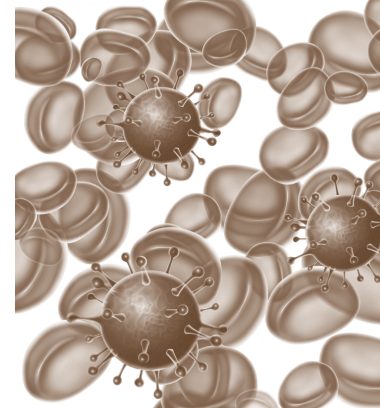


Разработка препаратов анатоксинов и решение проблемы их производства в СССР (материал для подготовки лекции)



Лукин Е.П.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, г. Сергиев Посад-6, Российская Федерация

Описаны история создания высокоочищенных концентрированных анатоксинов против анаэробных инфекций, методика их производства с использованием безмясных питательных сред, основанная на современной промышленной (в ферментерах) технологии.

Ключевые слова:

ботулинический и столбнячный анатоксины, безмясная питательная среда, промышленная (в ферментерах) технология

Финансирование. Работа не имела спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Лукин Е.П. Разработка препаратов анатоксинов и решение проблемы их производства в СССР (материал для подготовки лекции) // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 1. С. 116–120. doi: 10.33029/2305-3496-2020-9-1-116-120

Статья поступила в редакцию 16.06.2019. **Принята в печать** 13.01.2020.

Development of anatoxin preparations and solution problems of their production in the USSR (material for the preparation of the lecture)

Lukin E.P.

48 Central Scientific Research Institute, 141306, Sergiev-Posad-6, Moscow Region, Russian Federation

The article describes the history of the creation of highly purified concentrated toxoids against anaerobic infections using meatless nutrient media based on modern industrial (in fermenters) technologies.

Keywords:

botulinum and tetanus toxoids, meatless nutrient media, industrial (in fermenters) technology

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The author declare no conflict of interests.

For citation: Lukin E.P. Development of anatoxin preparations and solution problems of their production in the USSR (material for the preparation of the lecture). *Infektionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]. 2020; 9 (1): 116–20. doi: 10.33029/2305-3496-2020-9-1-116-120 (in Russian)

Received 16.06.2019. **Accepted** 13.01.2020.

После Второй мировой войны перед руководством СССР встала острая проблема: нужно было организовать производство антибиотиков и обеспечить население страны и ее Вооруженные силы эффективными защитными препаратами против анаэробных инфекций, особенно для

профилактики столбняка и ботулизма [1–3]. Попытки усовершенствовать препараты, созданные по «бутылочной» технологии из культур, выращиваемых на сложных (на основе переваров мяса) питательных средах, были безрезультатны [4, 5]. Для решения проблемы предстояло соз-

дать биопредприятия, предназначенные для выполнения поставленных задач с использованием современного метода глубинного культивирования продуцентов токсинов в ферментерах, исключающих использование мясopодуKтов и другое дефицитное сырье. Геополитическая обстановка того времени требовала провести организационные мероприятия для решения этой проблемы в кратчайшие сроки [1, 2, 6]. В соответствии с постановлением Совета Министров СССР [3, 7] существовавший в Загорске (с 1990 г. – Сергиев Посад) Всесоюзный научно-исследовательский институт вакцин (ВНИИВ) включили в число коллективов, решающих данную проблему. В мае 1952 г. в Загорск был переведен отдел раневых инфекций Института эпидемиологии и микробиологии (ИЭМ) им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР во главе с профессором К.И. Матвеевым. ВНИИВ был переориентирован на создание защитных препаратов против анаэробных инфекций, стал закрытым и получил новое название НИИ санитарии Минздрава СССР (НИИС МЗ) [3]. Он был усилен молодыми специалистами – выпускниками МГУ им. М.В. Ломоносова, ИИ МГМИ им. В.И. Сталина (теперь Российский медицинский институт им. Н.И. Пирогова), Московского фармацевтического института, отделения антибиотиков Ленинградского технологического института пищевой промышленности. Из бывшего ветеринарного института РККА в новом институте остались Н.Д. Архангельский (бактериолог), Б.Т. Зуев (средовар), С.Б. Логинов (биохимик), П.И. Гречко (инженер-технолог по производству антибиотиков). Был создан коллектив, способный выполнить поставленную задачу.

Известно, что создание любого биопродукта желаемого качества на основе микробиологического синтеза реализуется в результате исследований по следующим направлениям:

- поиск и отбор наилучших штаммов-продуцентов в природе, в музейной коллекции (если она существует) или путем селекции;
- создание оптимальной питательной среды (сред);
- изыскание оптимальных условий культивирования;
- решение задач технологического плана – извлечение и очистка целевого продукта (в данной проблеме она дополнялась необходимостью определить наиболее щадящий режим инактивации для обеспечения безопасности конечного продукта);
- определение необходимого содержания активного антигена в прививочной дозе, предназначенной для введения человеку;
- создание рациональной схемы применения препаратов.

Научные руководители работ – профессора А.Т. Кравченко и К.И. Матвеев распределили сотрудников по всем этим направлениям. Академики АМН СССР П.Ф. Здродовский (1954–1960 гг.) и Г.В. Выгодчиков (1960–1968 гг.) были привлечены в качестве консультантов.

Для решения проблемы «Анатоксины против анаэробов» (1951–1968 гг.) были задействованы 70 ученых и специалистов – микробиологов, иммунологов, биохимиков, инженеров-технологов, фармацевтов. В марте 1954 г. НИИС МЗ был передан Министерству обороны (МО) СССР и переименован в НИИС МО СССР.

На I этапе исследований (1951–1955) предстояло:

1. Разработать немясные питательные среды для культивирования возбудителей.
2. Освоить режимы глубинного культивирования последних.
3. Создать нативные (неочищенные) анатоксины против ботулизма типов А, В, С, Е, столбняка и возбудителей газовой гангрены (перфрингенс и эдематиненс), а также получить антитоксические сыворотки.
4. Оценить протективные свойства препаратов анатоксинов и антитоксических сывороток в экспериментах на модельных животных.
5. Начать разработку методов повышения качества нативных препаратов за счет их очистки, концентрирования и депонирования очищенных антигенов.

Эксперименты по всем этим направлениям проходили в режиме закрытости, диктуемом развернувшейся в те годы холодной войной [1, 3, 6, 7]. Тем не менее отдельные фрагменты работ и их результаты освещались в научных журналах и докладах сотрудников института на межучрежденческих конференциях [5, 8–13].

В итоге работ на I этапе объединенный коллектив НИИС МЗ (МО) СССР и отдела раневых инфекций ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи за 5 лет решил проблему на следующем уровне: «Была разработана методика изготовления на немясных средах концентрированного адсорбированного анаэробного полианатоксина, включавшего ботулинические анатоксины типов А, В, С и Е, а также гангренозные и столбнячные анатоксины» [6, 11].

Технология изготовления препаратов на мясных средах навсегда ушла в прошлое. Отделение культивирования (ферментеры емкостью 100–1000, иногда – 10 000 л) и питательных сред функционировало без отклонений в плане выпуска культур возбудителей. Однако достигнутая степень чистоты антигенов была недостаточной, что осложняло создание комплексных препаратов [2, 11]. Следует отметить, что в 1953 г. Е.П. Лукиным был открыт феномен существования ботулинического протоксина типа Е и его активации под действием экзогенных протеиназ. Этот феномен был изучен в отношении других ботулотоксинов, в частности *Cl. botulinum* типа В [13].

На II этапе в результате наблюдений за динамикой падения токсичности ботулотоксина типа Е, а затем и типа В (1956 г.) был установлен факт быстрой, в течение первых 24 ч обезвреживания, почти полной (на 98,0...99,8%) инактивации неочищенных токсинов. К сожалению, приоритет этих открытий своевременно не был защищен патентами на открытие.

На этом этапе решения проблемы «Анатоксины против анаэробов» (1956–1960 гг.) под руководством А.В. Марковича, А.А. Воробьева и А.Т. Кравченко была создана совершенно новая технология обезвреживания бактериальных токсинов из частично инактивированных токсинов методом дробного добавления формалина [2, 10, 11], что позволило увеличить производительность оборудования в 4 раза.

Были получены следующие результаты:

1. Усовершенствована технология получения высокоочищенных концентрированных монопрепаратов против выше-

упомянутых возбудителей, пригодных для последующего создания более сложных комплексов: би-, три-, тетра-, пента-, секста-, октаанатоксинов.

2. На ограниченных контингентах людей изучены безопасность и иммунологическая эффективность моно- и более сложных комплексов, в том числе и пентаанатоксина.

3. Оформлена научно-техническая документация (НТД) в соответствии с требованиями того времени: регламенты, тактико-технические требования и инструкции по применению отдельных монопрепаратов и препаратов двойного/тройного состава. Вместе с образцами последних документация прошла экспертизу и апробацию в ГИСК им. Л.А. Тарасевича Минздрава СССР и была утверждена Комитетом вакцин и сывороток Минздрава СССР.

4. Освоен выпуск в промышленных условиях (ферментеры для глубинного культивирования емкостью 1000–2000 л) очищенных монопродуктов – этого было достаточно для изготовления от 0,5 до 2,0 млн человеко-доз в серии.

5. Документально оформлены и переданы в контрольные органы МЗ СССР на согласование и утверждение аппаратурно-технологические схемы изготовления анаэробных препаратов.

6. Совместно с отделом раневых инфекций ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи под общим руководством А.А. Воробьева и Г.В. Выгодчикова начаты исследования по созданию секста- и октаанатоксинов.

7. Доработаны схемы иммунизации и технология получения очищенных концентрированных моно-, би- и поливалентных антитоксических ботулинических типов А, В, С и Е сывороток [9].

На III этапе работы по проблеме «Анатоксины против анаэробов» (1960–1968 гг.) предстояло:

1. На основе официально утвержденной НТД, разработанной в рамках II этапа, оказать консультативную помощь по созданию соответствующей промышленной базы производства анатоксинов по новой технологии в институтах вакцин и сывороток (ИВС) МЗ СССР.

2. Внедрить опыт изготовления высокоочищенных препаратов на создаваемых предприятиях ИВС в Уфе, Томске, Перми и пос. Петрово-Дальнее Московской области.

3. Расширить практику применения новой технологии для изготовления дифтерийного анатоксина.

4. Обосновать совместно со специалистами ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи и Главного военно-медицинского управления (ГВМУ) МО оптимальный вариант комплексного препарата, обеспечивающий защиту от преднамеренного использования ботулотоксинов и столбнячного анатоксина криминальными структурами.

5. Защитить приоритет НИИС МО по выполненным разработкам и созданным препаратам путем оформления соответствующих авторских свидетельств в Государственном комитете по делам изобретений и открытий при Совете Министров СССР.

С этими задачами коллектив НИИС МО блестяще справился: технология промышленного производства по новой технологии была воспроизведена на предприятиях в вышеуказанных городах [6, 7].

Область применения новой технологии была расширена в 1961–1966 гг. совершенствованием изготовления очищен-

ного концентрированного дифтерийного анатоксина (работы Н.А. Калининской, Л.И. Ларионовой, К.В. Мачульской, С.В. Чеботаревой, ИВС им. И.И. Мечникова МЗ СССР), несколько позже – Ю.А. Хавкиным в Уфе [2]. По данной проблеме с 1956 по 1970 г. в периодических и других изданиях опубликовано более 90 работ, в том числе монографии [4, 8, 11]. Фрагменты исследований были доведены до сведения научной общественности на межинститутских научных конференциях. В открытом порядке защищены кандидатские диссертации А.М. Коробова, Г.И. Кремлева, А.М. Шишулиной [3].

Таким образом, интенсивные разработки коллективов НИИС МО и ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи под руководством А.Т. Кравченко, К.И. Матвеева, А.В. Марковича, А.А. Воробьева, П.Ф. Здродовского, Н.Н. Васильева и Г.В. Выгодчикова, выполненные с 1952 по 1968 г., закончились решением одной из сложнейших проблем середины XX в. – созданием доступных эффективных моноанатоксинов и семейства более сложных препаратов на их основе для защиты от столбняка, ботулизма, раневых инфекций и дифтерии.

«Были решены крупные, принципиально важные для теории и практики проблемы. К ним прежде всего следует отнести создание метода получения анатоксинов из очищенных и концентрированных токсинов, теорию и практику обезвреживания токсинов, изучение вопроса активации токсина протеазами, расшифровку механизма действия сорбированных анатоксинов, повышения иммуногенности при хранении, разработку биотехнологии анатоксинов и др. Конечным результатом работ этого периода было создание серии полианатоксинов: *очищенного сорбированного окта- и секстаанатоксинов* (столбнячный, ботулинический типов А, В, Е или А, В, С, Д, Е и противогангренозные перфрингенс- и эдематиенс-анатоксины), *очищенного сорбированного пентаанатоксина* типов А, В, С, Д, Е, *очищенного столбнячного трианатоксина* (столбнячный, гангренозный перфрингенс-, эдематиенс-анатоксины). Препараты освоены промышленным производством по оригинальной технологии» [6].

Производство столбнячного и дифтерийного анатоксинов по новой технологии после ее освоения в конце 1960-х гг. на предприятиях Минздрава СССР продолжается и в настоящее время. Из сравнительной оценки качества получаемых препаратов и препаратов зарубежных фирм следовало, что анатоксины, созданные в СССР, не уступали последним по степени очистки [14]. Столбнячный и дифтерийный анатоксины вошли в перечень вакцин, включенных в Национальный календарь прививок России [15].

Это, естественно, не могло не повлиять на заболеваемость столбняком и дифтерией в РФ. Так, в частности, среди военнослужащих – участников военных действий в Афганистане и контртеррористических мероприятий был всего 1 случай заболевания столбняком. Заболеваемость населения страны снизилась к 2015–2018 гг. по сравнению с 1964 г. столбняком в 472 раза, дифтерией – в 1294 раза. В 2015–2018 гг. случаи заболевания столбняком не зарегистрированы, выявлены 2 и 3 случая дифтерии [17, 18]. Теоретически обе болезни могут быть полностью предупреждены активной иммунопрофилактикой. Отсутствие регистрации случаев столбняка у служащих силовых структур логично объяснить тем, что все они были своевременно привиты в детстве,

согласно действовавшему Национальному календарю прививок вакциной АКДС, содержащей столбнячный компонент [15]. Взрослых ревакцинируют АДС-М анатоксином и дополнительно, до призыва в ряды Вооруженных сил, пентаанатоксином или другим комплексным препаратом, включающим столбнячный анатоксин в обязательном порядке.

В России, странах СНГ и ближнего зарубежья созданы реальные возможности для предупреждения случаев заболевания столбняком и дифтерией, как это предусмотрено программой Всемирной организации здравоохранения по

расширенной иммунизации детей. Решение этой проблемы зависит исключительно от готовности родителей своевременно прививать своих детей в рамках национальных календарей профилактических прививок, а также педиатров, школьных врачей и практических работников эпидемиологического надзора, контролирующих данные мероприятия. В достигнутом уровне предупреждения двух некогда грозных инфекций с высочайшей смертностью (столбняк и дифтерия) есть существенный вклад научно-исследовательских учреждений Минобороны России.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Лукин Евгений Павлович (Evgeny P. Lukin) – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад-6, Российская Федерация
E-mail: 48cni@mil.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. Бургасов П.Н. Я – верил. 3-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. 272 с.
2. Воробьев А.А. Не подводя черты. Научно-публицистическая повесть. М.: МИА, 2003. 415 с.
3. Лукин Е.П. Первое десятилетие института санитарии МО СССР // Достояние известности – 50 лет Вирологическому центру Министерства обороны / Сост.: Р.Н. Лукина, Е.П. Лукин, В.К. Булавко. Сергиев Посад: Весь Сергиев Посад, 2004. С. 146–151.
4. Матвеев К.И. Эпидемиология и профилактика столбняка. М.: Медицина, 1960. 338 с.
5. Матвеев К.И., Щекочихина Е.А., Сойкина Т.С. и др. Приготовление столбнячных токсинов и анатоксинов на немясных средах // Анаэробные инфекции. Труды межинститутских конференций. М., 1960. Т. 9. С. 88–100.
6. Лебединский В.А., Абдулин Т.А., Евстигнеев В.И., Гарин Н.С., Лукин Е.П. Вклад Научно-исследовательского института микробиологии МО в разработку проблем инфекционной патологии // Воен.-мед. журн. 1989. № 8. С. 67–71.
7. Мы защитили Россию / под ред. В.Н. Орлова. М., 2000. С. 205–208.
8. Кравченко А.Т., Шишулина Л.М. Распространение возбудителей ботулизма и столбняка на территории СССР. М.: Медицина, 1970. 190 с.
9. Королева Г.А., Матвеев К.И., Волкова З.И. Получение на лошадях би- и поливалентных ботулинических сывороток типов А, В, С, и Е. // Журн. микробиол. 1958. № 5. С. 83–87.
10. Маркин А.П., Лукин Е.П., Воробьев А.А., Петрова Е.К. Изучение ботулиновых анатоксинов. Сообщение III. Ботулиновый анатоксин типа С. // Журн. микробиол. 1961; № 12. С. 96–99.
11. Воробьев А.А., Васильев Н.Н., Кравченко А.Т. Анатоксины. М.: Медицина, 1965. 488 с.
12. Кравченко А.Т., Резепов Ф.Ф. К вопросу о механизме действия антиботулинических сывороток // Тезисы межинститутской научной конференции, 9–12.04.1957; Министерство здравоохранения СССР. М., 1957. С. 43–44.
13. Ашмарин И.П., Воронцов И.В., Еничев В.М., Лукин Е.П. Выделение, очистка и некоторые свойства протеиназы *Cl. botulinum* – типа В. // Биохимия. 1962. Т. 27, № 5. С. 788–793.
14. Резепов Ф.Ф. Принципы стандартизации очищенных сорбированных анатоксинов. Научные основы производства вакцин и сывороток // Труды 2-й межинститутской конференции памяти И.И. Мечникова. М., 1964. С. 19.
15. Таточенко В.К. Национальный календарь вакцинации в России. Иммунопрофилактика-2005: руководство. 5-е изд. М., 2005. 192 с.
16. Инфекционные заболевания в России с 1913–2002 гг. Информационный сборник статистических и аналитических материалов. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора МЗ РФ, 2003. 69 с.
17. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях в 2016 г. М., 2017. URL: https://rospotrebnadzor.ru/files/ф%201_рост-сниж_свод%20по%20РФ_январь-декабрь_2018xls
18. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях в 2018 г. М., 2019. URL: https://rospotrebnadzor.ru/files/ф%201_рост-сниж_свод%20по%20РФ_январь-декабрь_2018xls

REFERENCES

1. Burgasov P.N. I had been believing. 3rd ed. Moscow: GEOTAR-Med, 2004: 272 p. (in Russian)
2. Vorobyov A.A. Don't sum up! Scientific writings. Moscow: MIA, 2003: 415 p. (in Russian)
3. Lukin E.P. The creation of a barrier against infections. In: «Worthy to be known». 50 years of the USSR Defense Ministry Virological Center. Comp.: R.N. Lukina, E.P. Lukin, V.K. Bulavko. Sergiev Posad: Ves' Sergiev Posad, 2004: 146–51. (in Russian)
4. Matveev K.I. Epidemiology and prophylaxis of tetanus. Moscow: Meditsina, 1960: 338 p. (in Russian)
5. Matveev K.I., Schekochikhina E.A., Soykina T.S., et al. Preparation of tetanus toxins and anatoxins in the non-meat media. In: Anaerobic Infections. Proceedings of Inter-Institutional Scientific Conference. Moscow, 1960; (9): 88–100. (in Russian)
6. Lebedinsky V.A., Abdulin T.T., Evstigneev V.I., Garin N.S., Lukin E.P. Contribution of the Microbiology Research Institute of the USSR Ministry of Defense in the development of infectious disease problems. *Voenno-meditsinskiy zhurnal* [Military and Medical Journal]. 1989; (8): 67–71. (in Russian)
7. We have defended Russia. In: V.N. Orlov (ed.). Moscow, 2000: 205–8. (in Russian)
8. Kravchenko A.T., Shishulina L.M. Distribution of botulism and tetanus causative agents in the USSR. Moscow: Meditsina, 1970: 190 p. (in Russian)
9. Koroleva G.L., Matveev K.I., Volkova Z.M. Preparation of bi- and polyvalent anti-botulinum sera of types A, B, C and E in horses. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 1958; (5): 83–7. (in Russian)
10. Markin A.P., Lukin E.P., Voronyov A.A., Petrova E.K. The study of botulinum anatoxins. Communication 3. Botulinum anatoxin of type C. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 1961; (12): 96–9. (in Russian)
11. Vorobyov A.A., Vasilyev N.N., Kravchenko A.N. Anatoxins. Moscow: Meditsina, 1965: 488 p. (in Russian)

12. Kravchenko A.T., Rezepov F.F. To the question of the mechanism of action of antitoxic sera. In: Abstracts of Inter-Institutional Scientific Conference, 9–12.04.1957. the USSR Ministry of Health. Moscow, 1957: 43–4. (in Russian)
13. Ashmarin I.P., Vorontsov I.V., Enichev V.M., Lukin E.P. Isolation, purification and some properties of B type *Cl. botulinum* proteinase. *Biokhimiya* [Biochemistry]. 1962; 27 (5): 788–93. (in Russian)
14. Rezepov F.F. Standardization principles of purified adsorbed anatoxins. Scientific basis for the production of vaccines and sera. In: Proceedings of the 2nd Inter-Institutional Scientific Conference in Memory of I.I. Mechnikov. Moscow, 1964: 19. (in Russian)
15. Tatochenko V.K. Russian National Calendar of Vaccinations. *Immunoprophylaxis-2005: Handbook*. 5th ed. Moscow, 2005: 192 p. (in Russian)
16. Infectious diseases in Russia. Statistical reference book. Moscow: Federal'niy tsentr gossanepidnadzora MZ RF, 2002: 69 p. (in Russian)
17. Infectious diseases in the subjects of the Russian Federation for 2016. Moscow, 2017. URL: https://rospotrebnadzor.ru/files/ф%201_пост-сниж_свод%20по%20РФ_январь-декабрь_2018.xls (in Russian)
18. Infectious diseases in the subjects of the Russian Federation for 2018. Moscow, 2019. URL: https://rospotrebnadzor.ru/files/ф%201_пост-сниж_свод%20по%20РФ_январь-декабрь_2018.xls (in Russian)