилолейкин»: технология получения, иммунобиологическая характеристика» в учебный процесс кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии.

Объект внедрения: результаты научных исследований соискателя Афанасьевой Т.М. по разработке технологии получения противостафилококкового препарата на основе антигенспецифичных цитокинов «Стафилолейкин».

Разработчики: соискатель Афанасьева Т.М., ассистент кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Сперанская В.Н., профессор кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Николаева А.М.

Пользователи: слушатели факультета дополнительного профессионального обучения Пермской государственной фармацевтической академии.

Когда внедрено: февраль 2015 года.

Эффективность внедрения: материалы диссертационной работы включены в лекционный материал Дополнительной профессиональной программы повышения квалификации.

Зав. кафедрой промышленной технологии лекарств
с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО ПФФА,
профессор, д.ф.н.



 Е.В. Орлова

Методист курса биотехнологии
ГБОУ ВПО ПФФА, к.ф.н.

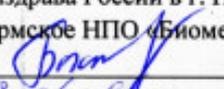


 Ю.В. Сорокина

Подпись
заверено:

 Орловой Е.В. и  Сорокиной Ю.В.
(нач. отдела кадров)

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора по производству
филиала ФГУП «НПО «Микроген»
Минздрава России в г. Пермь
«Пермское НПО «Биомед»,
 И.А. Бахтин
«10» февраля 2015 г.

АКТ

внедрения в производство филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» результатов диссертационной работы Афанасьевой Татьяны Михайловны «Противостафилококковый препарат «Стафилолейкин»: технология получения, иммунобиологическая характеристика».

Разработана технология получения цитокинового препарата противостафилококковой направленности из отхода производства иммуноглобулина человека антистафилококкового-осадка Б. Указанная технология может использоваться при получении цитокиновых препаратов различной направленности в зависимости от специфичности сырья.

Разработаны проекты нормативной документации на препарат «Стафилолейкин».

Данная технология апробирована в цехе иммуноглобулинов, получены экспериментально-производственные серии препарата «Стафилолейкин». Внедрение в производство новой технологии позволит более полно использовать донорское сырье и расширить ассортимент препаратов крови.

Главный технолог
филиала ФГУП «НПО «Микроген»
Минздрава России в г. Пермь
«Пермское НПО «Биомед», к.ф.н



Л.Б. Шилова

Начальник отдела контроля качества
филиала ФГУП «НПО «Микроген»
Минздрава России в г. Пермь
«Пермское НПО «Биомед», к.м.н.



А.Б. Перевозчиков

Личные подписи Шиловой Людмилы Борисовны и Перевозчикова Антона Борисовича заверяю:



