

52. Тарасова А.А., Костинов М.П., Коровкина Т.И., Лукушкина Е.Ф., Шмицько А.Д. Иммунологическая эффективность и безопасность вакцинации против пневмококковой инфекции у детей с ревматическими заболеваниями. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2015, 94(2): 110-115.
53. Тарасова А.А., Костинов М.П., Лукушкина Е.Ф., Скочилова Т.В., Сулоева С.В., Толкачева Н.И., Волкова О.Н. Применение местного респираторного иммуномодулятора у детей с сахарным диабетом 1-го типа. Вопросы современной педиатрии. 2006, 5(1): 569-570.
54. Тарасова А.А., Костинов М.П., Ястребова Н.Е., Скочилова Т.В. Эффект вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции у детей с сахарным диабетом 1 типа. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2007, 6: 45-49.
55. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Под ред. А.Г. Чучалина, В.В. Яснецова. Выпуск XVII. М., 2016.
56. Фошина Е. П., Костинов М. П., Поддубиков А. В. Влияние бактериальных вакцин на состояние микробиоценоза носоглотки и оценка их клинической эффективности у детей с хроническими риносинуситами и тонзиллофарингитами. Педиатрия. Журнал им. Г.Н.Сперанского. 2018, 97(2): 129-133.
57. Чучалин А.Г., Биличенко Т.И., Осипова Г.Л., Курбатова Е.А., Егорова Н.Б., Костинов М.П. Вакцинопрофилактика болезней органов дыхания в рамках первичной медико-санитарной помощи населению. Клинические рекомендации. Пульмонология. 2015. 2(25): 1-19.
58. ACIP recommendations on use PCV13 and PPS23 in immunocompromized adult. MMWR October 2012, 61(40): 816-818.

Поступила 14.06.19

Контактная информация: Костинов Михаил Петрович, д.м.н., проф.,
105064, Москва, Малый Казенный пер., 5А, р.т. (495)917-41-49

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.Г.Абрамова¹, А.К.Никифоров^{1,2}, А.А.Мовсесянц³, И.М.Жулидов¹

БЕШЕНСТВО И АНТИРАБИЧЕСКИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ: ОТ ПРИВИВКИ ПАСТЕРА К СОВРЕМЕННЫМ БИОТЕХНОЛОГИЯМ

¹Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

²Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова; ³Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва

В обзоре рассмотрены актуальные вопросы распространения бешенства в мире и Российской Федерации, этапы разработки и направления совершенствования имеющихся антирабических иммунобиологических препаратов, применяемых в медицинской практике для активной и пассивной иммунизации против бешенства. Современный уровень развития биотехнологии с применением методов молекулярной биологии и геной инженерии открывает перспективы конструирования новых безопасных эффективных антирабических препаратов с применением рекомбинантных технологий. Расширение спектра иммунобиологических препаратов против бешенства и их внедрение в практику здравоохранения будет способствовать ликвидации смертности людей от бешенства.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 83—94

Ключевые слова: бешенство, вирус бешенства, профилактика бешенства, антирабическая вакцина, антирабический иммуноглобулин, рекомбинантные технологии

RABIES AND RABIES IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS: VACCINATIONS PASTEUR TO THE CONTEMPORARY BIOTECHNOLOGY

¹Russian Research Institute for Plague Control «Microb», Saratov, ²Vavilov Saratov State Agrarian University; ³Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia

The review provides information on topical issues of rabies spread in the world and the Russian Federation, the stages of development and directions of improvement of available preventive anti-rabies immunobiological preparation used in medical practice for active and passive immunization against rabies. The current level of biotechnology development with the use of molecular biology and genetic engineering methods opens up prospects for the design of new safe effective anti-rabies drugs using recombinant technologies. Expanding the range of immunobiological drugs against rabies and their introduction into health practice will contribute to the elimination of human mortality from rabies.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 83—94

Key words: rabies, rabies virus, prevention of rabies, anti-rabies sera, anti-rabies immunoglobulin, recombinant technologies

Бешенство — древнейшая вирусная смертельная инфекция зоонозной природы, возбудителем которой является нейротропный вирус рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. Есть мнение, что бешенство начало формироваться более 70 млн лет назад в результате эволюционирования вирусов семейства *Rhabdoviridae* и их адаптации в направлении от растений к беспозвоночным, а затем позвоночным животным [16].

В настоящее время Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) признает 14 генотипов вируса бешенства, объединенных на основании филогенетического родства и антигенных характеристик в три филогруппы: I филогруппа — вирус классического (уличного) бешенства (RABV), распространенный в Европе, Азии, Северной и Южной Америке; лиссавирус европейских летучих мышей типа 1 (EBLV1), циркулирующий в Европе, в т.ч. в европейской части России; лиссавирус европейских летучих мышей типа 2 (EBLV2), также циркулирующий в Европе; вирус *Vokeloh Bat* (BBLV), выделенный от летучей мыши в Германии; вирус *Duvenhage* (DUVV), выделенный от укушенного летучей мышью человека и летучих мышей в Зимбабве и Южной Африке; лиссавирус австралийских летучих мышей, изолированный от людей в Австралии (ABLV); вирус Центральной Азии *Agavan* (ARAV); вирус Центральной Азии *Khujaud* (KHUV); вирус *Irkut* (IRKV), изолированный А.Д. Ботвинкиным в Восточной Сибири; II филогруппа — *Lagos bat* (LBV), циркулирующий среди собак, кошек и плотоядных летучих мышей в Центральной и Южной Африке; *Mokola* (MOKV), изолированный от человека, собак, кошек и землероек в Центральной и Южной Африке; вирус *Shimoni bat* (SHIBV) от летучей мыши в Африке; к III филогруппе отнесены наиболее отличающиеся представители рода *Lyssavirus*: вирус летучих мышей Западного Кавказа (WCBV), обнаруженный в Краснодарском крае, и *Icoma lyssavirus* (IKOV), выделенный в Танзании от африканской циветты. Кроме того, описаны новые вирусы, изолированные от летучих мышей, и которые, вероятно, будут классифицированы в рамках рода *Lyssavirus* — *Gannoruwa bat lyssavirus* (Шри-Ланка), *Lleida bat lyssavirus* (Испания), *Taiwan bat lyssavirus* (Тайвань) и *Kotolahti bat lyssavirus* (Финляндия) [47].

По данным ВОЗ, бешенство занимает одно из первых мест среди зоонозных инфекций, наносящих наибольший экономический ущерб. В совокупности нано-

симый ущерб складывается из потерь от падежа животных; затрат на отлов бродячих животных; вакцинацию домашних и диких животных; проведение диагностических исследований; постэкспозиционное лечение пациентов, контактировавших с больными или подозрительными на бешенство животными; проведение профилактических и карантинных мероприятий. Так, в США ежегодно на борьбу с бешенством тратится более 300 млн долларов; в Германии с 1983 по 2008 г. было потрачено 122 млн долларов на оральную вакцинацию диких животных, преимущественно лис; во Франции в период с 1988 по 1993 г. расходы на постэкспозиционное лечение, превентивную вакцинацию домашних и диких животных составили 261 млн долларов согласно программам, действующим в этих странах [46]. Благодаря действию подобных программ в большинстве стран Западной Европы бешенство среди типичных переносчиков (собак, лисиц) практически не регистрируется.

Ежегодно от бешенства на Земном шаре погибают до 60 тыс. человек, подавляющее большинство смертей приходится на страны Азии и Африки — 59,6 и 36,4% соответственно. Заболевания людей бешенством регистрируются более чем в 150 странах; свободными от данного заболевания являются некоторые островные государства (Япония, Новая Зеландия, Великобритания), ряд стран Северной Европы (Швеция, Норвегия), Антарктида [21]. В последние десятилетия угрозой представляет распространение вируса бешенства среди летучих мышей, данная проблема наиболее актуальна для США, стран Латинской Америки, Канады, некоторых стран Африки [22]. С недавних пор эпизоотии бешенства в популяциях летучих мышей зафиксированы также в Австралии и государствах Европы: Германии, Дании, Голландии, Испании, Франции, Словакии [34].

Самая сложная ситуация по бешенству на сегодняшний день отмечается в Азии, где ежегодно от бешенства умирают до 40 тыс. чел, а основными переносчиками вируса являются собаки [42]. ВОЗ совместно с Глобальным альянсом по борьбе с бешенством на конференции, состоявшейся в Женеве в 2015 г., поставлена глобальная цель — ликвидировать к 2030 г. смертность людей от бешенства после укусов собак в соответствии с намеченными практическими действиями в данном направлении [47].

На постсоветском пространстве в настоящее время доминируют очаги бешенства природного типа с тенденцией к увеличению их числа в связи с миграцией диких животных и вовлечением в эпизоотии новых видов животных, таких как барсуков, хорьков, рысей, бобров, медведей, лосей, нутрий. Природные эпизоотии бешенства протекают на территориях Беларуси, Молдовы, Украины, Казахстана, Эстонии, Литвы, Латвии [16]. Для Средней Азии и Закавказья, а также юга Казахстана характерно сочетание природных и антропоургических очагов бешенства собак [21]. Антропоургические очаги бешенства регистрируются и на юге Российской Федерации, хотя на эпидемический процесс бешенства в нашей стране, в основном, оказывают влияние природные очаги [10]. В России ежегодно регистрируется от 839 до 7633 случаев бешенства животных, 34,5% заболеваний приходится на лис, 18% — на собак, 14% — на крупный рогатый скот, 11% — на домашних кошек [34]. Наиболее неблагоприятными по бешенству регионами Российской Федерации являются территории Центрального (36 % случаев бешенства у людей), Южного (19 %), Приволжского (16 %) и Северо-Кавказского (13 %) федеральных округов [19]. Молекулярно-генетические исследования полевых изолятов вируса бешенства из различных регионов России подтверждают их принадлежность преимущественно к 1 генотипу (RABV), однако зафиксирована циркуляция лиссавирусов не 1 генотипа среди летучих мышей [10].

Всего в России за период с 1975 по 2017 гг. зафиксировано 502 случая смерти людей от бешенства, что составляет в среднем 12 случаев в год [9, 34]; 40,1% от общего числа смертей вызваны контактами с собаками, 33,3% — с лисами, 13,2% — с кошками, 7% — с волками, 5,5% — с енотами, по 0,4% — с полярными лисами и коврами. Отмечены 2 случая гибели людей от бешенства после укусов летучих мышей [11]. Сегодня имеет место тенденция к росту числа укусов дикими животными — в 2017 году зарегистрировано 9 884 таких случая (6,74 на 100 тыс. населения), что является признаком осложнения эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по бешенству [9].

Вирус бешенства передается человеку со слюной больного животного через укус, далее из мышечной ткани, достигнув нервных окончаний, вирус начинает распространяться центростремительно по центральной нервной системе, вызывая острый прогрессирующий энцефалит со смертельным исходом. В случае развития клинической картины бешенства способов неспецифического лечения на сегодняшний день не разработано, и при появлении признаков заболевания прогноз для пациента неблагоприятный. Из-за абсолютной летальности бешенства вопросы постэкспозиционной профилактики заболевания имеют исключительно важное значение. Единственным способом предотвратить заболевание людей бешенством является своевременное введение пациенту антирабических препаратов — вакцины и антирабического иммуноглобулина при укусах опасной локализации, что является единой мировой тактикой [14, 47]. По данным ВОЗ, до 20 млн человек в мире ежегодно получают антирабическое лечение, что позволяет предотвращать сотни тысяч случаев смерти от бешенства [47]. В Российской Федерации ежегодно в связи с укусами и контактами с больными или подозрительными на бешенство животными за антирабической помощью обращаются до 450 тыс. человек [7, 9].

Антирабические препараты, практическую ценность которых невозможно переоценить, прошли длительный путь непрерывного совершенствования. История вакцинации против бешенства началась в XIX веке, когда выдающийся французский микробиолог Луи Пастер поставил науку о бешенстве на прочную экспериментальную основу и создал методику предупреждения заболевания с помощью антирабических прививок, считающуюся одним из самых великих открытий в области медицины. В лаборатории Пастера путем многочисленных внутримозговых пассажей на кроликах взвеси мозга зараженного животного был получен частично аттенуированный вакцинный штамм вируса бешенства с укороченной и постоянной инкубацией для кроликов — фиксированный вирус. Штамм Пастера был передан для производства антирабической вакцины во многие страны мира, где в специальных лабораториях он поддерживается методом интрацеребрального заражения кроликов.

Первые антирабические вакцины типа Ферми, приготовленные из ткани мозга овец и других животных, содержали частично аттенуированный вирус бешенства с плохо контролируемым показателем остаточной вирулентности, что могло служить причиной развития у пациентов «лабораторного бешенства». Так, групповые случаи заболевания «лабораторным бешенством» в результате иммунизации людей вакциной типа Ферми с высоким остаточным инфекционным титром имели место в Бразилии в 1965 г. [14]. Разработка и внедрение в производство инактивированных вакцин явились значительным достижением в области вакцинопрофилактики бешенства. Наиболее широко в свое время в мировой практике здравоохранения применялась вакцина Семпла на основе инактивированного фенолом *virus fixe* из мозговой ткани кролика. Мозговые вакцины из-за содержания в них миелина нередко вызывали тяжелые неврологические осложнения у пациентов, и для сни-

жения реактогенности был налажен выпуск инактивированных вакцин на основе вируса из мозга новорожденных животных, однако и эти вакцины оказались энцефалитогенными [14]. Надо отметить, что мозговые вакцины до сих пор используют для профилактики бешенства у людей в Алжире, Эфиопии, Аргентине и Боливии, несмотря на рекомендации ВОЗ отказаться от их производства в связи с имеющимися побочными эффектами [47].

Очередным этапом совершенствования технологии изготовления антирабических вакцин явилось культивирование фиксированного вируса бешенства в тканях куриных и утиных эмбрионов (авианизированные вакцины). Утиная инактивированная антирабическая вакцина в свое время достаточно широко применялась для профилактики бешенства в США, с 1958 по 1971 г. данной вакциной были иммунизированы с лечебной целью 434 000 человек [29]. Недостатком данной вакцины является содержание в ней значительного количества балластных тканей утинового зародыша, способных вызывать у пациентов аллергические, общие генерализованные реакции и неврологические осложнения. В настоящее время авианизированные вакцины производят в Индии (PDEV, Lyssavac-N/Vaxirab и PCECV, Rabipur, Vaxirab-N) [47].

Принципиально новым этапом и настоящим прорывом в производстве вакцин явилось получение культуральных антирабических вакцин, чему способствовали успехи в разработке методик культивирования вируса *in vitro* в культуре клеток [14]. Первые культуральные вакцины были получены в конце 60-х годах XX века и до сих пор с успехом используются для профилактики бешенства во всем мире. На сегодняшний день в мировой практике производства антирабических вакцин для профилактики заболевания у людей вирус бешенства успешно репродуцируют на различных клеточных субстратах, среди которых: диплоидные клетки человека HDCV (Франция, Imovax; Индия, Rabivax; Китай, Chengdu Kanghua); первичные клетки почки сирийского хомячка РРНКCV (Россия, КОКАВ; Китай); перевиваемые клетки почечного эпителия африканской зеленой мартышки Vero PVRV (Франция, Veroxab; Индия, Indirab; Китай, SPEEDA; Бразилия); перевиваемые клетки почки сирийского хомячка ВНК-21 [47].

Отечественная концентрированная культуральная антирабическая вакцина КОКАВ, производство которой ведется с 1988 года, представляет собой концентрированный и очищенный вакцинный вирус бешенства Внуково-32, выращенный в первичной культуре клеток сирийских хомячков. По своим иммунобиологическим свойствам отечественная вакцина не уступает зарубежным аналогам, она характеризуется минимальным риском развития побочных реакций у пациента, хорошей переносимостью и высокой профилактической эффективностью. Имеются данные о разработке отечественной экспериментальной технологии производства культуральной антирабической вакцины на клетках перевиваемой линии Vero [20].

Культуральные вакцины признаны наиболее эффективными и безопасными, тем не менее, в научной литературе имеются сообщения о побочных эффектах после их применения. Так, зарегистрированы случаи возникновения нежелательных реакций в виде энцефаломиелитов после введения пациентам культуральной антирабической вакцины Rabipur (Индия), полученной на клетках куриных фибробластов [31]. По статистике, осложнения неврологического характера после вакцинации наблюдаются с частотой 1/500 тыс. пациентов; аллергические реакции регистрируются в 0,11 % случаях [23]. Отмечается, что у пациентов, привитых по показаниям антирабической вакциной Veroxab, полученной на клетках перевиваемой линии Vero, наблюдалось меньше нежелательных реакций, чем у привитых вакциной Abhayrab, полученной на диплоидных клетках человека [40].

Направления в совершенствовании производства имеющихся антирабических вакцин связаны с новыми подходами к селекции вакцинного вируса по количественному уровню экспрессии основного иммуногена вируса бешенства — гликопротеида [6]; поиском оптимальных субстратов для культивирования вируса и новых адьювантов [15, 45]; оптимизацией биотехнологических приемов очистки и фильтрации ростовых и поддерживающих сред [8].

В последние десятилетия интенсивное развитие биотехнологии и молекулярной биологии способствовало экспериментальным разработкам вакцин четвертого поколения — генно-инженерных вакцин с заданными свойствами. Разрабатываются вакцины как на основе рекомбинантного вируса бешенства, так и гибридные вакцины, где ген белка G встроен в геном других вирусов. Основной мишенью для модификаций при разработке вакцин на основе рекомбинантного вируса бешенства является гликопротеид, отвечающий за индукцию протективного иммунитета. Существуют два подхода при исследованиях в данном направлении. При первом разрабатываются инактивированные вакцины на основе вируса бешенства, в геном которого встроены две или три копии гена gpG, что усиливает иммунный ответ и увеличивает его продолжительность [30]. Во втором случае разрабатываются живые рекомбинантные вакцины на основе вируса бешенства с мутантной формой G-белка с аминокислотными заменами, в результате которых вирус теряет патогенность при сохранении высокой иммуногенной активности [25]. Живые рекомбинантные вакцины используют для иммунизации животных, применение их для вакцинации людей маловероятно ввиду опасности возникновения побочных эффектов. Так, C. Rupprecht et al. описывают случай возникновения прогрессирующих болей, эритемы, крупных волдырей, некроза на левом предплечье пациента вследствие случайного контакта с рекомбинантной живой вакциной при благоприятном исходе [39].

Для получения вакцин против вируса бешенства на основе вирусных векторов с успехом используют герпесвирусы, аденовирусы, поксвирусы, бакуловирусы, экспрессирующие протективный белок G вируса бешенства. Рекомбинантные вакцины V-RG (Vaccinia Rabies Glycoprotein — оспенный гликопротеин вируса бешенства) сконструированы путем введения в геном вируса оспы последовательности ДНК, кодирующей гликопротеин вируса бешенства [5]. Сегодня рекомбинантные вакцины являются наиболее экологически безопасными препаратами для борьбы с бешенством и применяются в ветеринарной практике для иммунизации диких плотоядных против бешенства во многих странах мира.

В 2015 г. были опубликованы данные о конструировании поливалентной рекомбинантной вакцины RABV/EBOV против вирусов бешенства и Эбола на основе инактивированного вируса бешенства с встроенным гликопротеидом вируса Эбола, иммуногенность которой подтверждена в доклинических испытаниях на мышах и приматах [49].

В последние десятилетия активно развиваются исследования в направлении конструирования антирабических ДНК-вакцин на основе плазмидного вектора, кодирующего G-белок вируса бешенства [24]. Для создания ДНК-вакцин используются хорошо изученные плазмиды грамотрицательных бактерий, чаще всего *Escherichia coli*. Плазмидная ДНК при попадании в организм животного индуцирует выработку в цитоплазме целевого продукта — протективного белка, однако клинические испытания многих вирусных ДНК-вакцин показали недостаточную эффективность иммунного ответа для защиты от вирусных инфекций. В связи с этим, проводятся научные исследования по повышению эффективности антирабических ДНК-вакцин [43].

При разработке новых антирабических рекомбинантных вакцин в качестве вакцинных кандидатов возможно использование вирусоподобных частиц (ВПЧ), способных индуцировать гуморальный и клеточный иммунные ответы [13]. ВПЧ представляют собой антигенные детерминанты вириона без фрагментов генома, что исключает возможность развития инфекционного процесса. При разработке ВПЧ, несущих антигены вируса бешенства, основным вопросом является получение с помощью плазмид или вирусных векторов стабильных клеточных линий для выработки целевого продукта, а также введение в состав ВПЧ различных молекулярных адьювантов. Интересны данные о применении для вакцинации животных против бешенства иммуносом, получаемых при использовании очищенного оболочечного белка вируса бешенства — гликопротеида [15]. Иммуносомы (виросомы) представляют собой оболочку вириона без нуклеиновой кислоты, прикрепленную к поверхности липосом. В эксперименте иммуносомы индуцировали строгоспецифичный гуморальный и клеточный ответ и обладали высокой протективной активностью.

Не менее интересным направлением является получение генно-инженерных антирабических вакцин на основе G-белка, синтезируемого в растениях; вирусные антигены попадают в макроорганизм через пищеварительный тракт, индуцируя иммунный ответ [17]. В качестве подобных «биофабрик» используют томаты, табак, морковь, кукурузу. В литературе имеются сведения о конструировании рекомбинантного вируса табачной мозаики со встроенными химерными пептидами, соответствующими эпитопам G-белка вируса бешенства. Поедание мышами шпината, пораженного рекомбинантным вирусом табачной мозаики, способствовало выработке у них иммунитета против бешенства. При тестировании «съедобной вакцины» на добровольцах в их крови были обнаружены вируснейтрализующие антитела против бешенства [50]. Трансгенные растения синтезируют G-белок вируса бешенства в количестве до 1% от общего содержания растительных белков, что позволяет рассматривать данный тип вакцин перспективным для оральной иммунизации. Однако необходимо отметить недостатки «съедобных вакцин», связанные с разрушением антигена при термообработке пищевого продукта и под воздействием кислой среды желудка, необходимостью периода «созревания» растительных вакцин, сложностью поиска оптимальной дозировки.

Важнейшим профилактическим препаратом, минимизирующим риск заболевания человека бешенством при укусах опасной локализации, является антирабический иммуноглобулин, применяемый в комбинации с антирабической вакциной [7]. В результате комбинированного постэкспозиционного лечения происходит формирование пассивного иммунитета против бешенства за счет введения специфических антител до начала проявления активного иммунитета в ответ на введение вакцины. Эффективность комбинированных прививок была показана еще в начале XX века, когда в СССР, Индии и Румынии были получены данные по снижению заболеваемости бешенством людей, укушенных больными животными, при назначении им антирабической сыворотки в комбинации с вакциной [14]. Однако недостаточно высокий уровень защитных антител в сыворотке и высокая реактогенность, сопряженная с большими объемами вводимой сыворотки, не позволили обосновать целесообразность внедрения комбинированного метода в практику здравоохранения. Дальнейшие исследования были направлены на получение очищенной и концентрированной сыворотки с более высоким титром вируснейтрализующих антител. В СССР в Московском НИИВС им. И.И. Мечникова в 50-х годах прошлого века М.А. Селимов с соавт. разработали технологию получения концентрированной лошадиной антирабической сыворотки, успешно прошедшей испытания в опытах

в Иране по программе ВОЗ, что способствовало признанию комбинированного способа лечения [41]. К этому же периоду относятся исследования М.А. Селимова по выделению из антирабической сыворотки гамма-глобулина, характеризующегося более выраженным лечебным эффектом по сравнению с сывороткой [14]. Рассматривая вопросы разработки профилактических антирабических препаратов и внедрения их в практику здравоохранения, нельзя не отметить неоценимый вклад в отечественную и мировую рабиологию выдающегося российского ученого-рабиолога Мидата Абдурахмановича Селимова, 100-летний юбилей которого пришелся на 2018 год.

Гетерологичный антирабический иммуноглобулин с 70-х годов XX века успешно применяется в мировом здравоохранении в схеме комбинированного постэкспозиционного лечения, а современные методы очистки и фильтрации, используемые при его производстве, способствуют снижению риска развития нежелательных побочных реакций у пациентов до 1—3% [47]. К примеру, в середине XX века частота возникновения поствакцинальных осложнений в ответ на введение иммуноглобулина животного происхождения составляла в среднем 46%, а в конце 80-х гг. — 6% [48].

На сегодняшний день в мировом здравоохранении для предупреждения заболевания людей бешенством наряду с гетерологичным иммуноглобулином применяют гомологичный препарат на основе сыворотки крови человека, иммунизированного антирабической вакциной. Гомологичный иммуноглобулин отличается хорошей переносимостью, низкой частотой поствакцинальных осложнений и применяется преимущественно в развитых странах. В развивающихся странах спрос на гомологичный иммуноглобулин, несмотря на преимущества его использования при комбинированном лечении, ограничен высокой стоимостью и небольшими объемами препарата, связанными с трудностями иммунизации волонтеров-доноров [47]. По этим же причинам отсутствует масштабное производство гомологичного АИГ в Российской Федерации, где весьма сложная эпизоотологическая обстановка по бешенству влечет за собой большое количество обращающихся за антирабической помощью и, следовательно, значительную ежегодную потребность в препарате.

Для снижения частоты нежелательных побочных реакций на введение гетерологичного АИГ предлагаются усовершенствованные технологии очистки препарата, предусматривающие максимальное удаление балластных примесей [28]. К настоящему времени в мировой и отечественной биотехнологической практике, в том числе в институте «Микроб», являющимся единственным производителем гетерологичного антирабического иммуноглобулина на территории Российской Федерации, разработаны технологии получения высокоочищенного гетерологичного АИГ на основе $F(ab')_2$ -фрагментов с низкими анафилактогенными свойствами [4]. За рубежом препарат на основе $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина Favirab эффективно применяют для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей на Филиппинах [37].

Одним из направлений совершенствования качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина является применение для иммунизации животных-продуцентов рабического антигена на основе культурального вируса. S.K. Goel et al. описывают способ получения антирабической сыворотки от лошадей с применением в качестве антигена культуральных вакцин из клеток куриных эмбрионов Rabipur (Индия) и PVRV (Франция) на основе *virus fixe*, репродуцированного на перевиваемых клетках Vero [26]. Клетки перевиваемой линии Vero используют и отечественные ученые при разработке технологии получения культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов в производстве антирабического иммуноглобулина

[1, 3]. Авторы указывают на преимущество использования культурального антигена по сравнению с вирусной мозговой суспензией, позволяющего получать сыворотки с высоким уровнем защитной активности. Культуральный рабический антиген применяют в серийном производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина в Таиланде, при этом активность АИГ, получаемого с применением культуральных технологий, составляет не менее 200 МЕ/мл, что отвечает требованиям ВОЗ [33].

Есть мнение, что замена продуцентов-лошадей при получении антирабических гетерологичных сывороток на животных других видов позволит снизить реактогенность конечного продукта — специфического иммуноглобулина. Так, получены препараты кроличьего [32] и овечьего антирабических иммуноглобулинов [38] со сниженной реактогенностью, которые могут стать альтернативой иммуноглобулину из сыворотки крови лошади, а также гомологичному препарату, практически недоступному для населения в развивающихся странах. Японские ученые получили вируснейтрализующие антитела из желтка кур, иммунизированных рекомбинантным штаммом *E. coli*, продуцирующим гликопротеид вируса бешенства [35]. Разработанный метод, как отмечают авторы, является гуманным по отношению к животным, а также позволит получать эффективные антирабические препараты в тех развивающихся странах, в которых недоступен не только человеческий, но и лошадиный антирабический иммуноглобулин. Однако при масштабном производстве гетерологичного АИГ для получения больших объемов иммунной сыворотки и выделения из нее гамма-глобулина лошадь остается незаменимым продуцентом.

Важным вопросом является исследование эффективности использования моноклональных антител для постэкспозиционной профилактики бешенства в качестве альтернативы антирабическому иммуноглобулину [36]. Эксперты ВОЗ для постэкспозиционной профилактики бешенства рекомендуют использовать коктейль из моноклональных антител, содержащий по меньшей мере, два антитела против вируса бешенства [47]. По данным ВОЗ, препарат на основе моноклональных антител, полученный в Институте сывороток в Индии, прошел тестовые испытания и по эффективности не уступал гомологичному антирабическому иммуноглобулину [27].

Использование современных рекомбинантных технологий позволяет ученым создавать новые амбициозные проекты по разработке очищенных, безопасных препаратов против бешенства на основе гуманизированных антител. Гуманизация включает в себя модификацию чужеродных каркасных аминокислотных остатков при сохранении последовательностей антигенсвязывающих областей. В работах отечественных ученых С.В. Беневоленского с соавт. [2], П.Г. Свешникова с соавт. [12] изложены подходы к конструированию рекомбинантных гуманизированных антигенсвязывающих Fab-фрагментов антирабических антител, которые могут являться прототипом терапевтического средства для профилактики бешенства. На примере моноклонального антитела против гликопротеида вируса бешенства разработаны метод гуманизации антител и система их продукции в клетках дрожжей.

В последние десятилетия активно развивается область молекулярной иммунобиотехнологии, связанной с получением и использованием наноантител — уникального класса полнофункциональных антител размером 24 нм, состоящих исключительно из тяжелых цепей и присутствующих в норме наряду с обычными антителами в крови у представителей семейства Camelidae (Верблюдовые), а также у некоторых видов хрящевых рыб — скатов и акул [44]. Преимуществами наноантител являются их способность за счет малых размеров проникать в труднодоступные органы или ткани организма, стабильность, низкая иммуногенность, что указывает на

перспективу их использования в иммунотерапии вирусных заболеваний, в том числе бешенства. Отечественными учеными разработана технология получения тримеризованных однодоменных антител, специфически связывающихся с гликопротеидом вируса бешенства и нейтрализующих вирус, для чего была использована технология генерирования библиотеки однодоменных антител и последующего отбора последовательностей, кодирующих однодоменное антитело с заданной специфичностью с помощью метода фагового дисплея [18]. В результате эксперимента было установлено, что полученный инновационный препарат способен нейтрализовать вирус бешенства *in vitro* и защищать культуру клеток от инфицирования вирусом бешенства при концентрации 300 мкг/мл и выше, при этом вируснейтрализующая активность тримеризованного однодоменного антитела превышала аналогичный показатель у коммерческого иммуноглобулина из сыворотки крови человека.

Таким образом, на сегодняшний день в направлении поиска современных антирабических препаратов ведутся активные исследования, в том числе с привлечением разнообразных методов молекулярной биологии и генной инженерии. Применение в медицинской практике препаратов нового поколения, полученных с применением рекомбинантных технологий, пока рассматривается только как перспектива в силу их недостатков, к которым можно отнести небольшие объемы выхода целевого продукта, недостаточно высокий уровень специфической активности, сложные технологии получения и контроля, влияющие на конечную стоимость препарата. Тем не менее, достигнутые успехи открывают новые перспективы и задают вектор последующих исследований по конструированию новых эффективных и безопасных препаратов для предупреждения бешенства. Расширение спектра антирабических иммунобиологических препаратов, внедренных в медицинскую практику, будет способствовать полной ликвидации смертности людей от бешенства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Комиссаров А.В. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 2: 95-102.
2. Беневоленский С.В., Зацепин С.С., Клячко Е.В., Морозкина Е.В., Позднякова Л. П., Свешников П.Г., Солопова О. Н., Шемчукова О.Б., Ягудин Т.А. Гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты (fab) против вируса бешенства, изолированный фрагмент днк, кодирующий fab против вируса бешенства, клетка дрожжей, трансформированная фрагментом днк, и способ получения fab против вируса бешенства с использованием дрожжей. Патент РФ № 2440412, МПК С12N001/00. 25.03.2010.
3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Лобовикова О.А., Свинцов Р.А., Разживин А.В., Савицкая Л.В., Галкина М.В., Михеева Т.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н. Культуральный антиген в технологии получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 4 (114): 65-68.
4. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Савицкая Л.В., Галкина М.В., Минаева Л.Н., Михеева Т.А., Селезнёва А.Г., Жулидов И.М., Свинцов Р.А., Лазаренко Г.П., Брандзишевский Ю.В. Изучение анафилактических свойств F(ab')₂-фрагментов гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Проблемы особо опасных инфекций. 2009, 2: 65-67.
5. Горбачева П., Макаров В.В. Рекомбинантная антирабическая вакцина для оральной иммунизации лисиц. Ветеринарная патология. 2010, 2: 16-18.
6. Грибенча С.В., Лосич М.А., Грибенча Л.Ф., Непоклонова И.В. Новый принцип селекции вакцинного вируса на основе количественного уровня экспрессии G-белка — главного иммуногена вируса бешенства. Вопросы вирусологии. 2012, 2: 44-47.

7. Мовсисянц А.А., Бутырский А.Ю., Бондарев В.П., Олефир Ю.В., Постнова Е.Л., Мухачева А.В. К вопросу о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015, 5 (84): 85-89.
8. Мухачева А.В., Мовсисянц А.А., Алсынбаев М.М. Выбор оптимальных методов очистки белковых веществ, входящих в состав вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной (КОКАВ). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014, 3 (76): 84-88.
9. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад. М., Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.
10. Полещук Е.М., Броневец А.Д., Сидоров Г.Н. Современные особенности эпидемиологии бешенства в России. *Инфекционные болезни*. 2016, 14 (1): 29-36.
11. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Грибенча С.В. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России. *Вопросы вирусологии*. 2013, 3: 9-17.
12. Свешников П.Г., Ягудин Т.А., Морозкина Е.В., Клячко Е.В., Зацепин С.С., Беневоленский С.В., Шемчукова О.Б., Позднякова Л.П., Солопова О.Н. Получение гуманизированного Fab-фрагмента нейтрализующего антитела против вируса бешенства. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2010, 3: 185-190.
13. Седова Е.С., Шмаров М.М. Новые антирабические рекомбинантные вакцины. *Биопрепараты*. 2016, 16 (4): 219-229.
14. Селимов М.А. Бешенство. М., Медицина, 1978.
15. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. М., Библионика, 2007.
16. Скрипченко Г.С., Пономаренко А.И., Рыбакова Т.М., Авсенина Л.А., Лавренюк Е.Д. Исторические и современные аспекты бешенства. *Український медичний часопис*. 2003,4 (36): 61-68.
17. Стародубова Е.С., Преображенская О.В., Кузьменко Ю.В., Латанова А.А., Ярыгина Е.И., Карпов В.Л. Вакцины против бешенства: современное состояние и перспективы развития. *Молекулярная биология*. 2015, 49 (4): 577-584.
18. Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А., Метлин А.Е., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Тутьихина И.Л., Алексеева С.В., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Тримеризованное однодоменное антитело, специфически связывающееся с гликопротеином g вируса бешенства, нейтрализующее вирус бешенства. Патент № 2533802 РФ, МПК C07K16/10, A61K39/42. 20.11.2014.
19. Чернышова Е.В., Назаров Н.А., Метлин А.Е. Эпизоотическая ситуация по бешенству в России и анализ эффективности антирабической вакцинации среди домашних животных, вывозимых за границу. *Ветеринария сегодня*. 2013, 4: 49-51.
20. Шафеева Р.С., Фролова А.В., Хайбуллина С.Ф., Муллагулова М.Н. Культуральная антирабическая вакцина на клетках Vero. *Цитология*. 1994, 36 (6): 588.
21. Шестопалов А.М., Кисурина М.И., Груздев К.Н. Бешенство и его распространение в мире. *Вопросы вирусологии*. 2001, 2: 7-12.
22. Banyard A.C., Evans J.S., Luo T.R. et al. Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Viruses*. 2014, 6 (8): 2974-2990.
23. Consoles C.A., Bolzan V.L. Rabies review: immunopathology, clinical aspects and treatment. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2007, 13 (1): 5-38.
24. Ertl H.C.J. Novel vaccines to human rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009, 3 (9): e515.
25. Faber M., Faber M.L., Papaneri A. et al. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J. Virol.* 2005, 79 (22): 14141-14148.
26. Goel S.K., Sharma S., Singh U.S. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. *Biologicals*. 2003, 31 (4): 233-236.
27. Gogtay N.J., Munshi R., Ashwath Narayana D.H. et al. Comparison of a novel human rabies monoclonal antibody to human rabies immunoglobulin for postexposure prophylaxis: a phase 2/3, randomized, single-blind, noninferiority, controlled study. *Clin. Infect. Dis.* 2017, 66 (3): 387-395.

28. Hong H., Rooijackers E., Ke N. et al. Methods for the purification of equine rabies immunoglobulin: effects on yield and biological activity. *Biologicals*. 1994, 22: 1-6.
29. Hoskins J.M. Duck-embryo vaccine. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. Third ed. Geneva, WHO, 1973: 243-255.
30. Korak P., Bosch B., Cox M. et al. A recombinant rabies vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice. *Vaccine*. 2014, 32: 4644-4650.
31. Kumar R., Singh A.K., Pradhan R.N. et al. A case report of post Rabipur (purified chick embryo rabies vaccine) acute disseminated encephalomyelitis. *J. Assoc. Physicians. India*. 2015, 63 (1): 56-58.
32. Liu X., Liu Q., Feng X. et al. Rabbit anti-rabies immunoglobulins production and evaluation. *Trop. Biomed*. 2011, 28 (1): 138-148.
33. Luekrajan T., Wangsai J., Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin. In: *Laboratory techniques in rabies*. 4 th ed. Geneva, WHO, 1996: 401-404.
34. Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Alkhovsky S.V. et al. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology*. Elsevier Science Publishing, 2015.
35. Motoi Y., Sato K., Hatta H. et al. Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine*. 2005, 23: 3026-3032.
36. Nagarajan T., Marissin W., Rupprecht C. Monoclonal antibodies for the prevention of rabies: theory and clinical practice. *Antibody Technology Journal*. 2014, 4: 1-12.
37. Quiambao B.P., Dytioco H.Z., Dizon R.M. et al. 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.
38. Redwan E.-R., Fahmy A., Hanafy A.E. et al. Ovine anti-rabies antibody production and evaluation. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis*. 2009, 32: 9-19.
39. Rupprecht C.E., Blass L., Smith K. et al. Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus. *N. Engl. J. Med*. 2001, 345 (8): 582-586.
40. Sari T., Tulek N., Bulut C. et al. Adverse events following rabies post-exposure prophylaxis: A comparative study of two different schedules and two vaccines. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2014, 12: 659-666.
41. Selimov M.A. Efficacite de l'administration combinee de gamma-globulin de serum immune de cheval et de vaccin antirabiques chez des loups enragés. Extrait de «*La Revue de Medicine*». 1975, 10-11: 723-730.
42. Tenzin, Ward M.P. Review of rabies epidemiology and control in South, South East and East Asia: past, present and prospects for elimination. *Zoonoses Public Health*. 2012, 59 (7): 451-467.
43. Ullas P.T., Desai A., Madhusudana S.N. Rabies DNA vaccines: current status and future. *World Journal of Vaccines*. 2012, 2: 36-45.
44. Vanlandschoot P., Stortelers C., Beirnaert E. et al. Nanobodies®: new ammunition to battle viruses. *Antiviral Research*. 2011, 92: 389-407.
45. Wang X., Bao M., Wan M. et al. CpG oligodeoxynucleotide acts as a potent adjuvant for inactivated rabies virus vaccine. *Vaccine*. 2008, 26: 1893-1901.
46. WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. Geneva, World Health Organization, 2013. WHO Technical Report Series 982.
47. WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. Geneva, World Health Organization, 2018. WHO Technical Report Series 1012.
48. Wilde H., Chomchey P., Punyaratabandhu P. et al. Purified equine rabies immune globuline: a safe and affordable alternative to human rabies immune globulin. *Bull. of the WHO*. 1989, 67 (6): 731-738.
49. Willet M., Kurup D., Wirblich C. et al. Preclinical development of inactivated rabies virus-based polyvalent vaccine against rabies and filoviruses. *Journal of Infectious Diseases*. 2015, 212: 414-424.
50. Yusibov V., Hooper D.C., Spitsin S.V. et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine*. 2002, 20 (25-26): 3155-3164.

Поступила 08.05.19

Контактная информация: Абрамова Елена Геннадьевна, д.б.н.,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)51-69-65.