

УДК 579.66

## ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

© 2024 г. С. В. Генералов<sup>1, \*</sup>, А. В. Комиссаров<sup>1</sup>, Е. Г. Абрамова<sup>1, 2</sup>, С. А. Бадарин<sup>1</sup>,  
Н. М. Логинова<sup>1</sup>, Д. Н. Бибииков<sup>1</sup>, Н. В. Сеницына<sup>1</sup>, Е. А. Глазкова<sup>1</sup>, Г. Н. Гиненко<sup>1</sup>, А. К. Никифоров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФКУН Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора, Саратов, 410005 Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО “Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии  
и инженерии им. Н.И. Вавилова”, Саратов, 410012 Россия

\*e-mail: svgeneraloff@gmail.com

Поступила в редакцию 07.11.2023 г.

После доработки 04.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Определены параметры лиофильного высушивания субстанций органо-тканевого и культурально-го происхождения, содержащих фиксированный вирус бешенства. Объектами исследования были штаммы “Москва 3253”, CVS и “Саратов” вируса бешенства, используемые при получении коммерческих и экспериментальных серий антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Для субстанций, содержащих эти штаммы, определены значения температуры заморозки и эвтектики. Апробирован режим лиофилизации, позволивший получить образцы в виде хорошо сформированной пористой таблетки. Инфекционная активность вируса лиофильно высушенных штаммов “Москва 3253”, CVS и “Саратов” составила соответственно 6,2, 7,1 и 6,8 lg (ID<sub>50</sub>/мл). Таким образом, предлагаемый режим лиофильного высушивания может быть использован для получения образцов штаммов вируса бешенства, предназначенных для производства антирабического иммуноглобулина, с длительным сроком хранения.

**Ключевые слова:** фиксированный вирус бешенства, лиофилизация, антирабический иммуноглобулин

**DOI:** 10.56304/S0234275824010046

Бешенство – широко распространенное зоонозное заболевание, вызываемое лиссавирусом, принадлежащим к семейству Rhabdoviridae. Болезнь поражает центральную нервную систему всех теплокровных животных, включая человека. Передача вируса бешенства от животных человеку происходит в результате укусов, попадания слюны на поврежденные участки кожи или слизистых оболочек. Заражение вирусом бешенства приводит к летальному исходу. Многие территории Российской Федерации эндемичны по этому заболеванию [1]. В постэкспозиционные профилактические мероприятия по бешенству входит применение антирабической вакцины, а также антирабического иммуноглобулина.

В России для производства антирабического иммуноглобулина используют сыворотку крови лошадей, иммунизированных антигеном, приготовленным на основе штамма “Москва 3253” вируса бешенства. Антиген представляет собой инак-

тированную 10%-ную суспензию головного мозга кролика. Для определения специфической активности антирабического иммуноглобулина, а также иммунных сывороток и полуфабриката используют штамм CVS в виде 20%-ной суспензии головного мозга мыши, содержащей 2% нормальной лошадиной сыворотки. Штамм “Саратов” получен в результате адаптации штамма “Москва 3253” к перевиваемой культуре клеток Vero (альтернативное название – “Москва 3253<sub>Vero</sub>”) и считается перспективным для использования в производстве антирабического иммуноглобулина. Применение этого штамма для получения антирабического иммуноглобулина из сывороток крови кроликов и лошадей уже продемонстрировано в лабораторных и пилотных исследованиях [2, 3]. В случае применения штамма “Москва 3253” в качестве производственного его дериват – штамм “Саратов”, геном которого несколько отличается от родительского [4], – может быть использован для контроля специфической активности антирабического иммуноглобулина *in vitro*, что также было успешно продемонстрировано ранее [5, 6].

*Список сокращений:* ПМВ – потеря массы при высушивании; СВ – среда высушивания; ID<sub>50</sub> (the 50% infectious dose) – 50%-ная инфицирующая доза; LD<sub>50</sub> (the 50% lethal dose) – 50%-ная летальная доза.

В производстве антирабического иммуноглобулина для хранения производственных штаммов используют систему банков посевного материала, которая подразумевает наличие главного банка — совокупности материала для долгосрочного хранения — и рабочих банков, содержащих материал, предназначенный для прямого использования в производственном цикле. Производственные штаммы вируса бешенства, как главного банка, так и рабочего, хранят при температуре не выше  $-70^{\circ}\text{C}$ , что далеко не всегда возможно. В связи с этим актуальна оптимизация режима хранения вирусов бешенства, особенно находящихся в главном банке производственных штаммов, где регламентировано сохранение активности вируса в течение длительного срока хранения. Эта задача предполагает стабилизацию свойств вируса бешенства, при этом сублимационное высушивание представляет собой достаточно эффективный способ ее решения [7–9]. Для хранения лиофильно высушенных сухих препаратов, как правило, не требуется низкая температура. Опыт получения лиофилизатов вируса бешенства насчитывает более 100 лет. Так, первым упоминанием о сублимационной сушке этого патогена принято считать работу D. Harris & L. Shackell 1911 года [10]. Этот метод получил широкое распространение — за последние 20 лет предложено множество вариантов сред высушивания (СВ) для получения лиофилизованной формы вируса бешенства.

В патенте Е. Хрипунова и др. [11] раскрыт способ получения полуфабриката антирабической вакцины для оральной иммунизации диких плотоядных животных — лиофилизированного вакцинного штамма ТС-80 вируса бешенства. Лиофилизацию проводили в кюветках в течение 40–44 ч. Перед сушкой вакцинный штамм, выращенный в перевиваемой культуре клеток почки сайги, смешивали с защитными компонентами (40% пептона, 8% лактозы, 4% пектина) в соотношении 1 : 2.

Л. Груздев и др. [12] при изготовлении стандартного образца штамма CVS фиксированного вируса бешенства сравнивали эффективность четырех сред высушивания, в основу каждой из которых входили соответственно обезжиренное молоко, желатин-пептон-сахарозная среда, сорбит-желатинозная среда, а также среда, разработанная сотрудниками ФГУ “Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов” и получившая название “среда № 3 ВГНКИ” [12]. Авторами показана эффективность последней среды при высушивании препаратов, расфасованных по 1 мл в ампулы, в течение 30 ч.

V. Varyantsia & I. Vysekantsev [7] применяли следующие варианты СВ: 1, 5 или 10% сахарозы; 2–3% желатина и 5% сахарозы; 1% желатина и 5% сахарозы (все среды содержали 0.5% бычьего сыво-

роточного альбумина). Время общего цикла лиофилизации 1 мл препарата в ампуле составляло 67 ч. При оценке влияния лиофилизации на свойства вируса сделан вывод о необходимости индивидуального подбора режима высушивания для каждого из вариантов СВ. Эти же авторы оптимизировали концентрации стабилизирующих веществ, наиболее часто используемых для лиофилизации вирусов (%): желатин — 0.5–2.5; сахароза — 0.1–10; глутамат натрия — 0.001; эмбриональная сыворотка крови животных — 3; сывороточный альбумин — 1; гидролизат лактальбумина — 5; лактобионат кальция — 1 [13].

При анализе данных, актуальных на 2018 год, по качественному и количественному составу СВ для производства отечественных вирусных вакцин в лиофилизованной форме А. Комиссаров и др. [14] сообщали, что для 17 наименований вакцин используют 12 вариантов СВ. Общий перечень вспомогательных веществ включает 13 наименований: сывороточный альбумин человека, лактоза, сахароза, сорбитол, маннитол, натрия глутамата моногидрат, трометамол, желатин, L-гистидин, L-аланин, лактальбумина гидролизат, L-аргинина гидрохлорид, пептон.

Таким образом, понятно, что до сих пор нет единого подхода в отношении как используемых СВ, так и длительности процесса лиофилизации, а значит исследования, направленные на обоснование параметров лиофилизации вируса бешенства, не теряют актуальности.

Цель работы — экспериментальное подтверждение параметров сублимационного высушивания субстанций, содержащих вирус бешенства, и исследование свойств полученных сухих образцов.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### *Этические нормы*

Все исследования с использованием патогенных биологических агентов проводили в соответствии с действующими СанПиН 3.3686-21 “Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней”<sup>1</sup>.

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях<sup>2</sup>, и “Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях”

<sup>1</sup> Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. № 4 “Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 “Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней” (с изменениями от 11.02.2022 и от 25.05.2022)”.

<sup>2</sup> Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS No. 123) от 18 марта 1986 года.

[15]. Содержание экспериментальных животных соответствовало “Положению о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев)”<sup>3</sup>.

#### *Подготовка вирусодержащих образцов*

При проведении исследований использовали следующие штаммы фиксированного вируса бешенства: “Москва 3253”, CVS, “Саратов” (“Москва 3253<sub>Verо</sub>”). Для получения и подготовки к лиофильному высушиванию субстанции, содержащей штамм “Москва 3253”, головной мозг кролика, извлеченный из зараженного животного, растирали фарфоровым пестиком в стерильных условиях. Затем к нему добавляли стерильные водные растворы, содержащие 10% сахарозы и 1% желатина, до конечной концентрации мозговой суспензии 10%. Аналогично из головного мозга белой мыши, зараженной штаммом CVS, готовили 20%-ную суспензию. Образцы, содержащие штамм “Саратов”, готовили следующим образом. Вирус культивировали роллерным способом на предварительно выращенном монослое клеток Verо в среде 199 с добавлением 5% сыворотки крупного рогатого скота в течение 7 сут [16]. Для заражения клеточной культуры использовали 0.1 ID<sub>50</sub> (50%-ная инфекционная доза) на 1 клетку. Культуральную жидкость собирали и центрифугировали при 500 g в течение 5 мин для удаления клеточного дебриса. К полученным вирусодержащим образцам добавляли предварительно стерилизованные компоненты СВ: 20%-ный раствор сахарозы и 2%-ный раствор желатина до конечной концентрации 10 и 1% соответственно.

Выбор смеси сахарозы и желатина в качестве СВ определен широким использованием среды Файбича (10% сахарозы, 1.0–1.5% желатина, 0.05–0.2% агар-агара) или 10% сахарозы и 1.0–1.5% желатина для лиофилизации живых микроорганизмов, в том числе в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора (Саратов).

#### *Ллиофилизация вирусодержащих образцов и оценка качества полученных препаратов*

Подготовленные субстанции разливали по 1.0 мл автоматическим дозатором PF-6 (Flexicon, Дания) в стерильные ампулы ШП-6, НС-3 (АО “Курскмедстекло”, Россия). Ллиофилизацию образцов проводили в сублимационной сушиль-

ной установке Epsilon 2-6D (Martin Christ, Германия). Ампулы запаивали вручную с применением горелки KE2019 (Kemper, Китай) и хранили в холодильнике. В ходе исследования определяли следующие показатели: внешний вид, растворимость (скорость растворения), pH, потерю массы при высушивании (ПМВ), герметичность, инфекционность вируса бешенства и стерильность.

Показатель “внешний вид” лиофилизованного препарата контролировали визуально на соответствие следующему критерию: это сухая пористая масса в форме таблетки.

Растворимость (скорость растворения) устанавливали визуально, для чего в ампулу добавляли 1 мл дистиллированной воды, имеющей температуру (20 ± 2)°C, и встряхивали до полного растворения.

Значение pH образца определяли потенциометрически с использованием pH-метра/ионометра/кондуктометра Mettler Toledo SevenExcellence-S475 (Pharmacia LKB Biotechnology, Швеция). Нормируемое значение pH находится в интервале 8.0–9.5.

Определение ПМВ проводили с помощью инфракрасного термогравиметрического анализатора влажности Sartorius MA-150 (Sartorius, Германия) весовым методом, описанным в ОФС 1.2.1.0010.15<sup>4</sup>. Для контроля использовали содержимое ампул в количестве 0.15–0.20 г. ПМВ не должна превышать 3.0%.

Для проведения испытаний на герметичность 100% ампул полностью погружали в емкость с 6%-ным раствором перекиси водорода и 0.5% поверхностного активного вещества на 60 мин. После дезинфекции проводили визуальный осмотр ампул, негерметичные емкости отбраковывали, вскрывали и оставляли в дезинфицирующем растворе на 24 ч.

Для штаммов “Москва 3253” и CVS вируса бешенства инфекционный титр вируса определяли методом титрования на белых мышках массой 10–12 г с применением интрацеребрального способа введения в соответствии с общепринятым методом [17].

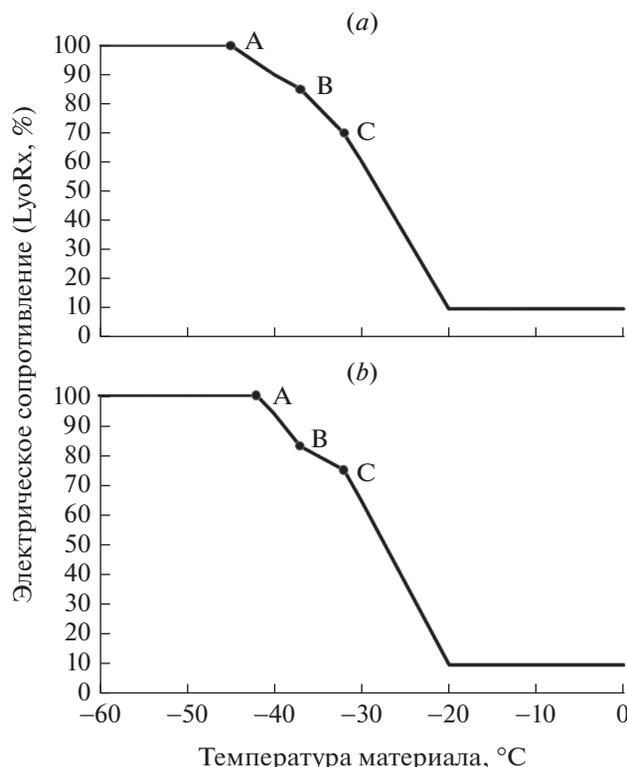
Инфекционный титр штамма “Саратов” вируса бешенства определяли с помощью титрования на культуре клеток Verо согласно ранее разработанному методу [6].

Стерильность высушенных штаммов определяли методом прямого посева в соответствии с ОФС 1.2.4.0003.15 “Стерильность”<sup>5</sup>.

<sup>3</sup> Положение о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев) (утверждено Российской академией медицинских наук и Министерством здравоохранения Российской Федерации 21, 22 апреля 2003 года). <https://base.garant.ru/71615950/>.

<sup>4</sup> Общая фармакопейная статья 1.2.1.0010.15 “Потеря в массе при высушивании”. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд., т. 1, 2018.

<sup>5</sup> Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 “Стерильность”. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд., т. 1, 2018.



**Рис. 1.** Определение параметров электрического сопротивления и температуры субстанций, содержащих вирус бешенства, в процессе замораживания–оттаивания. (a) – Штамм “Саратов” (субстанция культурального происхождения); (b) – штаммы “Москва 3253” и CVS (субстанции органо-тканевого происхождения). Точки А, В и С соответствуют значениям температуры полного заморзания, нижней и верхней эвтектики.

**Fig. 1.** Determination of parameters of electrical resistance and temperature of substances containing the rabies virus during the freezing–thawing process. (a) — Strain “Saratov” (substance of cultural origin); (b) — strains “Moscow 3253” and CVS (substances of organ-tissue origin). Points A, B and C correspond to the values of the full freezing, lower and upper eutectic temperatures.

*Обработка результатов*

Все полученные результаты представлены в виде среднего значения ± доверительный интервал, которые рассчитывали из данных 3–5 независимых повторов. Статистическую обработку результатов проводили по стандартной методике определения грубых ошибок [18].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

При выборе оптимальных температурно-временных показателей процессов замораживания и дальнейшей сублимации учитывают такие свойства материала, как температура полного заморзания, нижняя и верхняя температура эвтектики [19, 20]. С целью определения этих параметров для исследуемых субстанций мы использовали протокол, предложенный L. Rey & J. May [21]. Прежде всего проводили синхронное измерение температуры и электрического сопротивления (LyoRx) испытуемого препарата при его заморозке и последующем размораживании. Этот метод был успешно применен нами ранее при установлении выше-

указанных характеристик для ряда иммунобиологических препаратов, что позволило обосновать температурно-временные параметры их лиофилизации [22, 23]. Измеряемое электрическое сопротивление материала в лиофилизаторе Epsilon 2-6D отображается на дисплее в процентах (LyoRx, %).

Основные результаты этого этапа работы представлены на рис. 1. Для всех трех препаратов значения нижней и верхней эвтектической температуры были одинаковы и составили соответственно -37°C (рис. 1a и 1b, точка В) и -32°C (рис. 1a и 1b, точка С). Что касается температуры полного заморзания, то для субстанции, содержащей штамм “Саратов”, она составляла -45°C (рис. 1a, точка А), для двух других штаммов – это -42°C (рис. 1b, точка А). Близость значений определенных температурных параметров для трех вирусных препаратов может быть обусловлена присутствием в составе образцов одинаковых количеств сахарозы и желатина (10 и 1% соответственно), а на пониженную на 3°C температуру полного заморзания препарата вируса бешенства “Саратов”, по-видимому, влияет присутствие среды 199.

**Таблица 1.** Свойства лиофильно высушенных субстанций, содержащих вирус бешенства  
**Table 1.** Properties of freeze-dried substances containing the rabies virus

| Исследуемый показатель |                   | Штамм   |  |  |
|------------------------|-------------------|---|--|--|
|                        |                   | “Саратов”   | “Москва 3253”  | CVS  |
| Внешний вид            |                   | сухая пористая масса в виде хорошо сформированной таблетки розового цвета | сухая пористая масса в виде хорошо сформированной таблетки молочного цвета | сухая пористая масса в виде хорошо сформированной таблетки светло-серого цвета |
| Время растворения, с   |                   | 30 ± 1  | 40 ± 2   | 45 ± 3   |
| рН                     |                   | 7.2 ± 0.1   | 7.2 ± 0.1  | 7.5 ± 0.1  |
| Герметичность          |                   | Соответствует   | Соответствует  | Соответствует  |
| ПМВ, %                 |                   | 1.4 ± 0,1   | 1.7 ± 0.1  | 1.6 ± 0.1  |
| Стерильность           |                   | стерилен  | стерилен   | стерилен   |
| Инфекционность         | до высушивания    | 7.1 lg ID <sub>50</sub> /мл   | 6.4 lg LD <sub>50</sub> /мл  | 7.3 lg LD <sub>50</sub> /мл  |
|                        | после высушивания | 6.8 lg ID <sub>50</sub> /мл   | 6.2 lg LD <sub>50</sub> /мл  | 7.1 lg LD <sub>50</sub> /мл  |

На основании представленных в литературе экспериментальных данных [20, 24] и описанных нами ранее [22, 23] логично сделать вывод о необходимости замораживания субстанции, содержащей штамм “Саратов”, до  $-45^{\circ}\text{C}$ , а двух других до  $-42^{\circ}\text{C}$ , а также проведения процедуры лиофилизации всех трех препаратов в интервале температур от  $-32$  до  $-37^{\circ}\text{C}$ . Следует отметить, что значение параметра LyoRx, обеспечивающего требуемый режим высушивания, не должно быть ниже 70%.

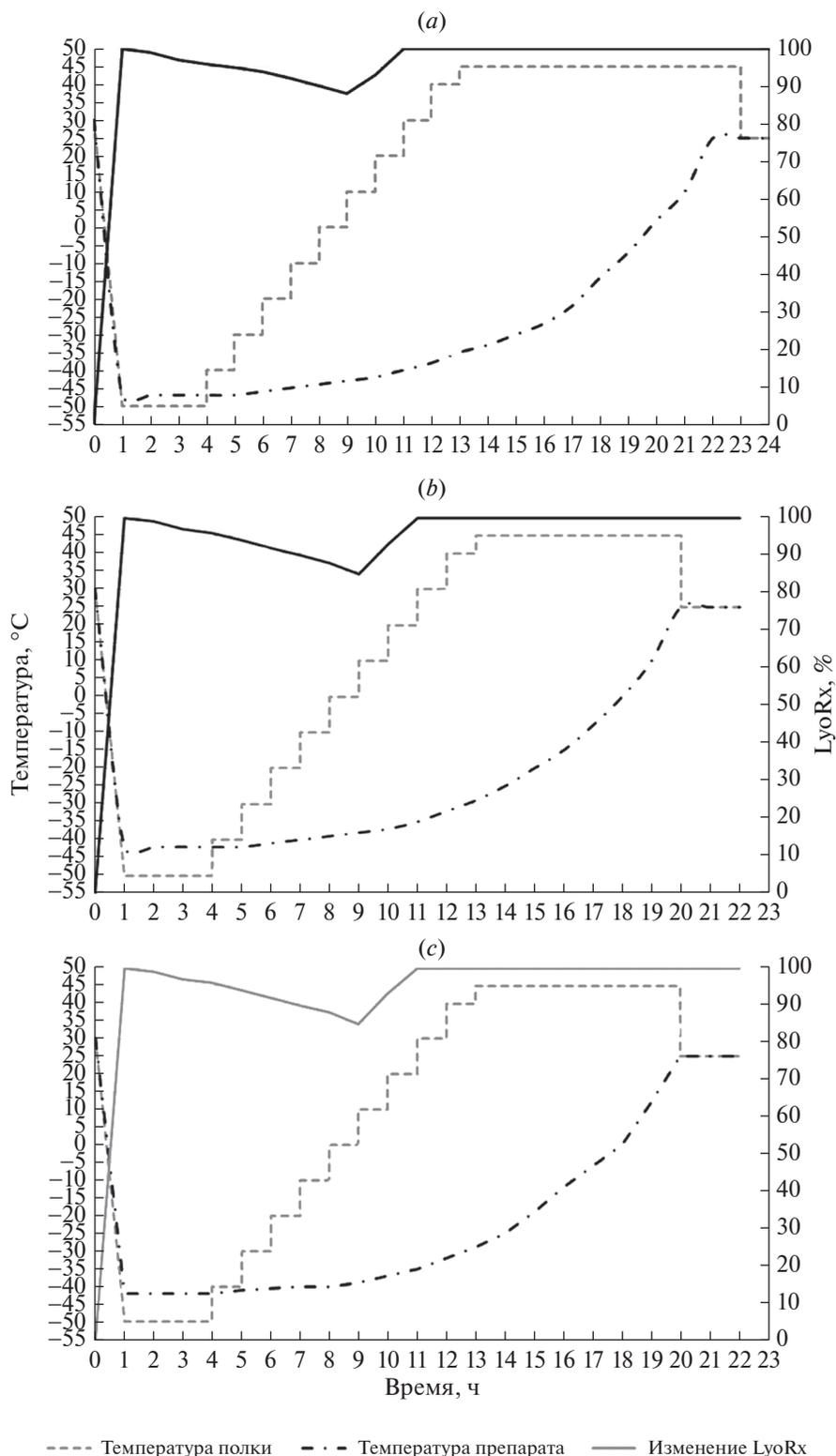
Ранее нами разработана и верифицирована формула для расчета ПМВ при лиофилизации диагностических препаратов в зависимости от температурно-временных режимов процедуры досушивания. Разработанная расчетная зависимость позволяет прогнозировать время процедуры досушивания для установления требуемого значения ПМВ при установленных температурных параметрах [25]. В расчетах показано, что для достижения значения ПМВ, равного 1.5%, процесс досушивания занимает 2 ч при температуре  $25^{\circ}\text{C}$ .

Для проведения лиофилизации нами был предложен алгоритм изменения температурно-временных показателей процесса, успешно применяемый при сублимационной сушке диагностических препаратов, производимых в ФКУН Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора. Кюветы с ампулами помещали на полки сушильной установки, охлаждали до температуры полного замерзания образца и оставляли при этой температуре на 2 ч. Далее создавали вакуум и начинали подогрев полок, постепенно повышая температуру образца до  $25^{\circ}\text{C}$  (скорость подогрева полок  $10^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ ), после чего температуру полок доводили до  $25^{\circ}\text{C}$  и выдерживали в течение 2 ч. Такие параметры процесса высушивания, как температу-

ра конденсатора-вымораживателя и показатель вакуума, оставались неизменными и составляли  $-70^{\circ}\text{C}$  и 0.01 кПа соответственно. Также вели постоянный мониторинг показателя LyoRx. Результаты процесса лиофилизации препаратов вируса бешенства представлены на рис. 2.

Рассматривая изменение параметра LyoRx, можно констатировать, что его минимальное значение составляет 88% (для субстанции, содержащей штамм “Саратов”) и 85% (для субстанции, содержащих штамм “Москва 3253” и CVS). Можно сделать вывод, что примененные температурно-временные характеристики процесса лиофилизации гарантируют температурный режим, не превышающий нижнюю эвтектическую температуру ( $-32^{\circ}\text{C}$ ) для исследуемых препаратов вируса бешенства. Заметим, что при этом не исключена возможность более быстрого повышения температуры полок установки, а, следовательно, и высушиваемого материала, что позволяет уменьшить продолжительности процесса лиофилизации. Более того, экспериментально подтверждена целесообразность проведения процесса досушивания в течение 2 ч при температуре  $25^{\circ}\text{C}$ , так как измеренное значение ПМВ сухих вирусных образцов составляло от 1.4 до 1.7% (1.4% для штамма “Саратов”, 1.7% для штамма “Москва 3253” и 1.6% для CVS). Близость динамики значений температурно-временных показателей процесса высушивания, а также параметра LyoRx обусловлена, по видимому, теми же причинами, что и для температуры полного замерзания, нижних и верхних эвтектических температур вирусосодержащих субстанций.

Можно констатировать, что время, необходимое для лиофилизации образцов, не превышает



**Рис. 2.** Режимы лиофилизации препаратов вируса бешенства: штаммы “Саратов” (a), “Москва 3253” (b), CVS (c).  
**Fig. 2.** Lyophilization modes for rabies virus preparations: “Saratov” (a), “Moscow 3253” (b) and CVS (c) strains.



**Рис. 3.** Внешний вид лиофилизированных образцов вируса бешенства: штамм “Саратов” (a), “Москва 3253” (b) и CVS (c).  
**Fig. 3.** Appearance of lyophilized rabies virus samples: “Saratov” (a), “Moscow 3253” (b) and CVS (c) strains.

24 ч, что меньше значений, опубликованных в литературе (от 30 до 67 ч).

Необходимый этап при оценке эффективности предложенных методических приемов лиофилизации вирусных препаратов — изучение свойств полученных сухих образцов. Результаты исследования качества образцов лиофилизированных вирусосодержащих субстанций представлены в табл. 1, внешний вид образцов показан на рис. 3.

Полученные экспериментальные результаты позволяют обосновать параметры процесса сублимационного высушивания препаратов вируса бешенства, а именно штаммов “Москва 3253” и CVS, находящихся в субстанции органо-тканевого происхождения, и штамма “Саратов”, находящегося в субстанции культурального происхождения. Для высушиваемого объема, равного 1 мл, при использовании 10% сахарозы и 1% желатина как компонентов СВ, установлены следующие параметры лиофилизации: замораживание материала до температуры  $-45^{\circ}\text{C}$ , охлаждение конденсатора-вымораживателя до  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч; создание вакуума 0.01 кПа; постепенное повышение температуры материала до  $25^{\circ}\text{C}$  со скоростью подогрева полок равной  $10^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ ; уравнивание температуры материала и полок до  $25^{\circ}\text{C}$  и выдерживание в этих условиях в течение 2 ч. Подобранные условия позволили получить лиофильно высушенные субстанции, содержащие вирус бешенства; при этом снижение инфекционности вируса не превышало 5% от исходного значения. На основании полученных результатов можно рекомендовать применение разработанной технологии лиофилизации для дальнейших исследований по оптимизации условий хранения главного и рабочего банок штаммов вируса бешенства, используемых в производственном процессе приготовления иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади.

### ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, и “Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях” [15]. Все протоколы были одобрены Комиссией по биоэтике ФКУН Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора (Саратов, Россия), протокол № 7 от 14 декабря 2022 года.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование не имело дополнительных источников финансирования

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полешук Е.М., Сидоров Г.Н., Савкина Е.С. Эпизоотолого-эпидемиологическая характеристика бешенства в России в 2019–2021 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2023, 2, 49–60. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-2-49-60>
2. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Михеева Т.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2012, 2(112), 78–81. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-2\(112\)-78-81](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-2(112)-78-81)
3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Свищев Р.А., Комис-

- саров А.В., Куреев М.Н., Никифоров А.К. Культуральный антиген в технологии получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2012, 4(114), 65–68.  
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-4-65-68>
4. Krasnov, Y.M., Alkhova, Z.V., Generalov, S.V., Tuchkov I.V., Naryshkina E.A., Sharapova N.A., Abramova E.G., Nikiforov A. K. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of the rabies virus strain Moscow 3253 adapted to a Vero cell line. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, 2020, 35, 237–242.  
<https://doi.org/10.3103/S0891416820040060>
  5. Абрамова Е.Г., Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Комиссаров А.В., Никифоров А.К. Разработка стандартного образца предприятия активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2022, 22(1), 38–48.  
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-38-48>
  6. Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Галкина М.В., Кочкин А.В. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции. *Биотехнология*, 2018, 34(4), 83–88.  
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-4-83-88>
  7. Varyantsia V.V., Vysekantsev I.P. Infectious activity of L. Pasteur rabies virus vaccine strain frozen-dried in various protective media and then stored at various temperatures. *Probl. Cryobiol. Cryomed.*, 2018, 28(4), 333–342.  
<https://doi.org/10.15407/cryo28.04.333>
  8. Varyantsia V.V., Vysekantsev I.P. Freeze-drying and subsequent storage of fixed Pasteur strain rabies virus. *Probl. Cryobiol. Cryomed.*, 2017, 22(4), 162.  
<https://doi.org/10.15407/cryo27.02.162>
  9. Malenovská H. The influence of stabilizers and rates of freezing on preserving of structurally different animal viruses during lyophilization and subsequent storage. *J. Appl. Microbiol.*, 2014, 117(6), 1810–1819.  
<https://doi.org/10.1111/jam.12654>
  10. Harris D.L., Shackell L.F. The effect of vacuum desiccation on the virus of rabies, with re-marks on a new method. *J. Infect. Dis.*, 1911, 8(1), 47–49.
  11. Хрипунов Е.М., Евсеева С.Д., Жестерев В.И., Горшкова Т.Ф., Баньковский Д.О., Пархомцев С.А. Вирус-вакцина против бешенства для оральной иммунизации диких плотоядных животных и способ ее изготовления. Патент RU2311924C2, Бюллетень № 34, опубл. 10.12.2007.
  12. Груздев Л.К., Уласов В.И., Груздев К.Н. Оценка эффективности стабилизирующих сред при изготовлении стандартного образца штамма CVS фиксированного вируса бешенства. *Ветеринарная патология*, 2007, 4, 32–37.
  13. Varyantsia V.V., Vysekantsev I.P. Storage methods of complex RNA viruses. *Probl. Cryobiol. Cryomed*, 2017, 27(4), 287–285.  
<https://doi.org/10.15407/cryo27.04.287>
  14. Комиссаров А.В., Бибииков Д.Н., Волох О.А., Бадарин С.А., Сеницына Н.В., Костылева Н.И., Германчук В.Г., Никифоров А.К. Лиофилизация живых вакцин. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*, 2018, 14(3), 56–73.
  15. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях*. Ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачев. М.: Профиль-2С, 2010, 358 с.
  16. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Свицов Р.А. Крупномасштабное культивирование фиксированного вируса бешенства штамма Москва 3253 на перевиваемой линии клеток Vero (V): методы и сравнительный анализ. *Биотехнология*, 2014, 5, 38–43.
  17. *Laboratory Techniques in Rabies*. Eds F.-X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowsky. Geneva: WHO, 1996, 469 p.
  18. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Москва: Медицина, 1962, 180 с.
  19. Гусаров Д.А. Лиофилизация биофармацевтических белков (миниобзор). *Биофармацевтический журнал*, 2010, 2(5), 3–7.
  20. Нежута А.А., Сербис Е.С. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки био-препаратов. *Биотехнология*, 2001, 6, 59–67.
  21. Rey L., May J.C. *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. London: Informa Healthcare, 2010, 564 p.
  22. Комиссаров А.В., Кочкалова Н.Н., Сеницына Н.В., Бадарин С.А., Костылева Н.И., Волох О.А., Колокова О.Д., Никифоров А.К. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2016, 1, 90–93.  
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-1-90-93>
  23. Бибииков Д.Н., Комиссаров А.В., Волох О.А., Кузнецова Е.М., Бадарин С.А., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Никифоров А.К. Лиофилизация микробов туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ. *Биофармацевтический журнал*, 2020, 12(6), 15–23.  
<https://doi.org/10.30906/2073-8099-2020-12-6-15-23>
  24. Constantino H.R., Pikal M.J. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. Arlington, VA, USA: AAPS Press, 2004, 686 p.
  25. Комиссаров А.В., Бибииков Д.Н., Бадарин С.А., Сеницына Н.В., Костылева Н.И., Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Зинина О.С., Плотников И.А., Никифоров А.К. Разработка расчетной зависимости для оценки величины потери массы при лиофилизации диагностических препаратов. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*, 2020, 10(3), 506–514.  
<https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514>

## Lyophilization of Production Rabies Virus Strains

S. V. Generalov<sup>a, #</sup>, A. V. Komissarov<sup>a</sup>, E. G. Abramova<sup>a, b</sup>, S. A. Badarin<sup>a</sup>, N. M. Loginova<sup>a</sup>,  
D. N. Bibikov<sup>a</sup>, N. V. Sinitsina<sup>a</sup>, E. A. Glazkova<sup>a</sup>, G. N. Ginenko<sup>a</sup>, and A. K. Nikiforov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Russian Research AntiPlague Institute "Microbe", Federal Service for Surveillance  
on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Saratov, 410005 Russia*

<sup>b</sup>*Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering  
named after N.I. Vavilov, Saratov, 410012 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: svgeneraloff@gmail.com*

**Abstract**—The parameters of lyophilization of substances of organ-tissue and cultural origin containing a fixed rabies virus were determined. The objects of the research were the "Moscow 3253", CVS and "Saratov" strains of rabies virus used in the production of commercial and experimental batches of rabies immunoglobulin from horse blood serum. For substances containing "Moscow 3253", SBC and "Saratov" strains, both the freezing and eutectic temperatures were identical. The use of the developed lyophilization protocol allowed us to obtain samples in the form of porous tablets of corrected shape. The infectivity of freeze-dried "Moscow 3253", CVS and "Saratov" strains was 6.2, 7.1 and 6.8 lg (ID<sub>50</sub>/mL), respectively. Thus, the proposed freeze-drying regime is acceptable for obtaining samples of rabies virus strains used for the production of rabies immunoglobulin.

**Keywords:** fixed rabies virus, lyophilization, rabies immunoglobulin