

Биоэтические аспекты совершенствования производства антирабического иммуноглобулина в России

С. В. Генералов*, Е. Г. Абрамова, Ю. К. Гаврилова

Федеральное казенное учреждение здравоохранения

«Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
ул. Университетская, д. 46, Саратов, 410005, Российская Федерация

Основной целью работы явилась оценка исследований, направленных на развитие производства антирабического иммуноглобулина, с точки зрения биоэтических принципов: обеспечение права пациента на получение качественной фармацевтической помощи и соответствия концепции 3R. При этом следование биоэтическим принципам должно способствовать совершенствованию технологии производства и повышению качества лекарственного средства, что особенно актуально в отношении препарата антирабического иммуноглобулина вследствие его высокой востребованности. В статье проведен анализ современных тенденций по исключению животных в технологии производства антирабического иммуноглобулина. Показаны основные современные направления получения сывороточных препаратов для постэкспозиционной профилактики бешенства. На примере препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина обоснована необходимость совершенствования контроля качества лекарственных средств путем следования принципам 3R. Показан потенциал применения клеточных культур при определении специфической активности антирабического иммуноглобулина. Определены задачи по разработке и применению методов контроля содержания пирогенных примесей без использования животных в соответствии с актуальными фармакопейными документами. Проведена оценка возможности и целесообразности исключения показателя «Аномальная токсичность» в отношении гетерологичного антирабического иммуноглобулина в соответствии с современными международными тенденциями. Определены задачи совершенствования российского производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина, направленные на улучшение качества обеспечения антирабической помощи, включающие увеличение объемов производства для обеспечения доступности препарата пациентам, снижение реактогенности препарата за счет получения рабического антигена с применением культуральных технологий, а также разработку и внедрение методов *in vitro* для проведения контрольных исследований качества препарата по показателям «Специфическая активность», «Пирогенность», «Аномальная токсичность».

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин; бешенство; биоэтика; принципы 3R; методы *in vitro*

Для цитирования: Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Гаврилова ЮК. Биоэтические аспекты совершенствования производства антирабического иммуноглобулина в России. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):89–96. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-89-96>

Контактное лицо: Генералов Сергей Вячеславович; svgeneraloff@gmail.com

Bioethical Aspects of Improving the Production of Rabies Immunoglobulin in Russia

S. V. Generalov*, E. G. Abramova, Yu. K. Gavrilova

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe",

46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russian Federation

The main objective of the present research was to review the studies that look into ways of improving production of anti-rabies immunoglobulin in terms of bioethical principles: ensuring patients' right to receive quality pharmaceutical care, and compliance with the 3R principles. At the same time, compliance with bioethical principles should contribute to the improvement of production technology and the product quality, which is especially important for antirabies immunoglobulin due to the existing high demand for it. The paper analyses the current trends in avoidance of animal use in the production of rabies immunoglobulin. It summarises the main methods of production of serum products for post-exposure prophylaxis of rabies. The example of heterologous rabies immunoglobulin is used to substantiate the need to improve quality control of drugs by following the 3R principles. The paper highlights the potential use of cell cultures for determination of rabies immunoglobulin specific activity. The authors formulated the objectives that include development and use of pyrogen detection methods which do not involve animal use and are consistent with the current pharmacopoeial standards. They assessed the possibility and feasibility of removing Abnormal Toxicity Test for heterologous rabies immunoglobulin in accordance with the current international trends. The formulated objectives imply optimisation of production of heterologous rabies immunoglobulin in Russia in order to improve the quality of antirabies measures. The objectives include higher production volumes to ensure the availability of the product to patients, reduction of the product reactogenicity by using cell-culture technologies for obtaining

rabies antigen, as well as development and implementation of *in vitro* test methods for product quality control in terms of Specific activity, Pyrogenicity, and Abnormal toxicity.

Key words: rabies immunoglobulin; rabies; bioethics; 3R principles; *in vitro* methods

For citation: Generalov SV, Abramova EG, Gavrilova YuK. Bioethical aspects of improving the production of rabies immunoglobulin in Russia. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):89–96. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-89-96>

Corresponding author: Sergey V. Generalov; svgeneraloff@gmail.com

Значение проблемы совершенствования производства препаратов для постэкспозиционной профилактики бешенства сложно переоценить в силу количества людей, которым необходима антирабическая помощь. В мире ежегодно 15 млн человек получают постэкспозиционное антирабическое лечение, в России этот показатель составляет от 200 до 400 тыс. человек [1]. Для оказания антирабической помощи применяют антирабическую вакцину и, в случаях множественных укусов или укусов опасной локализации, антирабический иммуноглобулин. В России для этой цели используют, как правило, антирабический иммуноглобулин, получаемый из сыворотки крови лошади. Введение антирабического иммуноглобулина необходимо для обеспечения нейтрализации вируса бешенства до формирования иммунного ответа на действие вакцины.

Развитие технологии производства антирабического иммуноглобулина, как и других лекарственных препаратов, неразрывно связано с принципами биоэтики, поскольку конечной целью в системе «пациент — медицинский персонал — производитель лекарственного препарата — лекарственный препарат» главным является обеспечение прав гражданина на получение квалифицированной, доступной и своевременной фармацевтической помощи [2]. Основные биоэтические принципы были сформулированы Гиппократом: забота о пользе больного, оказание помощи, непричинение вреда, проявление справедливости и уважения к пациенту.

Таким образом, основными задачами развития технологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина являются повышение его эффективности и безопасности, а также его доступности для пациентов посредством увеличения объемов выпуска препарата. Вместе с тем существует проблема обоснованного и рационального использования животных в производственном цикле, который предполагает их использование в значительном количестве. Ежегодная потребность в животных на этапах производства и контроля антирабического иммуноглобулина составляет более 100 лошадей (средний срок эксплуатации — 5 лет), свыше 3500 кроликов, более 3000 белых мышей и около 20 морских свинок.

В середине XX века учеными W. M. S. Russell и R. L. Burch¹ предложены основы гуманного использования животных, известные как концепция 3R [3]. Базовыми принципами концепции являются замена животных альтернативными моделями (Replacement), уменьшение числа животных в эксперименте (Reduction), улучшение условий обращения с животными (Refinement).

При этом, на наш взгляд, следование концепции 3R при использовании животных в технологии получения иммунобиологического препарата должно не усугублять, а способствовать решению проблемы получения безопасного лекарственного средства с высокой терапевтической активностью.

Цель работы — оценка основных направлений развития российского производства антирабического иммуноглобулина с точки зрения биоэтических принципов: обеспечение права пациента на получение качественной фармацевтической помо-

щи и соответствия концепции 3R. При этом основное внимание обращено на совершенствование технологии получения препарата антирабического иммуноглобулина и системы контроля качества.

Пути совершенствования технологий получения антирабического иммуноглобулина и альтернативных ему препаратов

В России на сегодняшний день единственным производителем антирабического иммуноглобулина является ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Серийный выпуск препарата начат с 2004 г. [4]. Препарат получают из сыворотки крови лошадей, которых иммунизируют материалом, приготовленным на основе мозговой суспензии примированных вирусом бешенства кроликов.

Современные методы очистки, применяемые при производстве препарата, позволяют снизить процент нежелательных реакций у пациентов [4]. Тем не менее проблема реактогенности гетерологичного антирабического иммуноглобулина обуславливает развитие ряда направлений совершенствования технологии получения сывороточных препаратов для профилактики бешенства.

Очевидным решением является разработка технологии производства гомологичного препарата антирабического иммуноглобулина, который считается более безопасным по сравнению с гетерологичным препаратом. Однако недостатком гомологичного препарата является его высокая стоимость, связанная с поиском доноров человеческой сыворотки крови, небольшими объемами производимого препарата, а также необходимостью проведения контрольных испытаний на вирусные заболевания, такие как ВИЧ, вирусные гепатиты и др. [5].

Не менее эффективным путем снижения реактогенности является получение F(ab')₂-фрагментов гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Практический опыт подтвердил эффективность применения подобных препаратов [6], в настоящее время их производство внедрено в нескольких странах. В России также предложены технологические схемы получения препарата на основе F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина [7, 8]. Экспериментально доказано практически полное отсутствие анафилактических свойств подобного препарата [9].

Следующим направлением совершенствования качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина является применение антирабического антигена на основе культурального вируса для иммунизации животных-продуцентов. К преимуществам указанного направления следует отнести возможность получения более активного и в аллергическом отношении безопасного препарата антирабического иммуноглобулина, исключение трудоемких процессов работы с животными и приготовления вирусосодержащей мозговой суспензии, упрощение процедуры иммунизации продуцентов

¹ Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959. <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>

антирабической сыворотки. Антирабическую сыворотку от лошадей с применением в качестве антигена культуральных вакцин получают в Индии, Таиланде [10, 11]. Для этих целей используют вакцины Rabipur® (Индия) из клеток куриных эмбрионов и вакцину PVRV (Франция) на основе фиксированного вируса бешенства, репродуцированного на перевиваемых клетках Vero. Применение клеток Vero и культурального вируса бешенства экспериментально обосновано и для производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора [4].

Существенным вопросом является исследование эффективности использования рекомбинантных и моноклональных антител для постэкспозиционной профилактики бешенства в качестве альтернативы антирабическому иммуноглобулину [12]. Применение указанных технологий подразумевает использование клеток прокариот и эукариот в качестве систем для продукции вируснейтрализующих антител или их фрагментов вместо животных-продуцентов [13–17]. С 2018 г. препарат антирабических моноклональных антител впервые в мире стал доступен для практического применения [18]. Указанный препарат получил название Rabishield® (Serum Institute of India Pvt. Ltd.). Особенностью его применения является низкая дозировка — 3,33 МЕ на 1 кг массы тела, в сравнении с дозировками гомологичного и гетерологичного препаратов антирабического иммуноглобулина, которые составляют 20 и 40 МЕ на 1 кг массы тела соответственно.

Совершенствование системы контроля препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина

Контроль биологических свойств препарата — специфической активности, токсичности и пирогенности — предполагает использование большого количества животных: белых мышей, кроликов и морских свинок. Безусловно, использование животных как для контроля, так и для производства препарата обуславливает необходимость следования принципу «Refinement», что подразумевает улучшение качества условий воспроизводства, содержания и кормления животных. Следование указанному принципу наиболее наглядно демонстрирует культуру производства и соответствующим образом влияет на результаты [19].

Основательным шагом в развитии системы контроля являются разработка и применение методов *in vitro*, на что также указывает комитет экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по бешенству². Отказ от практики использования лабораторных животных и переход на методы *in vitro* при определении указанных показателей качества являются основными факторами гармонизации российских и международных стандартов [20].

Для использования в производстве антирабического иммуноглобулина разработаны и рекомендованы методы с использованием ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов для количественного определения фиксированного вируса бешенства в антигенном материале, предназначенном для иммунизации лошадей [21], а также различные варианты дот-иммуноанализа с применением диагностикумов на основе наночастиц коллоидных металлов для определения специфической активности иммунных сывороток и антирабического иммуноглобулина [22].

Необходимо отметить, что клеточные культуры представляют собой живую модель для исследования и по этой при-

чине являются более адекватной заменой животным. При репродукции на клеточных культурах вирус бешенства в некоторых случаях способен вызывать деструктивные изменения отдельных клеток и клеточного монослоя, обнаруживаемые методами световой микроскопии. Более ранние изменения ультраструктуры клеток, вызванные вирусом бешенства, могут быть обнаружены методами атомно-силовой микроскопии [23]. Для оценки титра антител в антирабических препаратах ВОЗ и Международное эпизоотическое бюро (МЭБ) рекомендуют применять тест ингибции фокусов флуоресценции (Rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT) и флуоресцентный вируснейтрализующий тест (Fluorescent antibody virus neutralization, FAVN)³. К настоящему времени предложено несколько модификаций указанных методов, различающихся, как правило, используемыми клеточной культурой и штаммом вируса бешенства [24–28]. Аналогичные методы разработаны и в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора для контроля титра антител в антирабических сыворотках [28]. Внедрение разработанных методов возможно после получения достаточного количества результатов, подтверждающих их корреляцию с таковыми, полученными при использовании традиционных методов. При этом целесообразным представляется первоначальное использование указанных методов при контроле промежуточных продуктов производства, а в случае успешного использования и на стадии контроля готового продукта.

Логическим продолжением развития методов, основанных на флуоресценции, является применение проточной цитометрии, особенностью которой является возможность автоматического определения количества инфицированных клеток, что позволит значительно уменьшить количество субъективных ошибок при учете результатов [29].

Отдельного внимания, на наш взгляд, заслуживают иммуноферментные системы для выявления вируса бешенства и антител к нему. К настоящему времени разработано множество различных вариантов ИФА, исследователи приводят данные об эффективности его применения для оценки иммуногенности вакцин, эффективности иммунизации животных [30, 31]. Особенностью ИФА, в отличие от культуральных методов, является возможность работы с инактивированным вирусом бешенства, что повышает биологическую безопасность при проведении анализа.

Одним из показателей биологической безопасности антирабического иммуноглобулина как препарата для парентерального введения является его апиrogenность. В России для определения пирогенных свойств антирабического иммуноглобулина, получаемого из сыворотки крови лошади, используют кроликов согласно ОФС 1.2.4.0005.15 Пирогенность⁴. По мнению ряда исследователей, испытания на кроликах не являются объективными, поскольку существуют различия в реакциях организма человека и кролика на определенные пирогены, а некоторые препараты вызывают у пациентов пирогенные реакции, несмотря на прохождение испытания на пирогенность на кроликах [32, 33]. Согласно указанной фармакопейной статье предполагается повторное использование животных для определения пирогенности, что соответствует концепции 3R. Более того, в Государственной фармакопее Российской Федерации предусмотрена принципиальная возможность использования альтернативных методов определения пирогенов, таких как тест по определению бактериальных эндотоксинов с применением реактива, полученного из мечехвоста (*Lumulus*

² WHO Expert Consultation on Rabies: third report. WHO technical report series 982. WHO; 2018.

³ Там же.

⁴ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0005.15 Пирогенность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

polyphemus или *Tachypleus tridentatus*)⁵, а также определение пирогенных веществ различной природы с применением теста активации моноцитов⁶.

По сравнению с биологическим тестом на кроликах оба теста, тест по определению бактериальных эндотоксинов и тест активации моноцитов, отличаются более высокой чувствительностью, специфичностью и правильностью, для проведения контроля достаточно небольшого количества образца. При этом тест активации моноцитов имеет некоторые преимущества в сравнении с тестом по определению бактериальных эндотоксинов. Во-первых, данный метод, так же как и метод определения пирогенности на кроликах, направлен на обнару-

жение широкого спектра пирогенных примесей, в том числе от микобактерий, грибов, вирусов, химических реагентов и пр. Во-вторых, с точки зрения биоэтики, использование теста активации моноцитов в сравнении с тестом по определению бактериальных эндотоксинов представляется более корректным, поскольку существует угроза исчезновения вида *L. polyphemus* [34]. Решением данной проблемы может быть использование наборов для определения бактериальных эндотоксинов на основе рекомбинантного фактора С [35].

В фармакопеях Европы⁷ и США⁸ при анализе биологических свойств человеческого антирабического иммуноглобулина равнозначно допускается проведение теста

Таблица 1. Основные направления и ожидаемые результаты совершенствования производства антирабического иммуноглобулина с точки зрения принципов биоэтики

Table 1. The main methods and expected results of improving the production of antirabies immunoglobulin in terms of bioethical principles

Направление развития производства Method of improving production	Результат в соответствии с правом человека на получение качественной фармацевтической помощи Result in terms of patients' rights to receive high-quality pharmaceutical care	Результат в соответствии с концепцией 3R Result in terms of the 3R concept
Использование современных методов очистки при изготовлении препарата The use of up-to-date methods of product purification	Снижение реактогенности Reduced reactogenicity	Уменьшение количества лабораторных животных вследствие снижения побочного действия Reduction in the number of laboratory animals due to reduced adverse effects
Разработка технологии получения гомологичного антирабического иммуноглобулина The development of a technology for the production of homologous rabies immunoglobulin	Снижение реактогенности, уменьшение дозировки препарата Reduced reactogenicity, lower dosage of the product	Исключение из технологической схемы животных для получения иммунной сыворотки крови Exclusion of animals from the process of production of immune blood serum
Разработка технологии получения гетерологичного антирабического иммуноглобулина на основе F(ab') ₂ -фрагментов The development of a technology for the production of F(ab') ₂ -fragments-based heterologous rabies immunoglobulin	Снижение реактогенности; повышение специфической активности Reduced reactogenicity; higher specific activity	Уменьшение количества лабораторных животных вследствие снижения побочного действия Reduction in the number of laboratory animals due to reduced adverse effects
Использование культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов The use of cell culture-based rabies antigen for immunisation of producer cells	Снижение реактогенности Reduced reactogenicity	Исключение из технологической схемы животных для получения антигена Exclusion of animals from the process of antigen production
Разработка технологии получения антирабического препарата на основе рекомбинантных моноклональных антител The development of the technology of production of a rabies product based on recombinant monoclonal antibodies	Получение препарата с улучшенными иммунобиологическими свойствами, снижение реактогенности, уменьшение дозировки препарата; увеличение объемов выпуска препарата Production of a product with improved immunobiological properties, reduced reactogenicity, lower dosage of the product; higher production volumes	Исключение из технологической схемы животных для получения иммунной сыворотки крови Exclusion of animals from the process of production of immune blood serum
Разработка и внедрение методов <i>in vitro</i> для контроля биологических свойств препарата The development and implementation of <i>in vitro</i> methods for control of the product's biological properties	Улучшение качества исследований; пролонгация срока годности препарата за счет сокращения времени на проведение контрольных исследований готового препарата Improved quality of research; extension of the product shelf life by reducing the time required for quality control of the finished product	Замена лабораторных животных, используемых для проведения контрольных исследований, либо уменьшение их количества Replacement or reduction of animal tests used in quality control

⁵ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁶ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0016.18 Тест активации моноцитов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁷ European Pharmacopoeia 6th ed. 0723 Human rabies immunoglobulin.

⁸ Rabies immune globulin. USP 41-NF 36.

«Пирогенность» с использованием кроликов и определение бактериальных эндотоксинов и установлено значение порогового содержания бактериальных эндотоксинов, равное 5 МЕ/мл.

В отношении определения пирогенных примесей в препарате антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади, производимого в России, данные о применении тестов активации моноцитов и по определению бактериальных эндотоксинов на сегодняшний день отсутствуют. По этой причине первоочередными задачами при внедрении методов *in vitro* для контроля содержания пирогенных примесей в препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина являются уточнение процедуры пробоподготовки и особенностей проведения реакции, а также определение пороговых значений указанных тестов.

Открытым остается вопрос проведения контрольных испытаний антирабического иммуноглобулина по показателю «Аномальная токсичность», осуществляемых на белых мышах и морских свинках в соответствии с ОФС 1.2.4.0004.15⁹. Многие исследователи считают нецелесообразным проведение указанного теста при производстве фармацевтических препаратов, в том числе вакцин и сывороток¹⁰ [36, 37]. Такое мнение связано с недостаточными возможностями указанного теста для выявления нежелательных реакций у пациента, а также исключением возможности попадания токсичных веществ в лекарственную субстанцию в условиях современного производства, отвечающего требованиям GMP [37]. Последний фактор является ключевым в отношении отказа от проведения теста по показателю «Аномальная токсичность». Необходимым условием для принятия подобных решений должно быть полное соответствие производства рекомендациям ВОЗ в отношении требований GMP, при этом должен быть полностью исключен риск отклонений от регламентированного технологического режима [38] и проведены соответствующие эксперименты, доказывающие возможность исключения показателя «Аномальная токсичность» [39].

Наиболее очевидным решением вопроса исследования токсичных свойств сывороточных препаратов представляется замена животных клеточными культурами. Так, их применение позволило сравнить токсическое действие образцов нормальных и энтеровирусных сывороток, а также выделенного из них специфического иммуноглобулина [40]. В составе препарата антирабического иммуноглобулина отсутствуют токсичные соединения, поэтому отказ от использования животных в этом случае согласуется с международным опытом проведения испытаний на токсичность [19].

Таким образом, в настоящее время существует широкий спектр направлений по совершенствованию российского производства антирабического иммуноглобулина и качества получаемого препарата. Краткое описание направлений совершенствования производства, представленное с точки зрения биоэтических принципов, приведено в таблице 1.

Заключение

Решение биоэтических вопросов тесно взаимосвязано с развитием производства лекарственных препаратов. Принципы биоэтики являются фундаментом для развития научных медицинских, фармацевтических и биотехнологических исследований, в том числе в области разработки технологии получе-

ния антирабических препаратов, совершенствования системы контроля качества.

Право пациента на получение качественной фармацевтической помощи напрямую обуславливает необходимость проведения исследований, направленных на получение препарата антирабического иммуноглобулина с высокой специфической активностью и отсутствием нежелательных реакций при его введении. К таковым направлениям относятся поиск современных способов очистки при изготовлении препарата; получение антирабического иммуноглобулина из иммунной сыворотки крови человека; получение F(ab')₂-фрагментов антирабических антител; использование материала для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки, полученного на клеточной культуре; получение рекомбинантных моноклональных антител, специфичных к вирусу бешенства. Следование концепции 3R прежде всего позволит привести систему контроля качества препарата в соответствие с требованиями международных фармакопей и нормативных документов. Сокращение общего количества животных также положительно отразится на биологической безопасности производства антирабического иммуноглобулина за счет упрощения производственных манипуляций.

При этом первоочередными задачами в развитии российского производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина являются увеличение объемов производства для обеспечения его доступности пациентам, снижение реактогенности за счет получения рабического антигена с применением культуральных технологий, а также разработка и внедрение методов *in vitro* для проведения контрольных исследований качества препарата.

Решение указанных задач требует тщательного изучения, поскольку внедрение в производство технологий *in vitro* не должно оказывать отрицательного влияния на качество контрольных тестов и эффективность препарата.

Вклад авторов. **С. В. Генералов** — обоснование концепции исследования, составление плана статьи, сбор и систематизация данных литературы, формулировка выводов, подготовка текста статьи, оформление рукописи; **Е. Г. Абрамова** — сбор данных литературы, редактирование и коррекция текста статьи, формулировка выводов; **Ю. К. Гаврилова** — сбор данных литературы, подготовка и редактирование текста, оформление рукописи.

Authors' contributions. **Sergey V. Generalov**—substantiation of the research concept, elaboration of the plan of the paper, collection and systematization of literature data, formulation of conclusions, writing and formatting the text; **Elena G. Abramova**—collection of literature data, revising and editing the text, formulation of conclusions; **Yulia K. Gavrilova**—collection of literature data, writing, editing, and formatting the text.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

⁹ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁰ Tellner P. Deletion of test for abnormal toxicity from European pharmacopoeia. EFPIA; 2017.

Литература/References

- Онищенко ГГ, Попова АЮ, Ежлова ЕБ, Демина ЮВ, Пакскина НД, Писцов МН и др. Эпидемиологическая обстановка и вопросы идентификации вируса бешенства среди людей на территории Российской Федерации в период 2002–2015 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(3):27–32. [Onishchenko GG, Popova AYU, Ezhlova EB, Demina YuV, Pakskina ND, Pistsov MN, et al. Epidemiological situation and problems of identification of rabies virus in humans in the territory of the Russian Federation during the period of 2002–2015. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(3):27–32 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-27-32>
- Белоусова ОВ, Белоусов ЕА, Бугаева АС. Мониторинг оказания фармацевтической помощи населению города Белгорода. *Научный результат. Серия: Медицина и фармация*. 2016;2(1):48–52. [Belousova OV, Belousov YeA, Bugayova AS. Monitoring the pharmaceutical care provision to the population of the city of Belgorod. *Nauchnyy rezul'tat. Seriya: Meditsina i farmatsiya = Research Result. Medicine and Pharmacy Series*. 2016;2(1):48–52 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.18413/2313-8955-2016-2-1-48-52>
- Schutte K, Szczepanska K, Halder M, Cussler K, Sauer UG, Stirling C, et al. Modern science for better quality control of medicinal products "Towards global harmonization of 3Rs in biologicals": The report of an EPAA workshop. *Biologicals*. 2017;48:55–65.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.05.006>
- Абрамова ЕГ, Генералов СВ, Матвеева ЖВ, Жулидов ИМ, Никифоров АК, Комиссаров АВ. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(2):95–101. [Abramova EG, Generalov SV, Matveeva ZhV, Zhulidov IM, Nikiforov AK, Komissarov AV. Experimental substantiation of cultural technologies introduction into manufacturing of anti-rabies immunoglobulin. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(2):95–101 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-95-101>
- Мовсесянц АА, Бутырский АЮ, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Постнова ЕЛ, Мухачева АВ. К вопросу о применении гетерологического антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015;14(5):85–9. [Movsesyants AA, Butyrskiy AYU, Bondarev VP, Olefir YuV, Postnova EL, Mukhacheva AV. The use of a heterologous anti-rabies immunoglobulin for specific prevention of human rabies. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2015;14(5):85–9 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-5-85-89>
- Quiambao BP, Dytioco HZ, Dizon RM, Crisostomo ME, Laot TM, Teuwen DE. Rabies post-exposure prophylaxis in the Philippines: health status of patients having received purified equine F(ab')₂ fragment rabies immunoglobulin (Favirab). *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(5):e243.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000243>
- Ситник НП, Исафилов АГ, Загидуллин НВ, Алсынбаев ММ, Тимербаева РХ. Препарат гетерологического антирабического иммуноглобулина для внутривенного и внутримышечного введения и способ его получения. Патент Российской Федерации № 2339401; 2008. [Sitnik NP, Isafilov AG, Zagidullin NV, Alsynbaev MM, Timerbaeva RKH. Preparation of heterologous antirabic immunoglobulin for intravenous both intramuscular introduction and method for its obtaining. Patent of the Russian Federation No. 2339401; 2008 (In Russ.)]
- Никифоров АК, Дятлов ИА, Волох ОА, Лобовикова ОА, Киреев МН. Получение и анализ основных свойств парата гетерологического антирабического иммуноглобулина, состоящего из F(ab')₂-фрагментов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2007;(2):75–8. [Nikiforov AK, Dyatlov IA, Volokh OA, Lobovikova OA, Kireyev MN. Manufacturing and analysis of the main characteristics of heterologous anti-rabies immunoglobulin preparation consisting of F(ab')₂ fragments. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2007;(2):75–8 (In Russ.)]
- Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Савицкая ЛВ, Галкина МВ, Минаева ЛН и др. Изучение анафилактогенных свойств F(ab')₂-фрагментов гетерологического антирабического иммуноглобулина. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009;(2):65–7. [Generalov SV, Abramova EG, Nikiforov AK, Savitskaya LV, Galkina MV, Minaeva LN, et al. Study of anaphylactogenic properties of F(ab')₂-fragments of heterologous anti-rabies immunoglobulin. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2009;(2):65–7 (In Russ.)]
[https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-2\(100\)-65-67](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-2(100)-65-67)
- Goel SK, Sharma S, Singh US. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. *Biologicals*. 2003;31(4):233–6.
[https://doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00059-9)
- Luekrajat T, Wangsai J, Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowsky H, eds. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: WHO; 1996. P. 401–4.
- Nagarajan T, Marissen W, Rupprecht C. Monoclonal antibodies for the prevention of rabies: theory and clinical practice. *Antibody Technology Journal*. 2014;4:1–12.
<https://doi.org/10.2147/ANTI.S33533>
- Prosnjak M, Faber M, Hanlon CA, Rupprecht CE, Hooper DC, Dietzschold B. Development of a cocktail of recombinant-expressed human rabies virus-neutralizing monoclonal antibodies for postexposure prophylaxis of rabies. *J Infect Dis*. 2003;188(1):53–6.
<https://doi.org/10.1086/375247>
- Тиллиб СВ, Иванова ТИ, Васильев ЛА, Метлин АЕ, Шмаров ММ, Логунов ДЮ и др. Тримеризованное однодоменное антитело, специфически связывающееся с гликопротеином G вируса бешенства, нейтрализующее вирус бешенства. Патент Российской Федерации № 2533802; 2014. [Tillib SV, Ivanova TI, Vasilev LA, Metlin AE, Shmarov MM, Logunov DJ, et al. Trimerised single-domain antibody that specifically binds with glycoprotein G of rabies virus, neutralising rabies virus. Patent of the Russian Federation No. 2533802; 2014 (In Russ.)]
- Müller T, Dietzschold B, Ertl H, Fooks AR, Freuling C, Fehner-Gardiner C, et al. Development of a mouse monoclonal antibody cocktail for post-exposure rabies prophylaxis in humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(11):e542.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000542>
- Sveshnikov PG, Yagudin TA, Morozkina EV, Klyachko EV, Zatspepin SS, Benevolensky SV, et al. Production of a humanized Fab fragment of a neutralizing antibody against rabies virus. *Moscow Univ Chem Bull*. 2010;65(3):154–8.
<https://doi.org/10.3103/S0027131410030090>
- Ильина ЕН, Солопова ЕВ, Алиев ТК, Ларина МВ, Балабашин ДС, Варламов НЕ и др. Получение и характеристика человеческого моноклонального антитела RabD4, специфичного к гликопротеину вируса бешенства. *Доклады Академии наук*. 2019;485(3):370–3. [Ilina EN, Solopova EV, Aliev TK, Larina MV, Balabashin DS, Varlamov NE, et al. The generation of the human mab RabD4 specific to the rabies virus glycoprotein and characterization thereof. *Doklady Akademii nauk = Proceedings of the Russian Academy of Sciences*. 2019;485(3):370–3 (In Russ.)]
<https://doi.org/10.31857/S0869-56524853370-373>
- Sparrow E, Torvaldsen S, Newall AT, Wood JG, Sheikh M, Kienny MP, et al. Recent advances in the development of

- monoclonal antibodies for rabies post exposure prophylaxis: a review of the current status of the clinical development pipeline. *Vaccine*. 2019;37(Suppl 1):A132–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.004>
19. Каркищенко НН. Основы биомоделирования. М.: Межакадемическое издательство ВПК; 2005. [Karkischenko NN. *The Basics of Biomodelling*. Moscow: Mezhaakademicheskoe izdatel'stvo VPK; 2005 (In Russ.)]
20. Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(2):38–41. [Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality standards for immunobiological medicinal products — new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(2):38–41 (In Russ.)]
21. Матвеева ЖВ, Абрамова ЕГ, Генералов СВ, Майоров НВ. Разработка способа количественной оценки содержания фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в рабическом антигене. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова*. 2014;10(2):12–7. [Matveeva ZhV, Abramova EG, Generalov SV, Mayorov NV. Development of a method for the quantitative assessment of the content of the fixed rabies virus of the strain "Moscow 3253" in rabies antigen. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii imeni Yu. A. Ovchinnikova*. 2014;10(2):12–7 (In Russ.)]
22. Шарапова НА, Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Киреев МН, Савицкая ЛВ, Минаева ЛН и др. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010;(1):63–6. [Sharapova NA, Abramova EG, Nikiforov AK, Kireev MN, Savitskaya LV, Minaeva LN, et al. Determination of the activity of the anti-rabies sera and heterologous anti-rabies immunoglobulin *in vitro* in the dot immunoassay. *Problemy osobo opasnykh infektsii* = *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2010;(1):63–6 (In Russ.)] [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-1\(103\)-63-66](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-1(103)-63-66)
23. Генералов СВ, Ерохин ПС, Красовская ТЮ, Осина НА, Абрамова ЕГ, Никифоров АК и др. Изучение ультраструктуры поверхности клеток линии Vero, инфицированных вирусом бешенства (RABV, LISSAVIRUS, RHABDOVIRIDAE). *Вопросы вирусологии*. 2017;62(5):227–32. [Generalov SV, Erokhin PS, Krasovskaya TYu, Osina NA, Abramova EG, Nikiforov AK, et al. A study of the ultrastructure of the surface of the transplantable line Vero cells infected with the rabies virus (RABV, LISSAVIRUS, RHABDOVIRIDAE). *Voprosy virusologii* = *Problems of Virology, Russian Journal*. 2017;62(5):227–32 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-227-232>
24. Bedeković T, Lemo N, Lojkić I, Mihaljević Z, Jungić A, Cvetnić Z, et al. Modification of the fluorescent antibody virus neutralization test—elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. *J Virol Methods*. 2013;189(1):204–8. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.01.022>
25. Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods*. 1998;212(1):79–87. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00212-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00212-3)
26. Dacheux L, Bourhy H. Virus isolation in cell culture: the rabies tissue culture infection test. In: Rupprecht Ch, Nagara-
- jan Th, eds. *Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research and prevention*, Vol. 2. Academic Press; 2015. P. 25–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801919-1.00003-8>
27. Сливко ИА, Недосеков ВВ, Жестерев ВИ, Горшкова ТФ, Курильчук ЮН, Анисимова ЛИ и др. Способ титрования антирабических вируснейтрализующих антител. Патент Российской Федерации № 2254575; 2005. [Slivko IA, Nedosekov VV, Zhesterev VI, Gorshkova TF, Kurilchuk JuN, Anisimova LI, et al. Method for titration of antirabic virus-neutralizing antibodies. Patent of the Russian Federation No. 2254575; 2005 (In Russ.)]
28. Гаврилова ЮК, Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Савицкая ЛВ, Галкина МВ, Кочкин АВ. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции. *Биотехнология*. 2018;34(4):83–8. [Gavrilova YuK, Generalov SV, Abramova EG, Savitskaya LV, Galkina MV, Kochkin AV. Express analysis of activity of anti-rabies serum and anti-rabies immunoglobulin in cell cultures by immunofluorescence method. *Biotechnologiya*. 2018;34(4):83–8 (In Russ.)]
29. Bordignon J, Pires Ferreira SC, Medeiros Caporale GM, Carrieri ML, Kotait I, Lima HC, et al. Flow cytometry assay for intracellular rabies virus detection. *J Virol Methods*. 2002;105(1):181–6. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00064-2](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00064-2)
30. Korimbocus J, Dehay N, Tordoc N, Cano F, Morgeaux S. Development and validation of a quantitative competitive ELISA for potency testing of equine anti rabies sera with other potential use. *Vaccine*. 2016;34(28):3310–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.086>
31. Сухарьков АЮ, Назаров НА, Метлин АЕ. Диагностика бешенства животных методом иммуноферментного анализа, сравнение прямого и непрямого сэндвич-варианта. *Ветеринария Кубани*. 2011;(6):12–4. [Sukharikov AYu, Nazarov NA, Metlin AE. Diagnostics of animal rabies by enzyme immunoassay. Comparison of direct and indirect sandwich ELISA options. *Veterinaria Kubani* = *Kuban Veterinary Medicine*. 2011;(6):12–4 (In Russ.)]
32. Багирова ВЛ, Митькин ОД, Митькина ЛИ. Тест на активацию моноцитов как альтернатива тесту «пирогенность» на кроликах. *Фармация*. 2010;(7):40–2. [Bagirova VL, Mitkin OD, Mitkina LI. The monocyte activation test as an alternative to the rabbit pyrogen test. *Farmatsiya* = *Pharmacy*. 2010;(7):40–2 (In Russ.)]
33. Кукунина ТВ, Исрафилов АГ, Романенкова МЛ, Гайнуллина РС, Федько ЛГ. Особенности контроля препаратов альбумина человека на содержание бактериальных эндотоксинов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(2):100–9. [Kukunina TV, Israfilov AG, Romanenkova ML, Gaynullina RS, Fedko LG. Peculiarities of control of human albumin drugs on the content of bacterial endotoxins. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = *Drug Development & Registration*. 2018;(2):100–9 (In Russ.)]
34. Smith DR, Beekey MA, Brockmann HJ, King TL, Millard MJ, Zaldivar-Rae JA. Limulus polyphemus. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016:e.T11987A80159830. [Downloaded on 03 February 2020] <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T11987A80159830.en>
35. Ding JL, Ho B. Endotoxin detection—from *Limulus* amoebocyte lysate to recombinant factor C. *Subcell Biochem*. 2010;53:187–208. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2_9
36. Гарбе ЙХО, Озборн С, Беггс К, Бопст М, Йос А, Кита-шова АА и др. Исключение теста на аномальную токсичность в качестве теста контроля качества: исторический анализ данных и научные знания. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;(2):184–94. [Garbe JHO, Ausborn S, Beggs C, Bopst M, Joos A, Ki-

- tashova AA, et al. Historical data analyses and scientific knowledge suggest complete removal of the abnormal toxicity test as a quality control test. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development & Registration*. 2015;2(11):184–94 (In Russ.)]
37. Kumar S, Bharti VK, Kumar P, Pandey RP. Proposed deletion of abnormal toxicity test and 3R initiatives for other safety test of biologicals. *SJPS*. 2018;1(1):1–16.
38. Георгиевский ВП, Чайка ЛА, Хованская НП, Гомон ОН, Меркулова ЮВ. Биологические методы контроля качества лекарственных средств в Государственной фармакопее Украины. *Фармаком*. 2002;(3):27–37. [Georgiyevskiy VP, Chaika LA, Khovanskaya NP, Gomon ON, Merkulova YuV. Biological methods of drug quality control in the State Pharmacopoeia of Ukraine. *Farmakom = Pharmacom*. 2002;(3):27–37 (In Ukr.)]
39. Рябцева МС, Филимонова ИН, Осипова ИГ, Неугодова НП, Ковалева ЕЛ, Шаройкина МВ. Показатель качества «аномальная токсичность» — одна из основных составляющих безопасности биологических лекарственных средств. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016;(9–2):232–7. [Ryabtseva MS, Philimonova IN, Osipova IG, Neugodova NP, Kovaleva EL, Sharoykina MV. Quality indicator “abnormal toxicity”—one of the main components of safety of biological drugs. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2016;(9–2):232–7 (In Russ.)]
40. Козлов ВГ, Викторова ЕГ, Набатников ПА. Цитотоксические свойства кроличьих энтеровирусных диагностических сывороток. Особенности и локализация. *Вопросы вирусологии*. 2009;54(1):22–7. [Kozlov VG, Viktorova YG, Nabatnikov PA. Cytotoxic properties of diagnostic rabbit sera to enteroviruses. Specific features and localization. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, Russian Journal*. 2009;54(1):22–7 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Генералов Сергей Вячеславович, канд. биол. наук. *Sergey V. Generalov*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1461-5383>

Абрамова Елена Геннадьевна, д-р биол. наук. *Elena G. Abramova*, Dr. Sci. (Biol.). SPIN-код РИНЦ: 3382-3399

Гаврилова Юлия Кирилловна. *Yulia K. Gavrilova*. SPIN-код РИНЦ: 1863-3588

Поступила 14.02.2020

После доработки 27.04.2020

Принята к публикации 27.05.2020

Received 14 February 2020

Revised 27 April 2020

Accepted 27 May 2020