

УДК 616.9:578:543.544
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-261-267>

ШИФР 03.01.06 СПЕЦИАЛЬНОСТЬ
Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)



Апробация методики эксклюзионной хроматографии для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей

Е. Ю. Мишалова*, Е. В. Гордеев, В. Н. Лебедев, С. А. Мельников, С. А. Нимирская, С. В. Борисевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации,
ул. Октябрьская, д. 11, Сергиев Посад-6, Московская область,
141306, Российская Федерация

Геморрагическая лихорадка, вызываемая вирусом Эбола, является особо опасным вирусным инфекционным заболеванием, характеризующимся летальным исходом в 50–90 % случаев. Важными компонентами рассматриваемого ВОЗ спектра медицинских средств экстренной профилактики и лечения заболевания являются гетерологичные иммуноглобулины с высоким титром вируснейтрализующих антител. Специфическая активность указанных препаратов во многом определяется их фракционным составом, в том числе молекулярно-массовым распределением. Для оценки молекулярно-массового распределения целевого белка в препаратах на основе иммуноглобулина человека традиционно применяется методика эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Использование данной методики для оценки молекулярных параметров гетерологичного иммуноглобулина требует подтверждения специфичности, правильности и прецизионности, а также определения критериев пригодности хроматографической системы применительно к новому объекту. **Цель работы:** апробация методики эксклюзионной ВЭЖХ для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей. **Материалы и методы:** в работе использовали три серии очищенного иммуноглобулина против лихорадки Эбола, выделенного из сыворотки крови лошадей. В качестве стандартных образцов использовали нормальные лошадиный и человеческий иммуноглобулины изотипа IgG. Определение содержания мономеров и других фракций иммуноглобулина с помощью ВЭЖХ проводили с использованием методик, представленных в Европейской фармакопее 9.6 и Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. Для хроматографической оценки качества изучаемых препаратов использовали хроматограф Agilent 1260 Infinity (Agilent, США) с диодно-матричным детектором и хроматографическую колонку Agilent Bio SEC-3. **Результаты:** установлено, что используемая система эксклюзионной ВЭЖХ по показателям фактора разрешения между хроматографическими пиками мономера и димера IgG (1,69 и 2,10) и эффективности хроматографической колонки (>2000) может быть использована для оценки молекулярных параметров гетерологичного иммуноглобулина. Подтверждена воспроизводимость результатов методики. **Выводы:** апробирована методика эксклюзионной ВЭЖХ для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей. Установлено соответствие качества очищенного иммуноглобулина отечественным и международным требованиям по показателю «Молекулярные параметры».

Ключевые слова: гетерологичный иммуноглобулин; вирус Эбола; молекулярные параметры иммуноглобулина; высокоэффективная жидкостная хроматография; оценка качества; критерии пригодности хроматографической системы

Для цитирования: Мишалова ЕЮ, Гордеев ЕВ, Лебедев ВН, Мельников СА, Нимирская СА, Борисевич СВ. Апробация методики эксклюзионной хроматографии для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(4):261–267. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-261-267>

***Контактное лицо:** Мишалова Екатерина Юрьевна; 48cnii@mail.ru

Experimental Testing of a Size-Exclusion Chromatography Method Used for Evaluation of Molecular Parameters of Equine Anti-Ebola Immunoglobulin

E. Yu. Mishalova*, E. V. Gordeev, V. N. Lebedev, S. A. Melnikov, S. A. Nimirskaya, S. V. Borisevich

48 Central Scientific Research Institute,
11 Oktyabr'skaya St., Sergiev Posad-6, Moscow Region
141306, Russian Federation

Haemorrhagic fever caused by the Ebola virus is a highly hazardous infectious disease with a mortality rate of 50–90 %. Heterologous immunoglobulins with a high virus-neutralizing titer are an important element of the WHO-endorsed set of measures for emergency prevention and treatment of the disease. Specific activity of these products is largely determined by their fractional composition, and, in particular, by molecular mass distribution (MMD). The size-exclusion-high-performance liquid chromatography (SEC-HPLC) has traditionally been used for determina-

tion of the MMD of the target protein in human immunoglobulin-based products. The use of this method for evaluation of molecular parameters of heterologous immunoglobulin requires confirmation of its specificity, accuracy and precision, and establishment of the chromatographic system suitability criteria in the context of a new test object. **The aim of the study** was to test the applicability of the SEC-HPLC method to the assessment of molecular parameters of anti-Ebola immunoglobulin derived from horse serum. **Materials and methods:** three batches of purified equine anti-Ebola immunoglobulin were used in the study. Normal equine and human immunoglobulins of the IgG isotype were used as reference standards. The HPLC test procedures described in the European Pharmacopoeia 9.6 and State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed., were used for determination of monomers and other immunoglobulin fractions. An Agilent 1260 Infinity (Agilent, USA) HPLC system with a diode array detector and an Agilent Bio SEC-3 HPLC column were used for quality evaluation of the tested products. **Results:** the resolution factor between IgG monomer and dimer peaks (1.69 and 2.10), and the chromatographic column efficiency (>2000) make it possible to use the SEC-HPLC system for evaluation of molecular parameters of heterologous immunoglobulin. The study demonstrated reproducibility of the test procedure. **Conclusions:** the study confirmed the applicability of the SEC-HPLC procedure for evaluation of molecular parameters of anti-Ebola immunoglobulin derived from horse serum. It demonstrated the compliance of the purified immunoglobulin to the national and international quality requirements in terms of «Molecular parameters».

Key words: heterologous immunoglobulin; Ebola virus; immunoglobulin molecular parameters; high performance liquid chromatography; quality control; chromatographic system suitability criteria

For citation: Mishalova EYu, Gordeev EV, Lebedev VN, Melnikov SA, Nimirskaya SA, Borisevich SV. Experimental testing of a size-exclusion chromatography method used for evaluation of molecular parameters of equine anti-Ebola immunoglobulin. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):261–267. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-261-267>

***Corresponding author:** Ekaterina Yu. Mishalova; 48cnii@mil.ru

Геморрагическая лихорадка, вызываемая вирусом Эбола (семейство *Filoviridae*, род *Ebolavirus*), является особо опасным вирусным заболеванием, характеризующимся летальным исходом в 50–90 % случаев. Эпидемия лихорадки Эбола 2013–2016 гг. была отмечена самым большим числом случаев заболевания (свыше 28 тыс.) за всю историю наблюдений начиная с 1976 г. До недавнего времени лицензированные средства профилактики и лечения заболевания, вызванного вирусом Эбола (ЗВВЭ), отсутствовали. В настоящее время специалистами ВОЗ¹ в качестве одного из средств экстренной профилактики и лечения ЗВВЭ рассматриваются гетерологичные иммуноглобулины с высоким титром вируснейтрализующих антител (ВНА) [1–3].

Опыт применения гетерологичных иммуноглобулинов против различных нозологических форм инфекций свидетельствует о возможности возникновения перекрестных иммунных реакций при повторном введении препаратов, которые могут привести к развитию сывороточной болезни — состояния, развивающегося при лечении иммунными сыворотками животного происхождения, являющегося частным случаем гиперчувствительности III типа [3, 4].

Так, разработанный в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России гетерологичный иммуноглобулин, получаемый из гипериммунной сыворотки крови лошадей методом фракционирования с использованием охлажденного этанола, обладал не только высокими протективными свойствами, но и умеренной реактогенностью. Опыт клинического применения препарата выявил развитие общих и местных реакций у 21 и 33 % пациентов соответственно [5, 6].

Поскольку очистка гетерологичной иммунной сыворотки, используемой для получения иммуноглобулинов, позволяет значительно сократить содержание высокомолекулярных примесных компонентов, отрицательно влияющих на безопасность применения препарата, в 2016 г. в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России был разработан метод получения высоко-

коочищенного гетерологичного иммуноглобулина [7]. Метод заключается в спиртовом осаждении иммуноглобулинов, последующей очистке и концентрировании с применением ионообменной, эксклюзионной хроматографии и стерилизующей фильтрации [8].

Для оценки степени очистки полученных препаратов ранее использовали метод гель-электрофореза. Однако указанный метод не позволяет провести количественную оценку молекулярно-массового распределения, а именно охарактеризовать целевой продукт по содержанию мономеров, димеров и полимеров.

Необходимость оценки молекулярных параметров иммуноглобулинов определена отечественными (ОФС 1.8.2.0006.15² Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд.) и международными (монография³ Европейской фармакопеи 9.6) требованиями. При этом методика, изложенная в Европейской фармакопее, помимо оценки гомологичных иммуноглобулинов (выделенных из плазмы крови человека) также предполагает оценку гетерологичных иммуноглобулинов (выделенных из плазмы крови животных). Количественной характеристикой эффективности и безопасности препаратов иммуноглобулинов в данном случае служит требование к процентному содержанию основного компонента — мономеров и димеров не менее 95 %, а также примесных компонентов полимеров, агрегатов и фрагментов — суммарно не более 5 %⁴. Данная методика была взята за основу оценки гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки Эбола.

Цель работы — апробация методики эксклюзионной ВЭЖХ для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- оценить разделяющую способность хроматографической системы и ее специфичность применительно к гетерологичному иммуноглобулину против лихорадки Эбола;

¹ Болезнь, вызванная вирусом Эбола. ВОЗ. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease>

² Общая фармакопейная статья 1.8.2.0006.15 Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³ Anti-T lymphocyte immunoglobulin for human use, animal. European Pharmacopoeia 9.6.

⁴ Там же.

- подтвердить параметры пригодности хроматографической системы;
- провести оценку молекулярных параметров гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки Эбола.

Материалы и методы

1. Испытуемые образцы 1–3: иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей, очищенный (серии № 2–4, иммуноглобулин Эбола), раствор, содержащий 20 ммоль натрия дигидрофосфата моногидрата и 0,2 % глицина.

2. Стандартный образец 1 — нормальный лошадиный иммуноглобулин изотипа IgG, лиофилизат 50 мг/амп (Rockland, США), кат. № 008–0102.

3. Стандартный образец 2 — раствор человеческого нормального иммуноглобулина (фармакопейный стандарт), кат. № Y0000488 (human immunoglobulin (molecular size) BRP Batch 1), рекомендованный в монографии Европейской фармакопеи 9.6⁵.

4. Смесь белков (маркеры молекулярных масс) AdvanceBio SEC Protein Standard, кат. № 5190–9417 (Agilent, США).

Растворы маркеров молекулярных масс и стандартных образцов готовили согласно инструкциям по применению.

5. Реактивы для приготовления буферных растворов: натрий дигидрофосфат моногидрат (Merck, Германия), натрий гидрофосфат дигидрат (Merck, Германия), натрия хлорид (Acros, Бельгия), натрия азид (Serva, Германия).

6. Хроматографическая колонка Agilent Bio SEC-3, размер 300×7,8 мм, диаметр частиц 3 мкм (Agilent, США) позволяет раз-

делять белки в диапазоне молекулярных масс от 10 до 600 кДа. Исследование проводили на хроматографической системе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором.

7. Определение молекулярных параметров испытуемых образцов проводили в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи 9.6 и Государственной фармакопеи Российской Федерации⁶. Испытуемые образцы доводили до концентрации 5 мг/мл раствором, содержащим 20 ммоль натрия дигидрофосфата моногидрата и 0,2 % глицина. Данный раствор использовали в качестве плацебо. Объем пробы — 20 мкл, содержание белка — около 100 мкг. Скорость потока — 0,5 мл/мин. Длина волны детектирования — 280 нм. Последовательность ввода проб: П-С₁-С₂-О₁-О₂-О₃-С₁-С₂, где П — плацебо, С₁ и С₂ — растворы стандартных образцов лошадиного и человеческого иммуноглобулинов соответственно, О₁, О₂, О₃ — испытуемые образцы иммуноглобулинов (серии № 2–4). Инъекции испытуемых образцов повторяли трижды для каждой серии.

Результаты и обсуждение

Разделяющая способность хроматографической системы была подтверждена с помощью смеси маркеров молекулярных масс (рис. 1, табл. 1).

Белки исследуемой смеси разделены по времени удерживания в порядке уменьшения их молекулярных масс (рис. 1, табл. 1). Время удерживания гамма-глобулина составило 15,68 мин и соответствует молекулярной массе 150 кДа (рис. 1, пик 2).

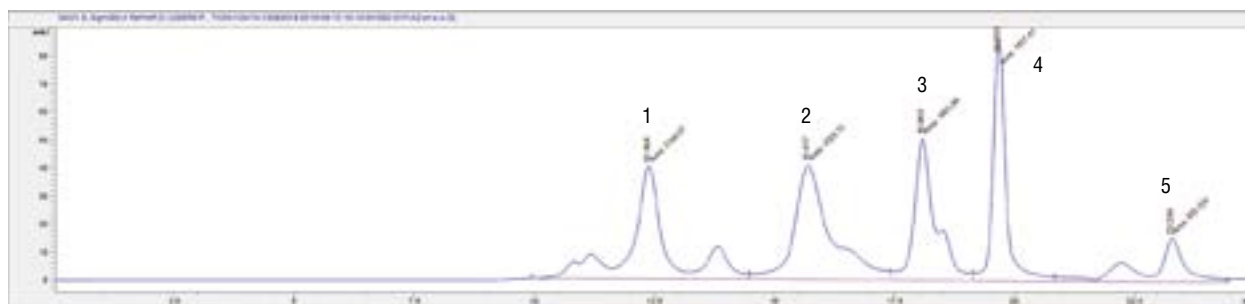


Рис. 1. Хроматограмма ВЭЖХ-анализа маркеров молекулярных масс Agilent AdvanceBio SEC Protein Standard. Ось абсцисс — время удерживания, мин; ось ординат — величина абсорбции, мАУ. 1–5 — хроматографические пики, соответствующие маркерам молекулярных масс.

Fig. 1. HPLC chromatogram of molecular weight markers of Agilent AdvanceBio SEC Protein Standard. X-axis — retention time, min; Y-axis — absorbance, mAU. 1–5 — chromatographic peaks corresponding to the molecular weight markers.

Таблица 1. Результаты оценки хроматографических показателей разделения маркеров молекулярных масс
Table 1. The results of evaluation of chromatographic parameters of resolution of molecular weight markers

Хроматографический пик ^а Chromatographic peak ^а	Маркер-белок Marker protein	Молекулярная масса, Да Molecular weight, Da	Фактор разрешения Resolution factor	Время удерживания, мин Retention time, min
1	Тироглобулин (бычий) Thyroglobulin (bovine)	670 000	2,15	12,364
2	Гамма-глобулин (бычий) γ-globulin (bovine)	150 000	3,07	15,677
3	Овальбумин (яичный) Ovalbumin (egg white)	45 000	3,19	18,063
4	Миоглобин (лошадиное сердце) Myoglobin (equine heart)	17 000	3,16	19,651
5	Ангиотензин (человеческий) Angiotensin (human)	1000	7,55	23,259

^а Нумерация хроматографических пиков соответствует нумерации пиков на рисунке 1.

^а Peak numbers correspond to those in Figure 1.

⁵ Там же.

⁶ Общая фармакопейная статья 1.8.2.0006.15 Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Для подтверждения специфичности и параметров пригодности хроматографической системы проводили сравнительный анализ результатов хроматографического разделения стандартных образцов 1 и 2. Выбор в качестве стандартного образца 1 — нормального лошадиного иммуноглобулина обусловлен его видовой идентичностью по отношению к испытуемому образцу, а также схожим подходом к способу получения. Результаты представлены на рисунке 2 и в таблице 2.

Сравнительный хроматографический анализ различных по видовому происхождению иммуноглобулинов по содержанию мономерных, димерных и полимерных фракций,

определенному по времени удерживания пиков мономеров и димеров (рис. 2, табл. 2), показал их идентичность вне зависимости от видового происхождения сыворотки крови, что свидетельствует об удовлетворительной специфичности методики эксклюзионной ВЭЖХ применительно к гетерологичному (лошадиному) иммуноглобулину. Кроме того, относительные времена удерживания пиков димеров и отношение времен удерживания пиков мономера свидетельствуют о возможности использования как стандартного образца 1, так и стандартного образца 2 в качестве стандартного образца сравнения при определении молекулярно-массового распределения испытуемых образцов. Подтверждением пригод-

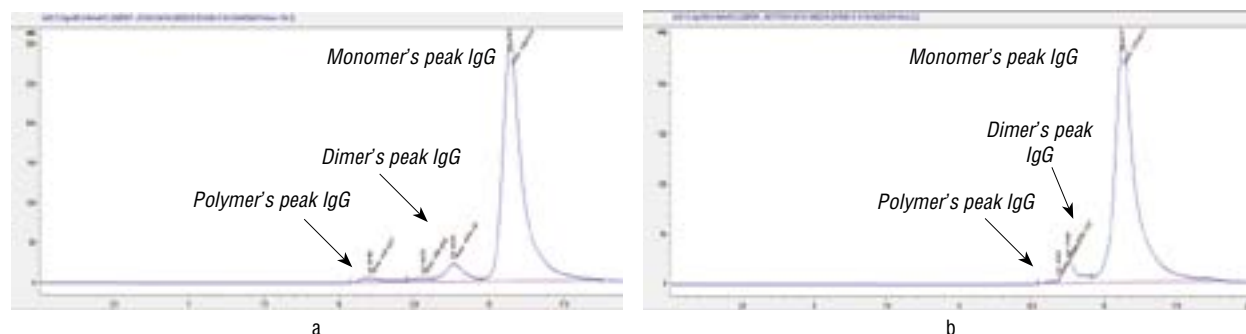


Рис. 2. Хроматограммы разделения стандартных образцов иммуноглобулинов методом эксклюзионной ВЭЖХ: а — нормальный иммуноглобулин из сыворотки крови лошадей, б — нормальный человеческий иммуноглобулин (фармакопейный стандарт). Ось абсцисс — время удерживания, мин; ось ординат — величина абсорбции, mAU.

Fig. 2. SEC-HPLC chromatograms of immunoglobulin reference standards: a — normal immunoglobulin from horse blood serum, b — human normal immunoglobulin (pharmacopoeial reference standard). X-axis — retention time, min; Y-axis — absorbance, mAU.

Таблица 2. Результаты оценки хроматографических показателей пригодности системы (n=3)
Table 2. The results of evaluation of the chromatographic system suitability parameters (n=3)

Показатель Parameter	Стандартный образец иммуноглобулина Immunoglobulin reference standard		Требования Европейской фармакопеи 9.6 European Pharmacopoeia 9.6 requirements	Соответствие требованиям Европейской фармакопеи 9.6 Compliance with the European Pharmacopoeia 9.6 requirements
	1	2		
Время удерживания мономера, мин Monomer retention time, min	15,70±0,04	15,64±0,05	-	-
Время удерживания димера, мин Dimer retention time, min	13,83±0,01	13,78±0,02	-	-
Содержание компонентов IgG в растворе, % Content of IgG components in the solution, %				
- полимеров - polymers	4,01±0,020	3,87±0,014	-	-
- димеров - dimers	6,86±0,069	6,91±0,029		
- мономеров - monomers	89,13±0,090	89,22±0,089		
Относительное время удерживания пика димера Relative retention time of the dimer peak	0,88±0,02	0,88±0,02	0,85±0,05	Соответствует Complies
Отношение времен удерживания мономеров Ratio of monomer retention times	1,00±0,01		1,00±0,01	Соответствует Complies
Фактор разрешения между пиками (Rs) Resolution between the peaks (Rs)	1,69	2,1	1,5–2,5	Соответствует Complies
Число теоретических тарелок, вычисленное для пика мономера Number of theoretical plates calculated for the monomer peak	3710	3604	>2000	Соответствует Complies

Примечание. Представлены средние значения и их квадратичные отклонения, полученные из трех независимых исследований.
Note. The table gives mean values and their square deviations based on three independent experiments.

ности хроматографической системы могут служить значения фактора разрешения между пиками и числа теоретических тарелок, соответствующие требованиям Европейской фармакопеи 9.6.

После подтверждения специфичности хроматографической системы и параметров ее пригодности был проведен ВЭЖХ-анализ трех серий иммуноглобулина Эбола (рис. 3, табл. 3).

Как следует из данных, представленных на рисунке 3 и в таблицах 2, 3, на хроматограммах испытуемых образцов 1–3 можно идентифицировать пики мономеров и димеров, соответствующие временам удерживания пиков мономеров и димеров стандартных образцов 1 и 2. В то же время количественное содержание данных примесных компонентов, измеренное по площади пиков, существенно ниже, чем в стандартных образцах. Это обусловлено проведением

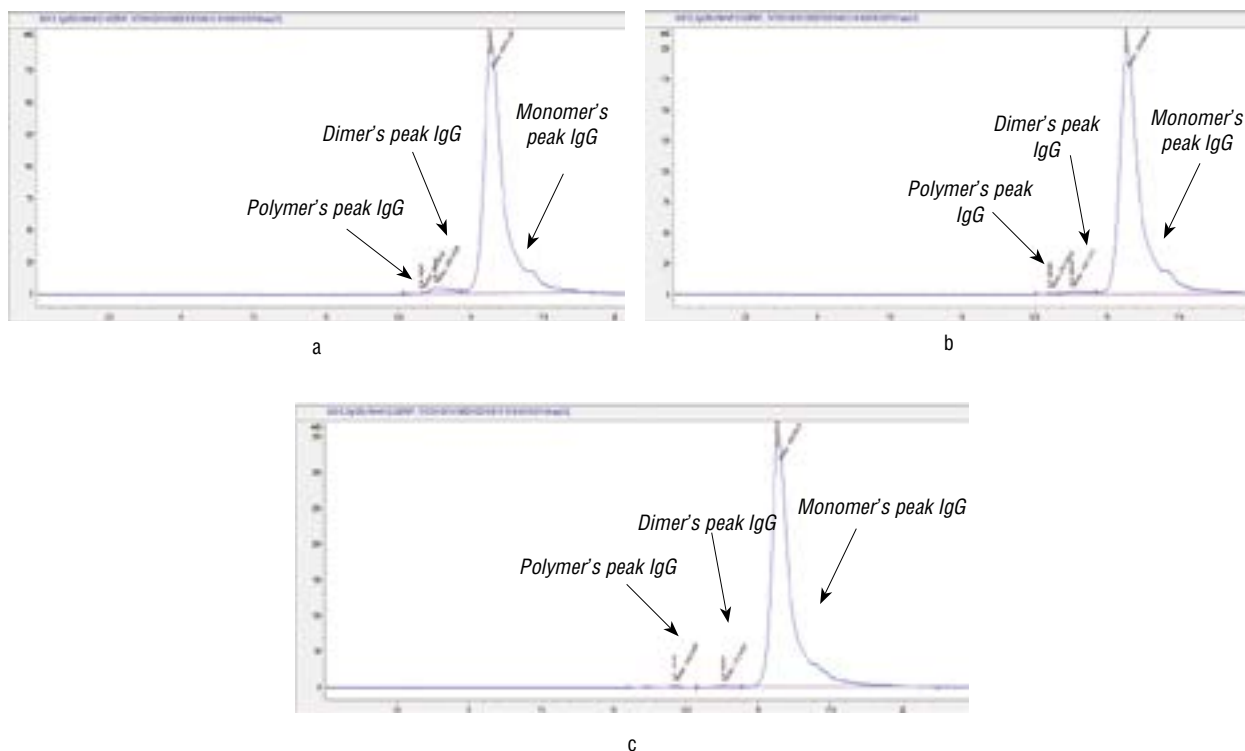


Рис. 3. Хроматограммы ВЭЖХ-анализа серий № 2 (а), 3 (b), 4 (с) иммуноглобулина Эбола. Ось абсцисс — время удерживания, мин; ось ординат — величина абсорбции, mAU.

Fig. 3. HPLC chromatograms of batches No. 2 (a), 3 (b), and 4 (c) of anti-Ebola immunoglobulin. X-axis — retention time, min; Y-axis — absorbance, mAU.

Таблица 3. Результаты оценки молекулярно-массового распределения иммуноглобулина Эбола по данным эксклюзионной ВЭЖХ (n=3)

Хроматографический показатель Chromatographic parameter	Оценка показателей качества иммуноглобулина Immunoglobulin quality parameters		
	Серия № 2 IgG IgG batch 2	Серия № 3 IgG IgG batch 3	Серия № 4 IgG IgG batch 4
Время удерживания, мин Retention time, min			
- полимеров - polymers	13,3±0,023	13,1±0,008	12,1±0,002
- димеров - dimers	13,8±0,002	13,8±0,006	13,8±0,004
- мономеров - monomers	15,7±0,002	15,7±0,001	15,7±0,057
Содержание компонентов IgG в растворе, % Content of IgG components in the solution, %			
- полимеров - polymers	0,2±0,020	0,22±0,014	0,6±0,019
- димеров - dimers	2,7±0,069	1,40±0,029	0,4±0,045
- мономеров - monomers	97,1±0,090	98,37±0,028	98,9±0,053

дополнительных стадий хроматографической очистки испытуемых иммуноглобулинов, в то время как стандартные образцы получены только при помощи методов осаждения.

Времена удерживания пиков мономера и димера находятся в пределах ($1,0 \pm 0,01$) по отношению к соответствующим пикам на хроматограммах стандартных образцов. Доля мономеров и димеров в изученных сериях препарата иммуноглобулина против лихорадки Эбола, очищенного, в среднем составила $99,43 \pm 0,35\%$, количество примесных полимеров не превышало $0,22\%$. Полученные значения соответствуют требованиям, предъявляемым к гетерологичным иммуноглобулинам Европейской фармакопеи 9.6, а также указывают на высокую степень очистки от высокомолекулярных компонентов иммуноглобулинов в испытуемых образцах, что может положительно повлиять на безопасность его применения.

Заключение

Апробирована методика эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей. Подтверждена разделяющая способность хроматографической системы и ее специфичность применительно к гетерологичному иммуноглобулину против лихорадки Эбола. Показана возможность использования нормального лошадиного иммуноглобулина изотипа IgG в качестве стандартного образца сравнения. Установлено, что значения параметров пригодности хроматографической системы соответствуют международным требованиям. Проведена оценка молекулярно-массового распределения по содержанию мономеров, димеров и примесных высокомолекулярных компонентов для трех серий иммуноглобулина против лихорадки Эбола. Полученные данные свидетельствуют о соответствии качества очищенного иммуноглобулина отечественным и международным требованиям по показателю «Молекулярные параметры».

В целом полученные в ходе апробации результаты могут служить основанием для внесения показателя «Молекулярные параметры» в спецификацию на иммуноглобулин против лихорадки Эбола, выделенный из сыворотки крови лошадей, с последующим включением в соответствующую фармакопейную статью Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgments. The study was performed without external funding.

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

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

Литература/References

1. Feldmann H, Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*. 2011;377(9768):849–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60667-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60667-8)
2. Dowall SD, Callan J, Zeltina A, Al-Abdulla I, Strecker T, Fehling SK, et al. Development of a cost-effective ovine polyclonal antibody-based product, EBOTab, to treat Ebola virus infection. *J Infect Dis*. 2016;213(7):1124–33. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv565>
3. Борисевич ИВ, Краснянский ВП, Михайлов ВВ, Потрываева НВ, Градобоев ВН, Тиманькова ГД, Карелов ЮМ. Разработка и получение иммуноглобулина против лихорадки Эбола. В кн: *Изучение и профилактика особо опасных вирусных инфекций*. Кольцово; 1993. С. 44. [Borisevich IV, Krasnyanskiy VP, Mikhaylov VV, Potryvaeva NV, Gradoboev VN, Timan'kova GD, Karelov YuM. Development and production of immunoglobulin against Ebola. In: *The study and prevention of especially dangerous viral infections*. Koltsovo; 1993. P. 44 (In Russ.)]
4. Maruyama T, Rodriguez LL, Jahrling PB, Sanchez A, Khan AS, Nichol ST, et al. Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection. *J Virol*. 1999;73(7):6024–30.
5. Михайлов ВВ, Борисевич ИВ, Тиманькова ГД, Краснянский ВП, Потрываева НВ, Лебединская ЕВ, Черникова НК. Препарат, содержащий иммуноглобулин против лихорадки Эбола, из сыворотки крови лошадей, жидкий (иммуноглобулин Эбола). Патент Российской Федерации № 2130318; 1999. [Mikhaylov VV, Borisevich IV, Timan'kova GD, Krasnyanskiy VP, Potryvaeva NV, Lebedinskaya EV, Chernikova NK. Preparation containing immunoglobulin against Ebola fever from horse blood serum and liquid (Ebola immunoglobulin). Patent of the Russian Federation No. 2130318; 1999 (In Russ.)]
6. Борисевич ИВ, Черникова НК, Марков ВИ, Краснянский ВП, Борисевич СВ, Рождественский ЕВ. Опыт клинического применения специфического иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей в качестве средства экстренной профилактики лихорадки Эбола. *Вопросы вирусологии*. 2017;62(1):25–9. [Borisevich IV, Chernikova NK, Markov VI, Krasnyanskiy VP, Borisevich SV, Rozhdestvenskiy EV. An experience in the clinical use of specific immunoglobulin from horse blood serum for prophylaxis of Ebola haemorrhagic fever. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2017;62(1):25–9 (In Russ.)]
7. Fernandes A, Kaundinya JO, Daftary G, Saxena L, Banerjee S, Pattnaik P. Chromatographic purification of equine immunoglobulin G F(ab)₂ from plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;87(1):109–15. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.10.030>
8. Попова АЮ, Демина ЮВ, Смоленский ВЮ, Гордеев ЕВ, Рождественский ЕВ, Краснянский ВП и др. Способ получения иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей, жидкого. Патент Российской Федерации № 2673546; 2018. [Popova AYU, Demina YuV, Smolenskiy VYu, Gordeev EV, Rozhdestvenskiy EV, Krasnyanskiy VP, et al. Method for producing liquid immunoglobulin against Ebola fever from horse blood serum. Patent of the Russian Federation No. 2673546; 2018 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Мишалова Екатерина Юрьевна. *Ekaterina Yu. Mishalova*

Гордеев Евгений Васильевич. *Evgeniy V. Gordeev*

Лебедев Виталий Николаевич, д-р биол. наук, проф. *Vitaly N. Lebedev, Dr. Sci. (Biol.), Professor*

Мельников Сергей Алексеевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. *Sergey A. Melnikov, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate*

Нимирская Светлана Александровна, канд. мед. наук. *Svetlana A. Nimirskaya, Cand. Sci. (Med.)*

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН. *Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Corr. Member of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>*

Поступила 12.12.2018

После доработки 05.11.2019

Принята к публикации 22.11.2019

Received 12 December 2018

Revised 5 November 2019

Accepted 22 November 2019