

Мелихова Александра Вадимовна

**Разработка технологии приготовления сухих дозированных
форм комплексного иммуноглобулинового препарата**

03.01.06. Биотехнология
14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА - 2010

Работа выполнена в Федеральном Государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор	Алёшкин Владимир Андрианович
доктор биологических наук	Лютов Андрей Германович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор	Козлов Леонид Васильевич
доктор медицинских наук, профессор	Макаров Владимир Александрович

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2010г. в _____ час. на заседании Диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном Государственном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального Государственного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан «_____» _____ 2010г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

О.Ю. Борисова

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. В настоящее время клиницисты уделяют все больше внимания иммуноглобулиновым препаратам. Этому способствует постоянно регистрируемый рост иммунодефицитных состояний, вызываемых неблагоприятным взаимодействием организма с внешней средой, и появлением резистентности микроорганизмов к антибиотикам. В этой ситуации к перспективным лечебным средствам относится уже существующий и показавший высокую эффективность при лечении диарейных заболеваний комплексный иммуноглобулиновый препарат (КИП) (Алешкин В.А, Лютов А.Г., 2003).

Комплексный иммуноглобулиновый препарат для парентерального применения был разработан на базе лаборатории биохимии МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского под руководством проф. Н. В. Холчева в 70-х годах (Борисова И.В., Холчев Н.В.,1986). В 90-х годах В.А. Алёшкиным было предложено пероральное применение КИП, и препарат был внедрен в клиническую практику. В настоящее время КИП широко применяется для профилактики и терапии острых кишечных инфекций (ОКИ) и ряда других заболеваний (Алешкин В.А., Борисова И.В., Феклисова Л.В.,1997).

Имуноглобулины трех классов IgG, IgA, IgM, входящие в состав КИП, обеспечивают его высокий терапевтический эффект при оральном и ректальном применении, что было убедительно продемонстрировано клиницистами в течение 20 лет. В связи с высоким уровнем заболеваемости ОКИ, участвовавшими тяжелыми и затяжными формами инфекционного процесса, комплексный иммуноглобулиновый препарат используется все шире. Есть данные о том, что КИП эффективен не только для детей первых лет жизни, как считалось ранее, но и для взрослых, имеется опыт применения при ОРЗ (Грачёва Н. М., 2003).

В настоящее время КИП выпускается в единственной лекарственной форме в виде сухой субстанции в стеклянных флаконах. В связи с этим более перспективной лекарственной формой являются таблетки и капсулы, которые имеют ряд преимуществ: удобство применения, хранения и транспортировки; маскировка специфического вкуса сывороточных белков; возможность защиты от действия неблагоприятных факторов ЖКТ.

Существующая технология производства КИП характеризуется длительностью, многостадийностью и имеет ряд недостатков, делающих ее непригодной для приготовления твердых дозированных форм препарата. В частности, на стадии выделения иммуноглобулинов в качестве основного фракционирующего агента используется органический растворитель – хлороформ в концентрации, обуславливающей

необходимость соблюдения особых условий, усложняющих проведение процесса. Сублимационное обезвоживание препарата в стеклянных флаконах чрезмерно продолжительно (до 2 суток) и не предусматривает возможности получения сухой субстанции КИП в количествах, необходимых для производства твердых дозированных форм (таблетки, капсулы).

В последние годы особое внимание уделяется биологической безопасности препаратов, получаемых из биологических жидкостей человека, и методам их стерилизации. Наиболее экономически выгодным и наиболее щадящим из всех существующих методов стерилизации препаратов, признан метод с использованием γ -облучения (Кузин А.М., Каушанский Д.А., 1981). Однако отсутствуют сведения о возможности применения его для обработки сухого КИП.

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности разработки усовершенствованной технологии получения комплексного иммуноглобулинового препарата и создания новых лекарственных форм.

Цель исследования: разработка технологии получения сухой субстанции КИП, пригодной для создания твердых дозированных лекарственных форм препарата, и оценка терапевтической эффективности КИП в таблетках и капсулах на обезьянах, страдающих ОКИ.

Задачи исследования:

1. Предложить критерии оценки качества осадков “Б”, получаемых на различных предприятиях по производству иммуноглобулина по методу Кона, как исходного сырья для приготовления КИП.
2. Изучить возможность использования солей двухвалентных металлов для выделения фракций, содержащих три основных класса иммуноглобулинов, и предложить оригинальную технологию получения субстанции КИП.
3. Оценить возможность интенсификации процесса сублимационного обезвоживания КИП с подбором необходимых стабилизаторов для сохранности физических и биологических свойств полученного материала.
4. Исследовать возможность стерилизации субстанции КИП методом гамма-облучения, оценить его влияние на биологическую активность, микробиологическую чистоту и биологическую безопасность.
5. Изучить механическую устойчивость иммуноглобулинов в сухой субстанции и приготовить различные лекарственные формы препарата (во флаконах, таблетках и капсулах).

6. Провести оценку токсичности всех полученных лекарственных форм препарата КИП на мышах и изучить безвредность и лечебную эффективность на обезьянах, больных ОКИ.

Научная новизна

Впервые показано, что соли двухвалентных металлов могут быть использованы для одновременного выделения иммуноглобулинов трех основных классов IgG, IgA и IgM. При этом фракционирование возможно из концентрированных субстанций, к которым, в частности, относится осадок Б. Наиболее эффективным фракционирующим агентом с точки зрения полноты выделения антител и чистоты получаемой фракции является сульфат меди.

Экспериментально обоснован выбор из ряда веществ различной природы (сахара, аминокислоты) стабилизирующих компонентов, определены их сочетания и концентрации, оказывающие наибольший защитный эффект от действия на иммуноглобулины неблагоприятных факторов технологических процессов переработки сухой субстанции КИП, приготовления готовых форм препарата и их хранения.

Впервые показано, что повышение температуры греющей поверхности полки до 55°C на этапе сублимации влаги из лиофильно высушиваемого препарата не оказывает негативного влияния на специфические свойства иммуноглобулинов, что вносит коррективы в существующее представление об их слабой устойчивости к обезвоживанию.

Предложена стерилизация сухой субстанции КИП гамма-облучением. Доза поглощенной радиации 20 кГр вызывает, в зависимости от вида использованных защитных веществ, потерю антисальмонеллезной активности иммуноглобулинов на 1-3 двукратных разведения и может приводить к изменению соотношения классов иммуноглобулинов. Наибольший защитный эффект оказывает комбинация 1% глицина и 2% глюкозы.

Впервые проведенные исследования по созданию твердых дозированных форм КИП дают представление о степени механоустойчивости антител в сухом состоянии. Установлено, что воздействие физико-механических факторов, возникающих в процессе разрушения сухой субстанции КИП при ее измельчении и в ходе прессования таблеточной смеси при изготовлении таблеток, сопровождается снижением специфической активности иммуноглобулинов не более чем на одно двукратное разведение, но не оказывает влияния на соотношение классов иммуноглобулинов в препарате.

В экспериментах на обезьянах, больных острой кишечной инфекцией с диарейным синдромом, впервые показано, что разработанные твердые дозированные формы КИП - таблетки и капсулы обладают терапевтической эффективностью, не уступающей таковой

препарата, выпускаемого в настоящее время в виде сухой массы во флаконах, и достоверно превосходят эффективность антибиотикотерапии.

Практическая значимость

Предложены критерии оценки осадков Б с целью их дополнительного использования в качестве сырья для производства комплексного иммуноглобулинового препарата.

Использование сульфата меди на стадии выделения иммуноглобулинов из осадка Б, как основного фракционирующего агента, а экстрагента липидов и липопротеидов – хлороформа в концентрации не более 1%, исключает необходимость соблюдения особых условий проведения процесса, что, в свою очередь, обеспечивает снижение трудоемкости и повышение рентабельности всей технологии приготовления препарата.

Экспериментально обоснованный выбор состава и концентрации защитных компонентов обеспечивает стабильность специфических свойств иммуноглобулинов во всех разработанных лекарственных формах препарата в течение более 2 лет хранения.

Интенсификация подвода тепла к высушиваемому препарату на этапе сублимации влаги позволяет сократить длительность не только этого этапа, но и всего процесса высушивания КИП в 2,7 раза до 14 часов.

Доказана принципиальная возможность использования γ -стерилизации для иммуноглобулинсодержащих препаратов, что способствует расширению сферы применения данного метода.

Сухая субстанции КИП позволяет приготовить твердые дозированные формы препарата, что удобно в использовании и способствует расширению сферы его применения.

Лекарственные формы комплексного иммуноглобулинового препарата, приготовленные по разработанной технологии, показали эффективность лечения обезьян, больных диарейными заболеваниями, в питомнике ГУ НИИ медицинской приматологии РАМН. Рекомендовано проведение клинических испытаний готовых лекарственных форм комплексного иммуноглобулинового препарата - капсул, таблеток, флаконов на людях.

Внедрение результатов работы

На базе лаборатории медицинской биотехнологии ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора разработаны и приготовлены экспериментальные серии комплексного иммуноглобулинового препарата во флаконах, таблетках и капсулах.

На основании проведенных исследований оформлены шесть патентов на изобретения:

1. Патент РФ № 2189833, А61К 39/395. Способ получения иммуноглобулинового препарата / А.В. Зорик, В.А. Алешкин, А.Г. Лютов, И.В. Борисова. Зарегистрирован в

Государственном реестре изобретений Российской Федерации 19 октября 2000 г. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

2. Патент РФ № 2255766, МПК А61К 39/395. Способ получения иммуноглобулинового препарата для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций, иммуноглобулиновый препарат для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций (варианты) и суппозитории на основе иммуноглобулинового препарата / Алешкин В.А., Новикова Л.И., Афанасьев С.С., Борисова И.В., Зуева М.М., Зорик А.В. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 5 марта 2003 г. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

3. Патент РФ № 2247578, МПК А61К 39/395. Состав, обладающий противомикробным действием / Мелихова А.В., Алешкин В.А., Давыдкин В.Ю., Давыдкин И.Ю., Афанасьев С.С., Борисова И.В., Рубальский О.В., Гаврин А.Г. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 10 марта 2005 г. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

4. Патент РФ № 2334503, МПК А61J 3/10. Способ таблетирования медицинских иммунобиологических препаратов / Давыдкин И.Ю., Алешкин В.А., Давыдкин В.Ю., Рубальский О.В., Гаврин А.Г., Мелихова А.В., Афанасьев С.С. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 27 сентября 2008 г. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

5. Патент РФ № 2371200, МПК А61К 39/395. Способ получения иммуноглобулинового препарата / Мелихова А.В., Давыдкин В.Ю., Алешкин В.А., Давыдкин И.Ю. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 27 октября 2009 г. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

6. Патент РФ № 2371199, МПК А61К 39/395. Способ получения иммуноглобулинового препарата / Мелихова А.В., Давыдкин В.Ю., Алешкин В.А., Давыдкин И.Ю. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 27 октября 2009 г. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Результаты исследований используются в научно-практической работе ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Экспериментальные серии препаратов КИП прошли успешные испытания при лечении больных ОКИ обезьян в питомнике ГУ НИИ медицинской приматологии РАМН

(г. Сочи – Адлер) под руководством академика РАМН, профессора Б.А. Лапина и доктора медицинских наук, профессора Э.К. Джикидзе. Оформлен акт о доклинических испытаниях от 9 апреля 2009 г.

Метод определения ионов меди используется в лаборатории медицинской биотехнологии ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора с 2001 года для определения качества комплексного иммуноглобулинового препарата.

Методика доклинических испытаний биопрепаратов, разработанная в ходе выполнения работы совместно с сотрудниками ГУ НИИ медицинской приматологии РАМН, легла в основу разработки «Новые алгоритмы доклинических испытаний неинъекционных иммунобиологических препаратов и БАД», награжденной серебряной медалью VII Московского международного салона инноваций и инвестиций на ВВЦ (Москва) в 2007 г.

Положения, выносимые на защиту:

1. Критериями качества осадков Б как сырья для производства комплексного иммуноглобулинового препарата являются концентрации общего белка и иммуноглобулинов, распределение иммуноглобулинов по классам IgG, IgA, IgM, титр антител к сальмонеллам, а также производный показатель, характеризующий долю иммуноглобулинов от общего белка.

2. Разработанный способ получения комплексного иммуноглобулинового препарата включает последовательную обработку гомогенизата осадка Б (III фракция по Кону) хлороформом и сульфатом меди, выделение иммуноглобулиновой фракции методом ультрафильтрации в присутствии комплексообразующего соединения с последующим концентрированием и возможным осаждением фракции полиэтиленгликолем, растворение осадка иммуноглобулинов, стабилизацию и стерилизующую фильтрацию.

3. Сухая субстанция комплексного иммуноглобулинового препарата пригодна для приготовления капсульной и таблетированной форм с использованием метода стерилизации γ -облучением.

4. Комплексный иммуноглобулиновый препарат во флаконах, таблетках и капсулах, приготовленный по разработанной технологии с использованием в качестве фракционирующего агента сульфата меди, нетоксичен, безвреден и обладает терапевтическим эффектом при лечении острой кишечной инфекции с диарейным синдромом у обезьян.

Апробация работы

Диссертация апробирована на заседании секции Ученого Совета ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора «Медицинская биотехнология», протокол № 3 от 10 июня 2009 г.

Основные положения диссертационной работы доложены на: Российской конференции “Организм и окружающая среда: жизнеобеспечение и защита человека в экстремальных условиях”, Москва, 2000; научно-практической конференции «Медицина будущего», Краснодар-Сочи, 2002; Международной научно-практической конференции памяти Г.И.Гончаровой «Пробиотические микроорганизмы – современное состояние вопроса и перспективы использования», Москва, 2002; IX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 2002; 1-м международном Конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития», Москва, 2002; Третьей международной конференции, посвященной 80-летию института имени Пастера, «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями», Санкт-Петербург, 2003; Научно-практической конференции «Иммуноглобулиновые препараты энтерального и внутривенного применения», Москва, 2003; XI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 2004; Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства», Йошкар-Ола, 2005; Международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии в опытах на обезьянах», Сочи-Адлер, 2007.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 25 печатных работ, в том числе: 1 в издании, рекомендованном ВАК Российской Федерации, 2 - в периодических изданиях, 2 - в сборник научных трудов, 14 - в материалах конференций, 6 патентов на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 152 страницах, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 31 таблицей и 8 рисунками. Список литературы включает 159 работ, в том числе 102 - отечественных и 57 - иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалы. В качестве сырья для получения комплексного иммуноглобулинового препарата использовали осадок Б. Осадки Б были получены с шести предприятий по производству препаратов крови: Областной станции переливания

крови, г. Иваново; Предприятия по производству препаратов крови НИИЭМ им. Пастера, г. Санкт-Петербург; ОАО «Биомед» им И.И. Мечникова; ГУП по производству бактериальных препаратов им. Г.Н. Габричевского, г. Москва; Предприятия по производству бактериальных и иммунобиологических препаратов, г. Казань; Предприятия «Имбио», г. Нижний Новгород.

Для осаждения белков применяли полиэтиленгликоль (полиэтиленоксид) 4000 и 6000 (ТУ 2483-166005757587-2000 или ФС 42-1110-72), сульфат меди, сульфат цинка, хлороформ.

Животные. Испытания острой токсичности комплексного иммуноглобулинового препарата проведены на 50 беспородных белых мышах обоих полов с исходной средней массой 35 г.

Изучение переносимости и терапевтической эффективности лекарственных форм препарата проводили на обезьянах на базе ГУ НИИ медицинской приматологии РАМН (г. Сочи – Адлер). В исследованиях использовали обезьян вида макак резус и макак яванский весом 3,5-9,8 кг в возрасте от 1 до 10 лет. Использовано 15 здоровых и 35 больных острой кишечной инфекцией с диарейным синдромом приматов.

При анализе сырья и выделенной иммуноглобулиновой фракции использовали:

Иммунохимические методы

Преципитацию в геле по Оухтерлони проводили в 1 %-ном агаре, используя при этом моноспецифические антисыворотки к IgG, IgA, IgM человека.

Иммуноэлектрофорез (ИЭФ) проводили в 1,5 %-ном агаре на стеклянной пластине размером 9×12 см на аппарате «Multifor» (ЛКВ, Швеция) в течение 1-1,5 ч при силе тока 40 мА и напряжении 200 В. По окончании электрофореза из траншей вынимали агар, заливали соответствующие антисыворотки и оставляли пластину во влажной камере при комнатной температуре в течение 18-24 часов для инкубации. Окончательный учет результатов проводили после окрашивания пластины.

Определение концентрации иммуноглобулинов в образцах проводили методом радиальной иммунодиффузии (РИД) по Манчини в 1 % агарозе. Подсчет результатов проводили с помощью прикладной программы для персональных компьютеров (РИД-3 и РИД-4), разработанной профессором Козловым Л.В. (МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского).

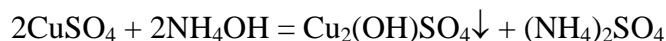
Определение антисальмонеллезной и антишигеллезной активности осуществляли в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с помощью соответствующих диагностикумов согласно инструкциям производителя.

Химические методы

Определение сульфат-ионов осуществляли с помощью раствора BaCl_2 . При добавлении BaCl_2 к белковому раствору, содержащему SO_4^{2-} , образуется осадок белого цвета:

$$\text{SO}_4^{2-} + \text{Ba}^{2+} = \text{BaSO}_4 \downarrow$$

Качественное определение ионов меди основано на способности меди образовывать с аммиаком нерастворимое комплексное соединение голубого цвета:



При добавлении раствора аммиака по каплям к белковому раствору, содержащему ионы меди, образуется осадок голубого цвета.

Количественное определение ионов меди проводили с помощью тиосульфата натрия. Для этого к 5 мл раствора белковой фракции добавляли 0,4 мл 20% серной кислоты, перемешивали, к смеси прибавляли 0,3 г иодида калия. Раствор титровали 0,1 Н раствором тиосульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (7,9 г на 1 л H_2O) до изменения окраски. Концентрация присутствующих в растворе ионов меди рассчитывалась согласно объему использованного тиосульфата натрия.

Физические методы

Удаление низкомолекулярных примесей, диализ и концентрирование белковых растворов осуществляли методом ультрафильтрации. Раствор подавался под определенным давлением на мембрану-фильтр, вследствие чего молекулы вещества, у которых величина меньше диаметра пор фильтра, проходили через мембрану, крупные же молекулы оставались в растворе. Ультрафильтрацию проводили на установке Pellicon MSA – T (Millipore, США) с использованием мембран, задерживающих молекулы с массой выше 10000 и 20000 дальтон.

Гравитационное разделение материалов проводили на центрифугах РС-6 (Россия), К-24D и К-70D (MLW, Германия). Высушивание белковых растворов осуществляли в сублимационной установке LZ-9.2 (Frigera, Чехия).

Остаточную влажность различных материалов определяли гравиметрически, выдерживанием навесок в сухо-жаровом шкафу при 80 °С до постоянной массы.

Измельчение сухой субстанции КИП осуществляли в электромагнитном измельчителе на основе линейных индукторов ЕММ-0,2 (ОКБА, г. Йошкар-Ола).

Таблеточную смесь готовили смешением в заданных соотношениях измельченной сухой субстанции препарата с наполнителем - сахарным гранулятом, тальком и стеаратом кальция в барабанном смесителе СБ-50 (ОКБА, г. Йошкар-Ола).

Таблетки КИП прессовали на однопуансонном салазочном прессе РТ-1 с диаметром пуансона 12 мм (МСЗ, г. Мариуполь).

Приготовление твердых желатиновых капсул с измельченным порошком КИП осуществляли в ручной фармацевтической машине МС-2 Type 1 (Perni, Италия) по инструкции изготовителя.

Планирование эксперимента и статистическая обработка результатов

Планирование эксперимента осуществляли по Зейделю-Гауссу. При определении оптимума выхода по двум факторам использовали экспрессный метод. Вначале, зафиксировав значение одного фактора на любом уровне, изучали зависимость выхода от другого и устанавливали частный оптимум по данному фактору. Далее, зафиксировав второй фактор на оптимальном уровне и варьируя значения первого фактора, находили по нему оптимум выхода. Предполагалось, что оптимум по первому фактору, найденный при значении второго фактора, соответствующем частному оптимуму по второму, является истинным оптимумом по двум факторам.

Для оценки достоверности различий средних величин при сравнении независимых совокупностей вариант использовали непараметрический критерий U (критерий Мэнн-Уитнея, Уайта или Вилкоксона для независимых совокупностей). Преимуществом метода является возможность сравнения выборок с полуколичественными данными и различающимся числом вариант.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение существующей технологии получения КИП выявило проблему оценки качества исходного сырья. Это объясняется тем, что хотя γ -глобулин производится по единой технологии, балластные осадки «Б», получаемые на различных предприятиях и являющиеся сырьем для получения комплексного иммуноглобулинового препарата, существенно отличаются по составу из-за технического состояния, режимных параметров работы технологического оборудования конкретного производства и других факторов.

Анализ 29 осадков, полученных с 6 предприятий по получению гамма-глобулина по методу Кона, показал их значительные различия по всем измеренным характеристикам. Из этих осадков для прогнозирования возможного результата приготовления комплексного иммуноглобулинового препарата были выбраны несколько и рассчитаны характеристики препарата, который может быть получен из каждого образца осадка.

Прогноз возможного результата выделения иммуноглобулиновой фракции осуществляли расчетным методом, исходя из требований действующей фармакопейной статьи, в соответствии с которой КИП должен содержать белка - не менее 5,5-6,5 % (55-65 мг/мл), иммуноглобулинов - не менее 97% (53-63 мг/мл), распределение

иммуноглобулинов по классам должно быть в пределах: IgG – (50-70)%, IgA – (15-25)%, IgM – (15-25)%, а титр антител к сальмонеллам - не менее 1:320.

Расчеты были проведены для «идеальных» условий, исходя из того, что все количество иммуноглобулинов, исходно присутствующих в сырье, перейдет в готовый продукт, т.е. без учета неизбежных потерь в процессе фракционирования и выделения. В связи с этим ориентировались на минимальные допустимые концентрации общего белка и иммуноглобулинов в препарате.

Результаты расчетов показали (табл. 1), что из 6 осадков, отобранных методом случайной выборки, сырьем для выделения иммуноглобулиновой фракции с характеристиками, соответствующими требованиям ФС, могут являться только 4. В образцах под номером 8 и 23 содержание IgM и IgA соответственно было ниже минимально допустимой величины (15%). Расчетный выход иммуноглобулиновой фракции в осадках 1 и 18, содержащих общего белка около 20 мг/мл и иммуноглобулинов менее 10 мг/мл, не превысил 18%, что свидетельствует о нецелесообразности использования этих осадков по экономическим соображениям.

Таблица 1. Ожидаемые характеристики КИП в случае его получения из соответствующего осадка Б

Характеристики образцов исходного сырья (осадков Б)							Расчетные характеристики КИП						
№ осадка	Общий белок, мг/мл	Содержание Ig, мг/мл	Распределение Ig, %			Титр антител к сальмонеллам в РПГА	Общий белок, мг/мл	Содержание Ig, мг/мл	Распределение Ig, %			Титр антител к сальмонеллам в РПГА	Выход, %
			IgG	IgA	IgM				IgG	IgA	IgM		
1	20,4	9,5	52,0	32,0	16,0	1:160	55,0	53,0	52,0	32,0	16,0	1:880	17,9
8	28,6	16,3	69,0	21,3	10,7	1:320	55,0	53,0	69,0	21,3	10,7	1:1040	30,7
9	34,6	20,2	52,7	21,7	25,6	1:640	55,0	53,0	52,7	21,7	25,6	1:1696	37,7
18	20,8	7,8	41,9	35,8	22,3	1:320	55,0	53,0	41,9	35,8	22,3	1:2174	14,7
22	47,0	29,6	50,0	30,2	19,8	1:640	55,0	53,0	50,0	30,2	19,8	1:1145	55,8
23	34,0	18,8	75,5	7,5	17,0	1:160	55,0	53,0	75,5	7,5	17,0	1:453	35,2

Следует учитывать, что при выделении из осадка Б и очистке Ig-фракции ее специфическая активность, с одной стороны, возрастает за счет удаления балластных веществ и увеличения концентрации антител. С другой стороны, при последующей технологической переработке (обезвоживании, стерилизации) биологическая активность препарата может снижаться.

На основании проведенных исследований были обоснованы качественные показатели сырья, обеспечивающие получение иммуноглобулиновой фракции с заданными характеристиками: концентрация белка - не менее 25 мг/мл; концентрация иммуноглобулинов – не менее 15 мг/мл; соотношение Ig и общего белка - 1:2; распределение иммуноглобулинов по классам (%) IgG:IgA:IgM - (75-50):(25-15):(25-15); титр антител к сальмонеллам - не менее 1:160.

Таким образом, из первоначально отобранных 29 осадков, пригодными для получения иммуноглобулиновой фракции с заданными характеристиками оказались 15.

Разделение иммуноглобулинов и примесных белков возможно двумя путями: первый - выделением иммуноглобулинов в виде осадка; второй - осаждением примесных белков, при этом иммуноглобулины остаются в надосадочной жидкости.

Второй вариант представлялся более предпочтительным, поскольку в этом случае молекулы иммуноглобулинов, находящиеся в жидкой фазе и не меняющие своей конформации, должны подвергнуться наименьшему негативному воздействию. Анализ данных литературы показал, что вариант проведения процесса фракционирования с осаждением примесных белков возможен при использовании в качестве осадителей солей двухвалентных металлов. Их применение могло также дать такие преимущества, как малый расход реагента, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании, возможность проведения процесса при комнатной температуре.

На основании результатов предварительных исследований из двух видов солей двухвалентных металлов – сульфатов цинка и меди был выбран последний, как обеспечивающий более полное удаление примесей из иммуноглобулиновой фракции. В результате дальнейшего изучения влияния на процесс фракционирования концентрации сульфата меди, pH и температуры реакционной смеси, была разработана лабораторная схема выделения иммуноглобулиновой фракции из осадка Б. Введение дополнительных стадий позволило предложить схему, пригодную для препаративного получения раствора КИП (**рис.1**), основанную на последовательной обработке гомогенизированного осадка Б хлороформом до конечной концентрации 1-3 % с целью удаления липидов низкой и высокой плотности, и раствором сульфата меди до конечной концентрации 0,006-0,012 % для осаждения примесных белков из иммуноглобулиновой фракции, очистке иммуноглобулиновой фракции от низкомолекулярных примесей ультрафильтрацией с последующим концентрированием и возможным осаждением иммуноглобулиновой фракции 12 % полиэтиленгликолем, растворением осадка иммуноглобулинов до конечной

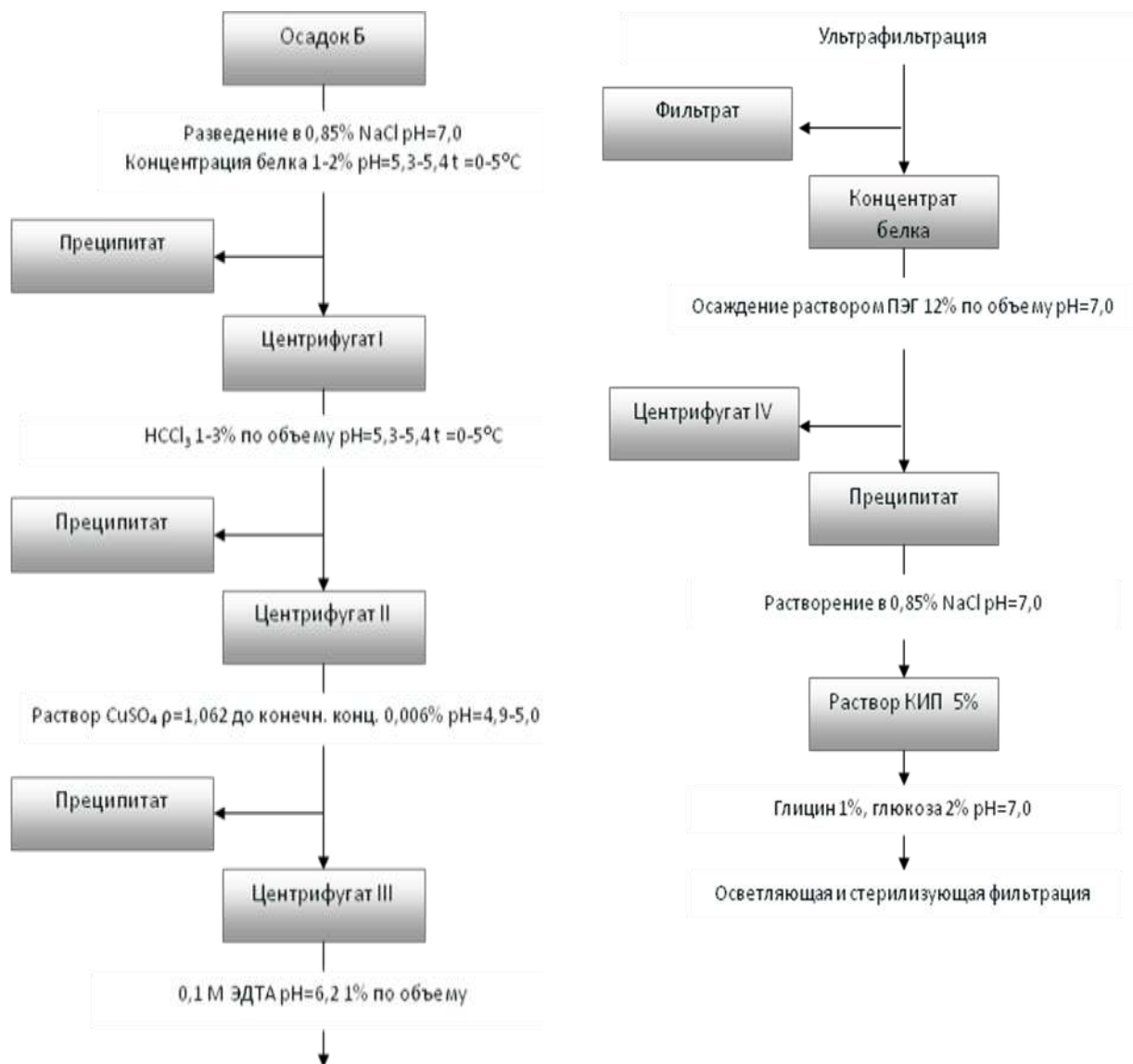


Рис. 1. Препаративная схема выделения КИП.

концентрации белка 5 %, стабилизацией и стерилизующей фильтрацией раствора КИП (защищено патентом РФ №2189833 от 27.09.2002; патентом РФ №2371200 от 27.10.2009; патентом РФ № 2371199 от 27.10.2009). Стерилизующую и осветляющую фильтрации проводили через мембранные фильтры с диаметром пор 0,80 и 0,22 мкм соответственно. Полученный раствор комплексного иммуноглобулинового препарата анализировали, замораживали и хранили при температуре минус 30 °С.

Далее была проведена серия экспериментов по переходу от лабораторного уровня к опытно-промышленному, результаты которых показали (**табл. 2**), что с увеличением объемов реакционной смеси до 2, 10 и 50 л существенных изменений качественных характеристик выделенных иммуноглобулиновых фракций не происходило.

Таблица 2. Показатели качества КИП при использовании реакторов различной

вместимости

Объем реакционной смеси, л	Общий белок, мг/мл	Содержание Ig, мг/мл	Доля примесных белков, %	Соотношение иммуноглобулинов, %			Антисальмонеллезная активность, / титр РПГА	Удельная активность	Общие липиды мг/мл
				IgG	IgA	IgM			
0,05	7,7±1,7	7,5±1,7	1,9±0,9	62,6±6,7	21,2±6,1	15,4±3,4	135±95	17,4±10,6	0,08±0,1
2	45,2±10,0	46,9±13,9	2,3±1,0	56,5±9,2	19,4±9,2	21,1±8,1	924±337	24,2±10,3	0,41±0,2
10	35,2±0,2	34,1 ±0,2	2,9±0,1	65,0±1,7	19,7±4,0	15,3±2,3	640	18,5±0,2	0,62±0,8
200	40,8	39,5	3,0	66,0	18,0	16,0	640	15,9	0,42

Учитывая вышеизложенное, разработанный метод получения комплексного иммуноглобулинового препарата может быть предложен для внедрения в производство.

Следующий этап исследований заключался в подборе оптимальных стабилизаторов для сохранения физико-химических и биологических свойств выделенной иммуноглобулиновой фракции. Было изучено влияние различных стабилизаторов на сохранение основных свойств иммуноглобулинов в препарате (табл. 3).

Таблица 3. Сравнительная характеристика КИП до и после сублимационного высушивания в присутствии стабилизирующих добавок

Препарат	Вид стабилизатора	Основные характеристики КИП				
		Общий белок, мг/мл	Антисальмонеллезная активность, титр РПГА	Соотношение Ig, %		
				IgG	IgA	IgM
Исходный жидкий	Нет	40,8	1:640	61	19	20
После сушки	Нет	31,5	1:160	62	12	26
	Глицин 1%, глюкоза 2%	38,8	1:640	65	15	20
	Сахароза 2%	39,6	1:640	69	11	20
	Мальтоза 2%	39,6	1:640	65	16	19

Было установлено, что наиболее эффективным оказалось использование 2 % мальтозы и смеси 2 % глюкозы с 1 % глицином. Применение этих веществ обеспечивало сохранность биологических свойств КИП (титр РПГА против сальмонелл, содержание белка и соотношение иммуноглобулиновых фракций). И, напротив, высушивание препарата без защитных компонентов во всех случаях приводило к снижению специфической активности на 2 двукратных разведения в реакции РПГА, и падению концентрации белка на 6-8 %, что объясняется денатурацией иммуноглобулинов при замораживании и высушивании.

Эксперименты с изменением различных режимных параметров сублимационной сушки позволили определить три возможных варианта проведения этого процесса. Повышение до 55 °С температуры греющей поверхности полки на этапе сублимации влаги не оказывало негативного влияния на специфические свойства иммуноглобулинов. Это вносит коррективы в существующее представление об их слабой устойчивости к обезвоживанию. Использованный прием позволил сократить длительность не только этапа сублимации, но и всего процесса высушивания КИП в 2,7 раза (до 14 часов). Применимость ускоренного варианта сушки была подтверждена результатами хранения сухого препарата в течение 6 месяцев при температуре 4 ± 2 °С (защищено патентом РФ № 2247578 от 10.03.2005).

В ходе исследования возможности использования γ -излучения для стерилизации сухой субстанции и флаконной формы КИП оценивали действие излучения на специфическую активность иммуноглобулинов и защитные свойства введенных в препарат стабилизаторов. Обработку препаратов γ -излучением проводили на базе ОАО «Мегарат» (г. Москва). Стерилизующий эффект оценивали по наличию роста микрофлоры в образцах КИП до и после радиообработки на различных питательных средах (табл. 4). Антител к ВИЧ, гепатиту С, коронавирусу человека, поверхностному антигену (HBsAg) вируса гепатита В в исходном сырье и готовом препарате обнаружено не было.

Таблица 4. Характеристики препарата КИП с различными стабилизаторами до и после радиационной обработки

Доза γ -облучения, кГр	Вид стабилизатора	Основные характеристики препарата				
		Содержание белка, мг/мл	Антисальмонеллезная активность, титр РПГА	Соотношение Ig, %		
				IgG	IgA	IgM
Нет	Глицин 1%, глюкоза 2%	49,6	1:640	65	15	20
	Мальтоза 2%	48,8	1:640	65	16	19
	Сахароза 2%	49,4	1:640	65	15	20
15	Глицин 1%, глюкоза 2%	49,4	1:640	67	15	18
	Мальтоза 2%	39,0	1:320	60	18	22
	Сахароза 2%	40,0	1:320	63	16	21
20	Глицин 1%, глюкоза 2%	35,0	1:320	68	17	15
	Мальтоза 2%	25,8	1:160	62	13	25
	Сахароза 2%	23,4	1:80	39	35	23

В результате исследований было установлено, что радиационная обработка при величине поглощенной дозы 20 кГр обеспечивала стерилизацию препаратов, но вызывала

снижение антительной активности на одно двукратное разведение в РПГА (защищено патентом РФ № 2255766 от 10.07.2005).

Хранение стабилизированного смесью глицина и глюкозы препарата после стерилизации γ -излучением в течение 2 лет при 4 ± 2 °С показало отсутствие изменений основных свойств препарата и его полное соответствие требованиям фармакопейной статьи.

Следовательно, этот метод может быть рекомендован для включения в технологию приготовления КИП при обязательном выполнении следующих условий: для стабилизации препарата используется смесь 1 % глицина и 2 % глюкозы; препарат до стерилизации имеет специфическую активность, минимум на одно двукратное разведение превышающую величину, регламентируемую ФСП 42-0381-3757-02.

Сухая субстанция КИП представляет собой легкий пористый рассыпчатый материал с размерами кусков от 0,5 до 20 см. В таком виде она не может быть использована для приготовления твердых дозированных форм препарата и должна быть подвергнута соответствующей технологической переработке. Исследование процесса измельчения субстанции позволило выбрать режим проведения процесса без потери специфической активности иммуноглобулинов. Смешение измельченной субстанции с наполнителем – сахарным гранулятом, тальком и стеаратом кальция при приготовлении таблеточной смеси также не вызывало изменения биологических свойств иммуноглобулинов. Однако при прессовании таблеток на салазочном прессе РТ-1 происходило падение антительной активности, но не более чем на одно двукратное разведение. В результате исследований разработан способ таблетирования иммунологических препаратов, обеспечивающий сочетание качества лекарственной формы и наличие заданных специфических свойств биологически активных компонентов (защищено патентом РФ № 2334503 от 27.09.2008). Указанным способом были приготовлены экспериментальные серии КИП в таблетках. При хранении таблеток в течение 1 года их свойства не изменялись. Через 1,5 года содержание белка снизилось со 156 до 112 мг, титр антител упал на 1 двукратное разведение (**табл. 5**).

Другой перспективной дозированной формой КИП являются твердые желатиновые капсулы. Технология их приготовления проще, чем таблеток, и включает стадии измельчения сухого материала, введения скользящих веществ или разобшителей (в случае необходимости) и собственно заполнения капсул препаратом. Для приготовления экспериментальных серий КИП в капсулах использовали ту же измельченную субстанцию, что и для таблеток. Каждая капсула № 1 содержала 150 мг белка. В

результате двухлетнего хранения при температуре 4 ± 2 °С биологические свойства иммуноглобулинов в капсулах не менялись.

Таблица 5. Параметры таблеток КИП при хранении в течение 1,5 лет при температуре (4 ± 2) °С

Срок хранения, мес.	Общий белок, мг/табл.	Активность против сальмонелл титр РПГА	Соотношение иммуноглобулинов, %		
			IgG	IgM	IgA
0	150	1:320	62	18	20
6	144	1:320	67	16	17
12	123	1:160-1:320	62	17	21
18	112	1:160	61	18	21

Учитывая тот факт, что при разработке нового способа выделения иммуноглобулиновой фракции в качестве основного реагента был введен сульфат меди, необходимо было провести комплекс исследований по оценке безопасности препарата.

Первый этап включал определение содержания ионов сульфата меди в препарате различными методами. Качественный анализ образцов КИП с использованием хлорида бария не выявил наличия в препарате сульфат-ионов. Количественное определение, проведенное с помощью тиосульфата натрия, показало, что концентрация в препарате ионов меди не превышала 0,1 мг в сухой биомассе во флаконе или 0,02 мг/мл в жидком КИП. Анализ методом спектрофотометрии по ГОСТ 30178-96 показал, что содержание меди в одной дозе препарата составило от 0,008 до 0,02 мг, что соответствует (0,0016 - 0,004 мг/мл) (**табл. 6**). Содержание ионов меди в нормальной сыворотке человека составляет 0,0015-0,008 мг/мл.

Таблица 6. Содержание ионов меди в образцах комплексного иммуноглобулинового препарата.

№ образца препарата	Метод удаления Cu^{2+} из иммуноглобулиновой фракции	Содержание меди (мг) в препарате	
		в 1 дозе	в 1 мл
1	КИП во флаконах, приготовленный по регламенту	0,008	0,0016
2	Осаждение иммуноглобулинов 12 % ПЭГ	0,108	0,0216
		0,100	0,020
3	Ультрафильтрация	0,020	0,004
		0,015	0,003
4	Ультрафильтрация + осаждение 12 % ПЭГ	0,011	0,0022

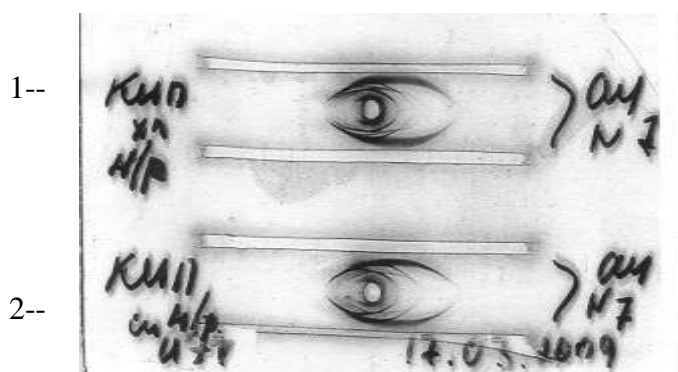
Сравнительная оценка препаратов (**табл. 7, рис. 2**) показала, что полученный по разработанной технологии комплексный иммуноглобулиновый препарат во флаконах по своим качествам не уступает коммерческому аналогу.

Таблица 7. Показатели качества комплексного иммуноглобулинового препарата

Наименование параметра	Величина параметра КИП, полученного методом	
	регламентным	разработанным
Описание	Сухая бело-серая пористая масса	Сухая пористая голубоватая масса
Растворимость, мин	3,5±2	1,7±3
Прозрачность, ед ОП	0,047±0,002	0,038±0,005
Цветность, ед ОП	0,098±0,005	0,086±0,004
Концентрация белка, мг/мл	60±5	58±5
Содержание Ig, %	98,5±1,5	98,5±1,5
Количественное соотношение иммуноглобулинов, %		
IgG	57,2±7,0	55,4±6,8
IgM	22,1±4,3	23,7±8,5
IgA	21,5±5,0	22,0±7,4
Специфическая активность, титр антител к: сальмонеллам шигеллам Флекснера	1:640 - 1:1280 1:320	1:640 – 1:1280 1:320
Содержание меди, мг	0,015±0,005	0,075±0,025
Концентрация липидов, мг на мг белка	0,050±0,025	0,034±0,025
Выход, %	14,16±5,8	24,59±6,4

Из данных **табл. 7** видно, что выход готового продукта в среднем увеличился в 1,8 раза, содержание общих липидов было снижено в 1,5 раза.

Качество полученного препарата определяли иммуноэлектрофоретически. Комплексный иммуноглобулиновый препарат должен содержать только иммуноглобулины трех основных классов G, M, A. Наличие других сывороточных белков согласно действующей ФСП не должно превышать 3 %. При проведении иммуноэлектрофореза использовали сыворотку против всех сывороточных белков человека. Наличие линий преципитации, соответствующих иммуноглобулинам G, M и A, характеризует присутствие этих белков в препаратах (**рис. 2**). Отсутствие других линий показывает, что примесные сывороточные белки в образцах КИП отсутствуют, что полностью удовлетворяет требованию чистоты препаратов, полученных как по существующему регламенту, так и по разработанной технологии.



Примечание: в первой лунке (сверху) - КИП, полученный согласно действующему регламенту; во второй лунке - КИП, полученный по разработанной технологии. В бороздках сыворотка против всех сывороточных белков человека.

Рис. 2. Иммуноэлектрофорез комплексного иммуноглобулинового препарата.

На втором этапе исследований оценивали острую токсичность экспериментальных серий КИП на 50 здоровых белых мышах обоего пола согласно ФС. Результаты экспериментов показали безвредность и отсутствие токсичности препарата для мышей.

Исследования по изучению безвредности и терапевтической эффективности лекарственных форм КИП на обезьянах были проведены сотрудниками НИИ медицинской приматологии РАМН (г. Сочи – Адлер) под руководством академика РАМН, профессора Б.А. Лапина и доктора медицинских наук профессора Э.К. Джикидзе.

Для оценки переносимости препаратов использовали 15 клинически здоровых обезьян вида макак резус, которые были разделены на 3 группы в соответствии с получаемой лекарственной формой КИП. Здоровые обезьяны получали по 1 дозе КИП (1 флакон, 2 капсулы или 2 таблетки) ежедневно утром за 30 мин до кормления в течение 5 дней. Наблюдение за животными велось 10 дней. Признаков ухудшения состояния обезьян не наблюдалось, масса тела в среднем не изменялась, не наблюдалось также каких-либо желудочно-кишечных расстройств. В течение 10 дней наблюдения обезьяны оставались здоровы и все были возвращены в вольеру.

Для изучения терапевтической эффективности использовали 35 больных приматов с выраженными симптомами дисфункции кишечника, частым стулом без патологических примесей. Общее состояние животных оценивалось как среднетяжелое. Обезьяны опытных групп получали по 1 дозе КИП (1 флакон, 2 капсулы или 2 таблетки, соответственно) ежедневно утром за 30 мин до кормления в течение 7 дней. Схема лечения обезьян контрольной группы: левомецетин-сукцинат в течение 7 дней (**рис. 3**). Средняя длительность клинических проявлений заболевания в группах обезьян при лечении препаратами КИП была ниже, чем в контрольной группе.

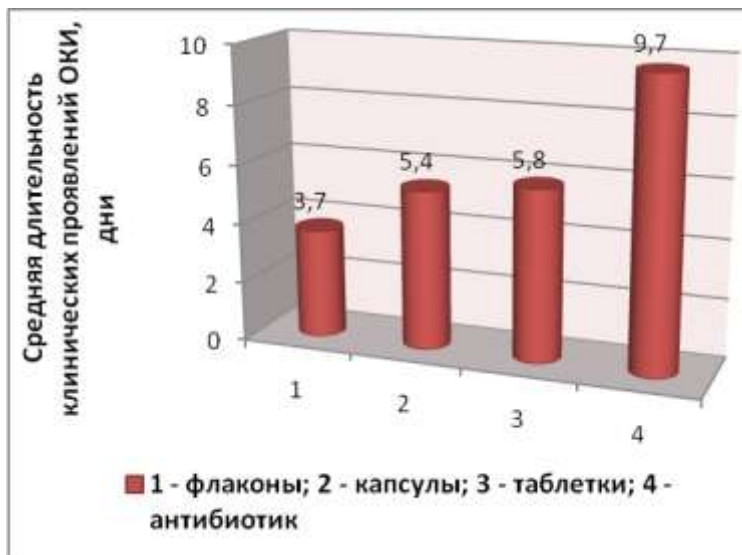


Рис. 3. Длительность клинических проявлений ОКИ у обезьян, получавших лечение препаратами КИП и антибиотиком (левомецетина-сукцинат).

Сыворотки крови всех обезьян, взятых до лечения и на 6-й день эксперимента анализировали на содержание антител против сальмонелл и шигелл Флекснера в реакции РПГА. Средний титр антител до лечения составлял 1:10-1:20. Так как присутствие сальмонелл и шигелл Флекснера в ЖКТ обезьян не было подтверждено бактериологическим анализом, наличие антител свидетельствовало о контакте животных с упомянутыми антигенами, и возможно данный уровень антител является постоянным (норма) в крови. В ходе эксперимента практически у всех животных после лечения препаратами КИП наблюдалось повышение титра антител, как к сальмонеллам, так и к шигеллам Флекснера на одно - два двукратных разведения (рис. 4).

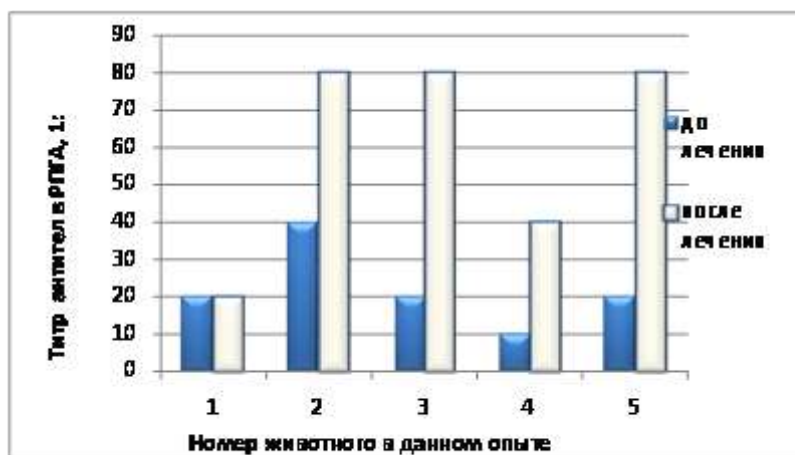


Рис. 4. Титр антител к шигеллам Флекснера в сыворотке крови больных обезьян до и после лечения.

Теоретическая основа энтерального применения КИП разработана еще недостаточно, однако установленный факт может свидетельствовать о проникновении содержащихся в препарате антител, либо их части, в кровь.

Таблица 8. Сравнение групп обезьян по длительности проявления клинических признаков ОКИ с помощью критерия Уайта

Препарат	Длительность болезни, дни (число обезьян)	Число приматов в группе		Наименьшее суммарное число инверсий U_p	Пограничное значение критерия U_T при $p < 0,01$
		больных	вылеченных		
Флаконы КИП	2(5)-4(2)-5(1)-6(1)-8(1)	10	10	28	19
Таблетки КИП	2(4)-3(1)-8(3)-9(1)-10(1)	10	10		
Капсулы КИП	2(2)-3(1)-5(1)-6(1)-7(3)-8(1)-11(1)	10	10		
Левомецитина-сукцинат	9(2)-11(1)-12(2)	5	3	7,5	8

Обработка результатов экспериментов с помощью критерия Уайта показала достоверность различий сроков выздоровления обезьян, получавших КИП и антибиотик, что свидетельствует о высокой терапевтической эффективности разработанных форм комплексного иммуноглобулинового препарата.

Таким образом в результате проведенных исследований выбраны оптимальные критерии использования осадков Б в качестве сырья для получения комплексного иммуноглобулинового препарата. Разработан способ получения жидкого КИП, основанный на использовании сульфата меди. Подобраны стабилизаторы и режим сублимационного обезвоживания для максимального сохранения биологических свойств иммуноглобулинов. Разработаны способы приготовления дозированных лекарственных форм комплексного иммуноглобулинового препарата - во флаконах, таблетки и капсулы. Доказано отсутствие токсичности и наличие терапевтической эффективности различных лекарственных форм на мышах и обезьянах.

Выводы

1. Показано, что наиболее информативными критериями качества осадков Б являются концентрации белка и иммуноглобулинов, отношение содержания антител к общему белку, процентное распределение иммуноглобулинов по классам IgG, IgA, IgM, а также титр антител к сальмонеллам.

2. Разработана технология получения комплексного иммуноглобулинового препарата, основанная на последовательной обработке гомогенизированного осадка Б хлороформом и раствором сульфата меди, очистке иммуноглобулиновой фракции от низкомолекулярных примесей ультрафильтрацией в присутствии комплексообразующего соединения с последующим концентрированием и возможным осаждением иммуноглобулиновой фракции полиэтиленгликолем, растворением осадка иммуноглобулинов, стабилизацией и стерилизующей фильтрацией раствора КИП.

3. Доказана возможность интенсификации сублимационного обезвоживания КИП с сокращением общей длительности процесса в 2,7 раза при использовании в качестве стабилизаторов смеси глицина и глюкозы, что обеспечивает сохранность физических и биологических свойств полученного материала и его пригодность для приготовления флаконной, капсульной и таблеточной форм препарата.

4. Показано, что при стерилизации сухой субстанции комплексного иммуноглобулинового препарата гамма-излучением при дозе облучения 20 кГр, препарат удовлетворяет всем требованиям ФСП 42-0381-3757-02.

5. Разработан технологический цикл приготовления таблеток иммунологических препаратов, при котором воздействие физико-механических факторов, возникающих в процессе разрушения сухой субстанции КИП при ее измельчении и в ходе прессования таблеточной смеси, приводит к суммарному снижению специфической активности иммуноглобулинов не более чем на 1 двукратное разведение.

6. Комплексный иммуноглобулиновый препарат, приготовленный по экспериментальной технологии нетоксичен, безвреден и эффективен при лечении острой кишечной инфекции у обезьян с диарейным синдромом.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Давыдкин В.Ю. Отработка процесса сублимационного высушивания комплексного иммуноглобулинового препарата / Давыдкин В.Ю., Гаврин А.Г., Алёшкин В.А., Лютов А.Г., Афанасьев С.С., **Зорик А.В.**, Борисова И.В., Давыдкин И.Ю. // Сборник научных трудов ГУ МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского МЗ РФ «Проблемы инфекционных болезней (клиника, диагностика, лечение)». -М., 2000. - ч.2. - С. 61- 66.
2. Зорик А.В. Новый способ выделения иммуноглобулинов из осадка Б / **Зорик А.В.**, Алёшкин В.А., Лютов А.Г., // Материалы 1 Международного Конгресса «Биотехнология - состояние и перспективы развития», 14-18 октября 2002 г.- М., 2002. – С. 65.
3. Алёшкин В.А. Испытание на обезьянах иммунобиологических препаратов при лечении инфекционных заболеваний / Алёшкин В.А., Лапин Б.А., Давыдкин В.Ю., Воробьев А.А., Афанасьев С.С., Джикидзе Э.К., Стасилевич З.К., Давыдкин И.Ю., Борисова И.В., Кебу Т.И., Гвоздик Т.Е., Калашникова В.А., Гаврин А.Г., **Зорик А.В.**, Новикова Л.И. // Сборник материалов научно-практической конференции «Медицина будущего». –М., 2002. – С. 45 – 46.
4. Давыдкин В.Ю. Получение экспериментальных серий новых лекарственных форм комплексного иммуноглобулинового препарата (КИП) / Давыдкин В.Ю.Алёшкин В.А., **Зорик А.В.**, Афанасьев С.С., Гаврин А.Г., Давыдкин И.Ю., Борисова И.В., Джикидзе Э.К., Новикова Л.И., Вдовенков В.В. // Сборник международной научно-практической конференции памяти Г.И. Гончаровой «Пробиотические микроорганизмы – современное состояние вопроса и перспективы использования». –М., 2002. – С. 66 – 67.
5. Джикидзе Э.К. Лечение диареи у обезьян различными готовыми лекарственными формами комплексного иммуноглобулинового препарата / Джикидзе Э.К., Алёшкин В.А., Стасилевич З.К., Афанасьев С.С., Кебу Т.И., Давыдкин В.Ю., Гвоздик Т.Е., Борисова И.В., Калашникова В.А., Гаврин А.Г., Давыдкин И.Ю., Новикова Л.И., **Зорик А.В.** // Тезисы докладов IX Российского национального конгресса «Человек и лекарство». -М., 2002.- С. 609.
6. Алёшкин В.А. Место иммуноглобулиновых препаратов в лечении и реабилитации инфекционных больных / Алёшкин В.А., Лютов А.Г., Афанасьев С.С., Феклисова Л.В, Новикова Л.И., Мескина Е.Р., Давыдкин В.Ю., Борисова И.В., Давыдкин И.Ю., Галкина Л.А., Целипанова Е.Е., Репина И.Б., Кострова О.М., **Зорик А.В.**, Гаврин А.Г., Манько Т.Н. // Новые лекарственные препараты.- Вып.4. –М., 2003. – С. 6-32.
7. Лапин Б.А. Оценка на обезьянах реактогенности и эффективности лекарственных форм комплексного иммуноглобулинового препарата / Лапин Б.А., Алёшкин В.А., Давыдкин В.Ю., Воробьев А.А., Джикидзе Э.К., Афанасьев С.С., Стасилевич З.К., Кебу Т.И., Давыдкин И.Ю., Борисова И.В., Гвоздик Т.Е., Калашникова В.А., Гаврин А.Г., **Зорик А.В.**, Новикова Л.И. // Журнал Микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2003. №3. – М., – С. 57-62.
8. Давыдкин В.Ю. Новые лекарственные формы комплексного иммуноглобулинового препарата / Давыдкин В.Ю., Алёшкин В.А., **Зорик А.В.**, Афанасьев С.С., Гаврин А.Г., Давыдкин И.Ю., Борисова И.В., Джикидзе Э.К., Новикова Л.И. // Третья международная конференция, посвященная 80-летию института имени Пастера, «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями», 4-5 сентября 2003 г. в Санкт-Петербурге. –М., 2003. – С. 160.

9. **Мелихова А.В.** Стабилизация фракций иммуноглобулинов при сублимационном высушивании комплексного иммуноглобулинового препарата / **Мелихова А.В.**, Лютов А.Г., Алёшкин В.А., Гаврин А.Г., Давыдкин В.Ю., Давыдкин И.Ю. // International Journal on Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. –М, 2003. – Т.5. №2. – С. 172.

10. Давыдкин В.Ю. Технологические аспекты рецептуростроения лекарственных форм иммуноглобулинов: Общие положения / Давыдкин В.Ю., Алёшкин В.А., Давыдкин И.Ю., Афанасьев С.С., Гаврин А.Г., **Мелихова А.В.** // Сборник материалов научно-практической конференции «Имуноглобулиновые препараты энтерального и внутривенного применения»: Приложение к журналу «Вестник восстановительной медицины». –М., 2003. – С. 18-20.

11. **Мелихова А.В.** Технологические аспекты рецептуростроения лекарственных форм иммуноглобулинов: Разработка способа выделения Ig-фракции из осадка Б // Сборник материалов научно-практической конференции «Имуноглобулиновые препараты энтерального и внутривенного применения»: Приложение к журналу «Вестник восстановительной медицины». – М., 2003. – С. 20-21.

12. **Мелихова А.В.** Технологические аспекты рецептуростроения лекарственных форм иммуноглобулинов: Влияние стабилизаторов на качество иммуноглобулинового препарата при сублимационном высушивании / Мелихова А.В., Лютов А.Г., Гаврин А.Г., Давыдкин В.Ю., Давыдкин И.Ю. // Сборник материалов научно-практической конференции «Имуноглобулиновые препараты энтерального и внутривенного применения»: Приложение к журналу «Вестник восстановительной медицины». –М., 2003. – С. 22-23.

13. Давыдкин В.Ю. Технологические аспекты рецептуростроения лекарственных форм иммуноглобулинов: Сублимационное обезвоживание растворов иммуноглобулинового препарата./ Давыдкин В.Ю., Алёшкин В.А., Гаврин А.Г., **Мелихова А.В.**, Давыдкин И.Ю., Афанасьев С.С., Новикова Л.И., Вдовенков В.В.// Сборник материалов научно-практической конференции «Имуноглобулиновые препараты энтерального и внутривенного применения»: Приложение к журналу «Вестник восстановительной медицины». – М., 2003. – С. 23-24.

14. Давыдкин В.Ю. Технологические аспекты рецептуростроения лекарственных форм иммуноглобулинов: Измельчение сублимированной биомассы иммуноглобулинового препарата / Давыдкин В.Ю., Давыдкин И.Ю., Алёшкин В.А., Гаврин А.Г., Афанасьев С.С., Новикова Л.И., **Мелихова А.В.** // Сборник материалов научно-практической конференции «Имуноглобулиновые препараты энтерального и внутривенного применения»: Приложение к журналу «Вестник восстановительной медицины». –М., 2003. – С. 24-25.

15. Давыдкин В.Ю. Технологические аспекты рецептуростроения лекарственных форм иммуноглобулинов: Непрерывный помол сублимированной биомассы иммуноглобулинового препарата / Давыдкин В.Ю., Давыдкин И.Ю., Алёшкин В.А., Гаврин А.Г., Афанасьев С.С., **Мелихова А.В.**, Новикова Л.И. // Сборник материалов научно-практической конференции «Имуноглобулиновые препараты энтерального и внутривенного применения»: Приложение к журналу «Вестник восстановительной медицины». –М., 2003. – С. 26-27.

16. Новикова Л.И. Использование гамма-облучения для стерилизации комплексного иммуноглобулинового препарата / Новикова Л.И., Бочкарева С.С., Борисова И.В., Зуева М.М., Афанасьев С.С., **Мелихова А.В.**, Кострова О.М. // Сборник материалов научно-практической конференции «Имуноглобулиновые препараты энтерального и внутривенного применения»: Приложение к журналу «Вестник восстановительной медицины». –М., 2003. – С. 28-29.

17. Джикидзе Э.К. Применение комплексных иммунобиологических препаратов для лечения диарейных заболеваний обезьян / Джикидзе Э.К., Афанасьев С.С., Стасилевич З.К., Борисова И.В., Гвоздик Т.Е., Давыдкин В.Ю., Кебу Т.И., **Мелихова А.В.**, Султанова О.А., Калашникова В.А. // Сборник материалов научно-практической конференции «Имуноглобулиновые препараты энтерального и внутривенного применения»: Приложение к журналу «Вестник восстановительной медицины». – 2003. – С. 36-37.

18. Давыдкин В.Ю. Разработка таблетированной формы комплексного иммуноглобулинового препарата / Давыдкин В.Ю., Давыдкин И.Ю., Алёшкин В.А., Гаврин А.Г., Афанасьев С.С., **Мелихова А.В.**, Новикова Л.И., Борисова И.В. // Тезисы докладов XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». –М., 2004. – С.780.

19. Давыдкин И.Ю. Оценка процесса помола и таблетирования сухой биомассы иммуноглобулинов / Давыдкин И.Ю., Давыдкин В.Ю., Алёшкин В.А., **Мелихова А.В.**, Гулый К.Е., Блинов В.М. // Мосоловские чтения: Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства». –М., 2005. – Вып. 7. – С. 225-227.

Изобретения

1. Патент РФ. № 2189833, А61К 39/395. Способ получения иммуноглобулинового препарата / А.В. Зорик, В.А. Алешкин, А.Г. Лютов, И.В. Борисова. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 19 октября 2000. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

2. Патент РФ. № 2255766, МПК А61К 39/395. Способ получения иммуноглобулинового препарата для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций, иммуноглобулиновый препарат для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций (варианты) и суппозитории на основе иммуноглобулинового препарата / Алешкин В.А., Новикова Л.И., Афанасьев С.С., Борисова И.В., Зуева М.М., Зорик А.В. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 5 марта 2003. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

3. Патент РФ. № 2247578, МПК А61К 39/395. Состав, обладающий противомикробным действием / Мелихова А.В., Алешкин В.А., Давыдкин В.Ю., Давыдкин И.Ю., Афанасьев С.С., Борисова И.В., Рубальский О.В., Гаврин А.Г. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 10

марта 2005. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

4. Патент РФ. № 2334503, МПК А61J 3/10. Способ таблетирования медицинских иммунобиологических препаратов / Давыдкин И.Ю., Алешкин В.А., Давыдкин В.Ю., Рубальский О.В., Гаврин А.Г., Мелихова А.В., Афанасьев С.С. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 27 сентября 2008. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

5. Патент РФ. № 2371200, МПК А61К 39/395. Способ получения иммуноглобулинового препарата / Мелихова А.В., Давыдкин В.Ю., Алешкин В.А., Давыдкин И.Ю. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 27 октября 2009. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

6. Патент РФ. № 2371199, МПК А61К 39/395. Способ получения иммуноглобулинового препарата / Мелихова А.В., Давыдкин В.Ю., Алешкин В.А., Давыдкин И.Ю. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 27 октября 2009. Патентообладатель ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ -	вирус иммунодефицита человека
ГФ -	государственная фармакопея
ЖКТ -	желудочно-кишечный тракт
ИФА -	иммуноферментный анализ
ИЭФ -	иммуноэлектрофорез
КИП -	комплексный иммуноглобулиновый препарат
ОКИ -	острая кишечная инфекция
ПЭГ -	полиэтиленгликоль (полиэтиленоксид)
РАМН -	Российская академия медицинских наук
РИД -	радиальная иммунодиффузия
РПГА -	реакция пассивной гемагглютинации
ФС -	фармакопейная статья
ФСП -	фармакопейная статья предприятия
ФЭК -	фотоэлектрокалориметр
IgG -	иммуноглобулин класса G

IgM -	иммуноглобулин класса М
IgA -	иммуноглобулин класса А
HBsAg -	поверхностный антиген вируса гепатита В
HCV -	коронавирус человека
SC -	секреторный компонент
PBS -	фосфатный буферный раствор