

БИОПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал

Том 17, №1 (61)

Январь – март 2017



Л. А. Тарасевич

Учредитель

Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы
средств медицинского
применения» Министерства
здравоохранения Российской
Федерации

Издатель

Издательский дом «Фолиум»

Главный редактор

Олефир Ю. В.

Заместители

главного редактора

Меркулов В. А.
Бондарев В. П.

Ответственный секретарь

Климов В. И.

Научный редактор

Лебединская Е. В.

Редактор

Шестакова А. П.

Члены редколлегии

Авдеева Ж. И.
Балаболкин И. И.
Борисевич И. В.
Воробьевна М. С.
Гущин И. С.
Дармов И. В.
Иванов В. Б.
Игнатьев Г. М.
Леви Д. Т.
Медунцын Н. В.
Мовсесянц А. А.
Мосягин В. Д.
Хамитов Р. А.

Редакционный совет

Амвросьев Т. В. (Беларусь)
Борисевич С. В. (Сергиев Посад)
Брико Н. И. (Москва)
Волчков В. Е. (Франция)
Гинцбург А. Л. (Москва)
Дятлов И. А. (Оболенск)
Зверев В. В. (Москва)
Кутырев В. В. (Саратов)
Льзов Д. К. (Москва)
Михайлов М. И. (Москва)
Покровский В. И. (Москва)
Савченко В. Г. (Москва)
Учайкин В. Ф. (Москва)
Хайтов Р. М. (Москва)
Чумаков К. М. (США)

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Процедура обновления штамма вакцины против гриппа в странах ЕС.

Вопросы качества

А. А. Солдатов, Ж. И. Авдеева, В. П. Бондарев 3

Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств

Н. А. Аллапатова, Л. А. Гайдерова, А. К. Яковлев, Е. В. Мотузова, С. Л. Лысикова,
А. А. Солдатов, Ж. И. Авдеева 13

Проблемы оценки неопределенности методик испытаний и стандартных образцов иммунобиологических лекарственных средств

Р. А. Волкова, О. В. Фадейкина 27

Сравнительный анализ требований к качеству гетерологичных сывороточных препаратов в фармакопеях ведущих стран — производителей лекарственных средств

О. В. Перельгина, Е. И. Комаровская 32

Гетерологичные сывороточные препараты в практике современной медицины

О. В. Перельгина, Е. И. Комаровская, А. В. Мухачева, Л. В. Саяпина,
Ю. И. Обухов, В. П. Бондарев 41

Оригинальные статьи

Исследование остаточной вирулентности и иммунизирующей способности

посевных серий *Mycobacterium bovis* BCG-1

Д. Т. Леви, Н. В. Александрова, Ю. И. Обухов 48

Влияние рекомбинантного интерферона альфа-2b на относительное содержание

CD56^{bright}-популяции натуральных киллеров в периферической крови
беременных женщин с урогенитальными инфекциями

Е. Н. Выжлова, В. В. Малиновская, Е. В. Дмитриева, С. В. Новикова 54

Валидация метода определения содержания активатора прекалликреина

в препарате Альбумин человека

М. В. Томилин, Е. В. Филатова, М. М. Кузнецова, В. В. Судакова, Н. В. Зубкова 59

Адрес редакции:

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.

Тел.: +7 495 234-61-04, +7 495 214-91-19 (доб. 63-35; 63-36). E-mail: biopreparaty@expmed.ru

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации средства
массовой информации ПИ № ФС77-53128 от 14 марта 2013 г.

Все права защищены. Любое воспроизведение опубликованных материалов без письменного со-
гласия редакции не допускается. При перепечатке ссылка на журнал обязательна.

Журнал включен в научометрическую базу данных Science Index.

Подписано в печать 28.02.2017.

Подписной индекс 25120

в каталоге «Газеты. Журналы» агентства «Роспечать».

Выходит один раз в три месяца.

Дизайн, верстка, печать: Издательский дом «Фолиум»



BIO PREPARATIONS

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal



L. A. Tarasevich

Founder

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation

Publisher

Folium Publishing Company

Editor-in-Chief

Olefir Yu. V.

Deputy Editor-in-Chief

Merkulov V. A.
Bondarev V. P.

Executive Secretary

Klimov V. I.

Science Editor

Lebedinskaya E. V.

Editor

Shestakova A. P.

Editorial Board

Avdeeva Zh. I.
Balabolkin I. I.
Borisevich I. V.
Darmov I. V.
Gouschin I. S.
Ivanov V. B.
Ignatiev G. M.
Khamitov R. A.
Levi D. T.
Medunitsyn N. V.
Movsesyants A. A.
Mosyagin V. D.
Vorobieva M. S.

Editorial Council

Amvrosieva T. V. (Belarus)
Borisevich S. V. (Sergiev Posad)
Briko N. I. (Moscow)
Volchkov V. E. (France)
Gintzburg A. L. (Moscow)
Dyatlov I. A. (Obolensk)
Zverev V. V. (Moscow)
Kutyrin V. V. (Saratov)
Lvov D. K. (Moscow)
Mikhailov M. I. (Moscow)
Pokrovskiy V. I. (Moscow)
Savchenko V. G. (Moscow)
Uchaikin V. F. (Moscow)
Khaitov R. M. (Moscow)
Chumakov K. M. (USA)

CONTENTS**Reviews**

Update of influenza vaccine strains in Europe. Quality issues A. A. Soldatov, Zh. I. Avdeeva, V. P. Bondarev	3
Assessment of biotechnological products specific activity N. A. Alpatova, L. A. Gayderova, A. K. Yakovlev, E. V. Motuzova, S. L. Lysikova, A. A. Soldatov, Zh. I. Avdeeva	13
Estimation of uncertainty of test methods and reference standards used for immunobiological medicines R. A. Volkova, O. V. Fadeikina	27
Comparative analysis of leading pharmacopoeias requirements for the quality of heterologous serum products O. V. Pereleygina, E. I. Komarovskaya	41
Clinical experience with heterologous serum products O. V. Pereleygina, E. I. Komarovskaya, A. V. Mukhacheva, L. V. Sayapina, Yu. I. Obukhov, V. P. Bondarev	32

Original Articles

Determination of residual virulence and immunogenicity of <i>Mycobacterium bovis</i> BCG-1 seed lots D. T. Levi, N. V. Aleksandrova, Yu. I. Obukhov	48
The effect of recombinant interferon alpha-2b on the relative content of CD56^{bright} NK cells in the peripheral blood of pregnant women with chronic urogenital infections E. N. Vyzhlova, V. V. Malinovskaya, E. V. Dmitrieva, S. V. Novikova	54
Validation of the method for determination of prekallikrein activator in Human Albumin M. V. Tomilin, E. V. Filatova, M. M. Kuznetsova, V. V. Sudakova, N. V. Zubkova	59

Address of the Editorial Office:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow, 127051, Russian Federation. Tel.: +7 495 234-61-04, +7 495 214-91-19 (ext. 63-35; 63-36). E-mail: biopreparaty@expmed.ru

Publication is registered by the Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom, Information Technologies and Mass Communications. Certification of the Mass Media Registration PI No. ФС77-53128 of March 14, 2013.

All rights reserved. No part of this publication may be used or reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the Publishers. Reproducing any part of this material a reference to the journal is obligatory.

The publication data for the journal is 28.02.2017.

Publication is once every 3 months.

CRC preparation and printing: Folium Publishing Company.



Процедура обновления штамма вакцины против гриппа в странах ЕС. Вопросы качества

А. А. Солдатов, Ж. И. Авдеева, В. П. Бондарев

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 15.09.2016. Принята к публикации 07.02.2017.

Несмотря на регулярно проводимые профилактические мероприятия, в 2009–2010 годах произошло развитие пандемии гриппа. Анализ опыта пандемии выявил недостатки регуляторных требований, касающихся как разработки новых вакцин против гриппа, так и процедуры замены/обновления сезонных штаммов вакцин против гриппа. Учитывая опыт пандемии гриппа, Европейским медицинским агентством по лекарственным средствам (EMA) в 2014–2016 годах были обновлены уже имеющиеся и разработаны новые рекомендации по оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований при разработке вакцин против гриппа. Обновленные требования касаются не только вопросов оценки качества, но и процедуры замены/обновления актуальных штаммов сезонных, препандемических и пандемических вакцин против гриппа. Опыт, накопленный EMA, может быть полезен при подготовке отечественной нормативной базы, необходимой для повышения эффективности и безопасности вакцин против гриппа.

Ключевые слова: вакцины против гриппа (сезонные, пандемические, препандемические); аттенуированные вакцины (аттенуированные вакциновые штаммы); замена сезонного штамма.

Библиографическое описание: Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Бондарев ВП. Процедура обновления штамма вакцины против гриппа в странах ЕС. Вопросы качества. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 3–12.

Грипп входит в группу респираторных вирусных инфекций и является острым инфекционным заболеванием, вызываемым вирусом гриппа. Название заболевания происходит от французского «grippe» или немецкого «gruppen», что можно перевести как «схватить» или «резко сжать». Во многих европейских языках грипп называют «инфлюэнцией» (от итальянского слова «influenza» — «воздействие») в связи с очень быстрым заражением указанным заболеванием большого количества населения.

Вирусы гриппа относятся к семейству вирусов Orthomyxoviridae, которое включает роды Influenza A, B, C (A, B, C — типы). В зависимости от специфичности поверхностных антигенов (гликопротеинов) — гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA), вирусы делятся на подтипы (серотипы). В настоящее время известны 16 типов гемагглютинина (обозначаемые как H1, H2, ..., H16) и 9 типов нейраминидазы (N1, N2, ..., N9). Комбинация типов гемагглютинина и нейраминидазы (например, H1N1, H3N2, H5N1 и т.п.) называется подтипов; из 144 теоретически возможных подтипов известны 115. Развитие эпидемии чаще всего вызывают три подтипа HA (H1, H2, H3) и два подтипа NA (N1, N2) [1].

Циркуляция вируса в естественных условиях сопровождается очень частым изменением его антигенных структуры. В зависимости от места, где впервые был выявлен вирус, и его антигенных структуры название вируса включает номер, место и год выделения вируса (например, A/New Caledonia/120/99 (H1N1) или B/Hong Kong/330/2001). Согласно Международной номенклатуре, обозначение штаммов вируса включает следующие сведения: род, место изоляции, номер изолята, год изоляции, разновидность гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). Например, A/Singapore/l/57 (H2N2) обозначает вирус

рода A, выделенный в 1957 г. в Сингапуре, l — номер изолята, имеющий разновидность антигенов H2N2.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) только тяжелыми формами гриппа в мире ежегодно заболевает 3–5 млн человек. В России ежегодно заболевает гриппом и другими ОРВИ 25–35 млн, из них 45–60 % — дети. По оценкам ВОЗ от всех вариантов вируса во время сезонных эпидемий в мире ежегодно умирает от 250 до 500 тыс. человек (большинство из них старше 65 лет), в некоторые годы число смертей может достигать миллиона. Экономический ущерб Российской Федерации от сезонного эпидемического гриппа составляет до 100 млрд руб/год (около 85 % экономических потерь, связанных с инфекционными заболеваниями) [2].

Наиболее эффективным средством борьбы с гриппом является вакцинация. Основная проблема производства вакцин против гриппа связана с необходимостью ежегодного сезона обновления штамма вируса гриппа, поэтому очень важно выбрать именно тот штамм, который будет актуальным для профилактики в данном сезоне. В связи с этим в 1947 году ВОЗ была запущена Глобальная программа по мониторингу гриппа. На основе учета заболеваемости и контроля за изменением штаммов вируса ВОЗ два раза в год публикует рекомендации о штаммах вирусов, которые могут быть потенциальной причиной развития сезонной эпидемии гриппа. На основе этих рекомендаций национальные комитеты контроля гриппа с учетом региональной ситуации составляют рекомендации для производителей о предполагаемых штаммах для сезонных вакцин.

Для стран северного полушария ВОЗ публикует рекомендации о сезонных штаммах обычно в феврале. Поэтому, чтобы получить эффект от вакцинации против гриппа, с февраля в очень короткие сроки необходимо разработать,

изучить, оценить и зарегистрировать вакцину для конкретного эпидемического сезона. Как показал опыт развития эпидемий, еще более сложная ситуация с разработкой вакцин наблюдается при развитии пандемий гриппа.

Поэтому во многих странах приняты особые нормативные требования, регламентирующие разработку и регистрацию сезонных и пандемических вакцин против гриппа, прежде всего это касается сроков и объема представляемых для регистрации данных. В странах Европейского Союза (ЕС) накоплен большой опыт регистрации препаратов для профилактики инфекционных заболеваний и вакцинации населения.

В обзоре представлен анализ нормативных документов, регламентирующих оценку качества при замене штаммов вакцин против гриппа в странах Европейского Союза.

Пандемия гриппа 2009–2010 годов

Периодичность возникновения пандемий гриппа в человеческой популяции связана с шифтовыми (кардиальными) изменениями антигенных характеристик возбудителя. Обычно антигенный шифт вирусов гриппа А возникает при смене одного типа гемагглютинина (или нейраминидазы) на другой, т.е. с появлением нового антигенного варианта вируса. Последняя пандемия произошла в 2009–2010 годах. Ожидание пандемии и подготовка к ней начались еще в 1997 году после вспышки гриппа у людей, вызванного высокопатогенным вирусом гриппа А(H5N1), в Гонконге [3]. При этом считалось, что именно этот штамм может стать причиной пандемии в ближайшее время. В 2009 году ВОЗ опубликовала сообщение о начале пандемии гриппа, вызванной появлением совершенно нового возбудителя гриппа А(H1N1) (A/California/7/2009), выделенного от заболевших людей в Мексике.

Вирус А(H1N1) (A/California/7/2009) некоторое время циркулировал в популяции свиней в Мексике и на юге США, не вызывая заболеваний ни у животных, ни у человека. В марте 2009 года азиатский вирус, по непонятным причинам, мутировал в вирулентный и началась эпизоотия гриппа свиней в Мексике. Затем вирус свиного гриппа А(H1N1) (A/California/7/2009) стал патогенным для человека. До сих пор отсутствует единое мнение о причинах, которые привели к появлению патогенного для человека вируса. Начавшаяся в Мексике эпидемия заболевания среди людей уже через 3 месяца охватила 137 стран [4].

Ситуация при пандемии 2009–2010 годов осложнялась тем, что не было зарегистрированной вакцины против данного штамма гриппа, поэтому в начале пандемии большие надежды возлагали на противовирусные препараты (например, осельтамивир) [5].

Учитывая уроки пандемии 2009–2010 гг., ЕМА были обновлены основные нормативные требования, регламентирующие оценку качества, проведение доклинических и клинических исследований и процедуру регистрации вакцин против гриппа. При этом каждый новый разработанный документ заменял несколько документов, которые регламентировали отдельные стороны разработки и регистрации вакцин против гриппа до пандемии 2009–2010 годов (табл. 1).

Оценка качества вакцин против гриппа

Новые требования для оценки качества вакцин против гриппа включают разделы, посвященные оценке качества

инактивированных, аттенуированных вакцин, и содержат ряд приложений, касающихся практических вопросов изучения качества вакцин.

Инактивированные вакцины

Инактивированные вакцины против сезонного гриппа. Инактивированные вакцины против сезонного гриппа получают на куриных эмбрионах или на клеточных субстратах. Разрабатываемые вакцины должны соответствовать требованиям соответствующих фармакопейных стандартов Европейской фармакопеи (ЕФ) [9–15].

Штамм-кандидат в вакцины (CVV) может быть представлен производителям Межлабораторным центром ВОЗ (CC), специализированной лабораторией (ERL) или другой сертифицированной лабораторией, специализирующейся на получении посевных штаммов вируса гриппа. При этом возможны следующие варианты CVV:

- высокопродуктивный классический реассортант;
- реассортант, полученный методом обратной генетики;
- дикий штамм вируса (нереассортантный).

Оценка качества CVV проводится на основании требований ЕФ. Для регистрации вакцины в первую очередь необходимо представить общую характеристику разработки вакцинного штамма (история посевного штамма, уровень пассажей). Для штаммов, которые получены с использованием методов обратной генетики или с использованием клеток животных — материалы, которые свидетельствуют об отсутствии контаминации вакцинного штамма посторонними вирусами. Если в качестве штамма для вакцины разработчиком выбран свой собственный дикий штамм, то необходимо представить антигенную характеристику данного штамма.

Получение посевных серий штамма проводится в контролируемой среде в условиях, соответствующих требованиям GMP. В каждой серии посевного материала определяют антигены НА и НА, для чего обычно используют специфические антисыворотки, получаемые из межлабораторного центра ВОЗ. Кроме того, проводится контроль посевного материала на наличие посторонних примесей (например, компонентов культуральной среды), которые могут представлять угрозу безопасности вакцины.

Представляемые для регистрации материалы должны, прежде всего, продемонстрировать безопасность вакцины, поэтому они должны содержать:

- информацию о вирусах, которые потенциально могут присутствовать в вакцинах (к патогенным вирусам относятся: респираторно-синцитиальный вирус, адено-вирус, вирус парагриппа, риновирусы, коронавирусы, энтеровирус, EBV, HSV, CMV и микоплазмы);
- сведения о субстрате, используемом для выделения штамма;
- данные о рисках вирусной безопасности, связанных с использованием сырья, реагентов и субстратов животного происхождения;
- историю получения посевного штамма вируса со всеми результатами тестирования на наличие внешних посторонних агентов.

В досье должно быть подробно представлено описание производственного процесса получения вакцины. При выявлении посторонних включений (агрегатов) необходимо установить причину их появления. Валидация этапов производственного процесса должна продемонстрировать, что критические стадии процесса находятся в пределах установленных параметров. К критической стадии производственного процесса относится инактивация вак-

цинного вируса. При этом необходимо продемонстрировать, что инактивация не влияет на антигенные свойства вакцины. Важным является процесс расщепления вириона, для контроля которого могут быть использованы такие методы, как SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с SDS) и изоэлектрическое ультрацентрифугирование в градиенте плотности. Контроль этапа расщепления должен быть продемонстрирован как минимум на трех последовательных сериях.

Для вакцин, которые получены с использованием куриних эмбрионов, необходимо продемонстрировать, что вирус птичьего лейкоза и микоплазмы инактивированы. Кроме того, процесс инактивации вирусов должен обеспечить инактивацию и других патогенных для птиц агентов (например, аденонарвируса птиц).

Выбор показателей, которые необходимо включить в спецификацию, в первую очередь зависит от выбранного штамма, а также вида вакцины (например, вакцины, полу-

ченные на основе цельного вириона, расщепленного вириона или вирусных субъединиц). Использование дополнительных методов оценки для расширенной характеристики штамма может быть необходимо при регистрации вакцины в случае замены сезонного штамма.

Характеристика биохимических, иммунологических и физико-химических свойств антигена НА должна быть проведена с помощью широкого спектра современных аналитических методов. В соответствии с требованиями ЕФ наличие и тип антигена НА необходимо подтвердить с помощью соответствующих ферментативных или иммунологических методов в моновалентных продуктах. При этом необходимо охарактеризовать и количественно определить антигены (кроме НА), которые могут способствовать иммуногенности вакцины.

В тех случаях, когда в субстанции и (или) в готовой форме вакцины определяются агрегаты, они должны быть охарактеризованы (например, по размерности, составу,

Таблица 1. Документы, регламентирующие оценку качества, проведение доклинических и клинических исследований вакцин против гриппа, разработанные на основе результатов анализа пандемии гриппа 2009–2010 гг.

Этап разработки вакцины	Нормативные документы, используемые до пандемии 2009–2010 гг.	Нормативные документы, которые были разработаны после пандемии 2009–2010 гг.
Оценка качества	<ul style="list-style-type: none"> • Note for guidance on harmonization of requirements for influenza vaccines (CPMP/BWP/214/96) • Cell culture inactivated influenza vaccines — Annex to note for guidance on harmonization of requirements for influenza vaccines (CPMP/BWP/214/96) • Points to consider on the Development of Live Attenuated Influenza Vaccines (EMEA/CPMP/BWP/2289/01) • Procedural advice on the submission of variations for annual update of human influenza inactivated vaccines applications in the centralized procedure (EMA/CHMP/BWP/99698/2007 Rev. 1) • Annex I variation application(s) content for live attenuated influenza vaccines (EMA/CHMP/BWP/577998/2010) • Guideline on Dossier Structure and Content for Pandemic Influenza Vaccine Marketing Authorization Application (EMEA/CPMP/VEG/4717/03 rev. 1) • Guideline on Submission of Marketing Authorization Applications for Pandemic Influenza Vaccines through the Centralized Procedure (EMEA/CPMP/4986/03) • Guideline on Influenza vaccines prepared from viruses with the potential to cause a pandemic and intended for use outside of the core dossier context (CHMP/VWP/263499/06) • Guideline on quality aspects on the isolation of candidate influenza vaccine viruses in cell culture (EMA/CHMP/BWP/368186/2011) 	Guideline on influenza vaccines — quality module (25 April 2014. EMA/CHMP/BWP/310834/2012) [6]
Доклинические и клинические исследования	<ul style="list-style-type: none"> • Guideline on Dossier Structure and Content for Pandemic Influenza Vaccine Marketing 9 Authorization Application (EMEA/CPMP/VEG/4717/03 rev. 1) 10 • Guideline on influenza vaccines prepared from viruses with the potential to cause a pandemic and 11 intended to be used outside of the core dossier context (CHMP/VWP/263499/2006) 12 • Explanatory note on the withdrawal of the note for guidance on harmonization of requirements for 13 influenza Vaccines (CPMP/BWP/214/96) and of the core SmPC/PL for inactivated seasonal influenza 14 vaccines (CMDh/128/2003/Rev5 and CMDh/129/2008/Rev3) 15 • Points to Consider on the development of live attenuated influenza vaccines 16 (EMEA/CPMP/BWP/2289/01) 17 • Core SmPC for pandemic vaccines (EMEA/CHMP/VEG/193031/2004) 	Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module (21 July 2016. EMA/CHMP/VWP/457259/2014) [7]
Процедура обновления/замены сезонного штамма вакцин против гриппа	<ul style="list-style-type: none"> • Procedural advice on the submission of variations for annual update of human influenza inactivated vaccines applications in the centralized procedure (EMA/CHMP/BWP/99698/2007 Rev. 2) • Guideline on submission of marketing authorization applications for pandemic influenza vaccines through the centralized procedure (EMEA/CPMP/4986/03) 	Guideline on influenza vaccines — submission and procedural requirements. Regulatory and procedural requirements module (May 2015. EMA/56793/2014) [8]

количеству и профилю растворения). Особое внимание необходимо обратить на потенциальное влияние агрегатов на иммуногенность вакцины.

При характеристике вакцины необходимо идентифицировать и количественно оценить примеси, связанные с производственным процессом (например, овальбумин, остаточное содержание белков клеток куриного эмбриона, остаточная ДНК клетки-продуцента, реагенты, используемые для инактивации/расщепления, очистки).

Общепризнанным показателем специфической активности вакцины против гриппа является определение гемагглютинина методом одиночной радиальной иммунодиффузии (SRD), для сезонной инактивированной вакцины рекомендуемая доза составляет 15 мкг SRD-антитела. В некоторых случаях может возникнуть необходимость использования альтернативных методов определения активности (ИФА, ВЭЖХ). При этом необходимо представить обоснование использования альтернативных методов.

Если в состав вакцины входит адьювант, то в досье на вакцину должна быть представлена подробная информация об адьювантах, включающая сведения об исходных материалах, производственном процессе, химических и физических свойствах, методах контроля, данных по оценке стабильности и взаимодействии антигена и адьюванта. Подробно должен быть описан производственный процесс, и особое внимание должно быть обращено на представление процесса и условий конъюгации адьюванта с антигеном. При этом необходимо подтвердить стабильность вакцины с адьювантом в процессе хранения.

Оценка стабильности проводится согласно ЕФ. Изучение стабильности субстанции и готовой формы вакцины проводится в режиме реального времени и в стрессовых условиях хранения.

Препандемические (зоонозные) вакцины. Необходимо обосновать выбор штамма для препандемической вакцины, в первую очередь используя рекомендации ВОЗ, касающиеся антигенной и генетической характеристики штаммов A(H5N1), A(H7N3), A(H9N2) и штаммов, используемых для производства сезонных вакцин для человека.

В качестве штамма-кандидата могут быть использованы высокопатогенные подтипы вируса H5 или H7, поэтому необходимо продемонстрировать снижение их патогенности в исследованиях *in vitro* и *in vivo* на этапе доклинических исследований. Низкопатогенные вакцины оценивают в соответствии с рекомендациями ВОЗ и рекомендациями для оценки сезонных вакцин [16]. В качестве кандидатов могут быть использованы штаммы птичьего, свиного, человеческого и нереассортантные штаммы дикого типа вируса гриппа.

Наиболее частыми кандидатами в препандемические вакцины являются:

- полученный из высокопатогенного штамма методом обратной генетики реассортантный H5N1 (на своем сайте ВОЗ публикует список доступных CVV H5N1). В связи с продолжающимся распространением вируса H5 человека можно предполагать развитие пандемии, вызванной подтипами H5 или H7 вируса гриппа;

- полученный из высокопатогенного вируса птичьего гриппа методом обратной генетики реассортантный H7N1; в последние годы вспышки гриппа у европейских птиц были связаны с подтипами H7N1 и H7N7 вируса гриппа, которые ассоциируются с развитием инфекции у человека;

- вирус H5N3 птичьего гриппа. Вакцины, полученные из штамма H5N3 A/Duck/Singapore/97, уже были изучены в клинических условиях; антигеннность этого штамма очень

близна к высокопатогенному штамму H5N1 A/Hong Kong/156/97;

- вирус H9N2. Штаммы H9N2 вируса гриппа человека, такие как A/Hong Kong/1073/99, уже используются для экспериментального производства вакцин, которые были протестираны в клинических условиях. Инфекции, вызванные вирусом H9N2, эпизодически развиваются среди людей;

- вирус H2N2. Штамм вируса гриппа человека, вызвавший пандемию 1957 года, A/Singapore/1/57 недавно был использован для экспериментальной разработки и производства вакцин [6].

При использовании метода обратной генетики для получения штамма необходимо учитывать дополнительные требования, касающиеся безопасности вакцин. Так, клеточный субстрат для получения CVV должен отвечать дополнительным требованиям, изложенным в ЕФ; при производстве вакцины необходимо использовать банк одобренных клеток. Следует учитывать, что материалы, используемые для получения CVV методом обратной генетики, являются факторами потенциальных рисков вирусной, бактериальной, грибковой и микроплазменной контаминации.

При разработке вакцины необходимо продемонстрировать снижение патогенности вирусов подтипов H5 и H7 в результате их генетической модификации или удаления аминокислотных последовательностей, ответственных за проявления вирулентности при расщеплении в области НА. Это необходимо подтвердить на уровне контроля пасажей штаммов и на трех сериях готового вакцинного препарата.

Производственный процесс препандемической вакцины может быть основан на процессе, который применяется для лицензированной вакцины (например, сезонной вакцины) или другого производства вакцин. Тем не менее, производственный процесс должен быть подробно описан в досье. Процесс может быть адаптирован к новому производству и новые стороны процесса также должны быть подробно описаны и обоснованы.

Вакцины могут выпускаться в виде одной дозы или нескольких доз. Препарат в виде нескольких доз требует использования консерванта, в связи с этим необходимо изучить возможное влияние консерванта на основные свойства вакцины. Если в качестве консерванта используется тиомерсал, необходимо предусмотреть оценку его количественного содержания в готовом препарате.

При стандартизации вакцины необходимо обратить особое внимание на содержание НА, его уровень в препандемических вакцинах, как правило, должен быть значительно ниже по сравнению с сезонными вакцинами.

Стабильность препандемических вакцин оценивается согласно ЕФ и руководству ICH Q5C [17]. Необходима оценка стабильности субстанции и готовой формы препарата при хранении в условиях реального времени и стрессовых условиях. Результаты изучения стабильности в реальном времени в течение не менее 6 месяцев должны быть представлены в заявке на регистрацию препарата. Продление срока годности до 1 года необходимо обосновать данными изучения стабильности в условиях реального времени [17].

Стабильность и характеристика основных свойств, изученные в режиме реального времени, должны быть представлены в краткой характеристике лекарственного средства (SmPC). Эти исследования должны продемонстрировать, что вакцина соответствует требованиям специ-

ификации по критическим показателям качества в течение срока хранения.

Вакцины для профилактики пандемического гриппа. При развитии пандемии гриппа, которая официально признана ВОЗ или ЕМА, производители должны представить заявку на вакцину, содержащую штамм против пандемии гриппа. Набор необходимых документов для регистрации пандемических вакцин соответствует основным требованиям, предъявляемым при регистрации сезонных вакцин.

Живые вакцины на основе аттенуированных штаммов гриппа

Получение живых вакцин на основе аттенуированных штаммов отличается от производства инактивированных в первую очередь методами очистки. В процессе производства живых ослабленных вакцин должны использоваться высококачественные исходные материалы, от которых зависит качество препарата в плане его безопасности. Прежде всего это касается куриных эмбрионов для получения ослабленного реассортанта.

Сезонные живые вакцины на основе аттенуированных штаммов. В досье необходимо представить фенотипические и генетические свойства ослабленного исходного родительского штамма. Фенотипическая характеристика включает в себя исследования на маркеры, которые свидетельствуют об ослаблении вирулентной активности штамма. Оценка проводится *in vivo* и на адаптированных к холоду или чувствительных к температуре фенотипах (*in vitro*) для выявления ревертантнов дикого типа. Обязательным условием является представление доказательства отсутствия нейровирулентной активности штамма, исследованной на моделях релевантных видов животных. При этом необходимо оценить не только потенциальную прямую нейровирулентность, но и косвенную, обусловленную вторичными инфекциями [18, 19].

Генотипическая характеристика родительского штамма включает:

- определение нуклеотидной последовательности полного генома вируса;
- данные о молекулярной основе аттенуированного фенотипа;
- данные, демонстрирующие генетическую стабильность ослабленного родительского штамма методом сравнения нуклеотидной последовательности генома вируса на разных уровнях пассажей.

Особое внимание следует уделить контролю посторонних агентов в соответствии с рекомендациями для оценки посторонних агентов вирусной, клеточной и микоплазменной природы [20, 21].

В основе производства живой вакцины лежит процесс получения посевного материала. Подробно должны быть описаны способ получения и условия хранения посевного материала, обоснованные данными о концентрации вируса, его генетической стабильности и стерильности. Если используется технология обратной генетики, проводится оценка кДНК банка клонов для 6 фрагментов РНК, которые являются производными от родительских штаммов (M, NS, NP, PA, PB1 и PB2) при производстве реассортанта.

Необходимо продемонстрировать систему оценки стабильности посевных серий и оценку показателей контроля качества при длительном хранении. Дополнительные испытания посевных партий ослабленного родительского штамма проводятся в соответствии с ЕФ, регламен-

тирующей контроль чужеродных агентов (стерильность, определение микоплазмы). При одобрении регуляторными органами эти исследования могут быть выполнены на уровне реассортантного рабочего посевного штамма.

Характеристики антигенов НА и NA донорского вируса осуществляются в соответствии с рекомендациями для сезона гриппа. Для получения посевных серий должен быть использован сертифицированный субстратный материал (куриные эмбрионы, культуры клеток), который не должны содержать специфические патогены (SPF) [22]. Контроль готовых посевных серий проводится в соответствии с рекомендациями для выявления посторонних агентов донорских посевных штаммов. В дополнение к этим методикам могут быть разработаны тесты на основе ПЦР для выявления геномов респираторных агентов, которые могут быть реплицированы в субстрате, используемом для получения серий. Наличие микробной контаминации в посевном материале и штамме донора недопустимо.

Получение реассортантного штамма из родительского может быть выполнено классическим методом или методом обратной генетики. Данный этап получения штамма проводится с использованием сертифицированных реагентов (например, антисыворотки, ферментов), не содержащих инфекционные агенты. При использовании методов обратной генетики необходимо соблюдать общие требования руководства, регламентирующего перенос генов при получении лекарственных препаратов.

Для характеристики главного и рабочего посевного банков штаммов, так же как и для посевных серий, необходимо продемонстрировать присутствие маркеров, свидетельствующих о снижении патогенной активности вируса и о содержании НА и NA.

Характеристика балка моновалентной вакцины должна содержать информацию о маркерах, свидетельствующих о генетической стабильности и подтверждающих сохранение фенотипа ослабленного вируса.

Спецификация на балк трехвалентной вакцины (окончательная вакцина) должна содержать данные о специфической активности, содержании овальбумина и эндотоксинов, данные по оценке стабильности в режиме реального времени и при хранении в стрессовых условиях (повышение температуры). Сроки и условия хранения должны быть обоснованы. Стабильность оценивается на основании положений соответствующей статьи ЕФ и руководства ICH Q5C.

Для определения специфической активности (стандартизации препарата), т.е. для определения количества активных вирусных частиц в дозе вакцины используют такие единицы, как инфекционный титр вируса, оцениваемый на куриных эмбрионах (ЕID₅₀), и титр вируса, оцениваемый на культуре ткани (TCID₅₀), или другие международные единицы, которые определяются с использованием соответствующего эталона вируса.

Процедура внесения изменений для сезонной замены штамма вакцины против гриппа. Учитывая уроки пандемии гриппа 2009–2010 гг., ЕМА внесла значительные изменения в документы, регламентирующие подачу заявки и процедуру ускоренной регистрации изменений, связанных с сезонным обновлением штамма вакцины против гриппа. В мае 2015 года ЕМА были утверждены нормативные требования, регламентирующие процедуру подачи заявки и получения лицензии на сезонные, препандемические и пандемические вакцины против гриппа (табл. 1). Согласно данному документу разработка новой сезонной вакцины осуществляется на основе стандартных требова-

ний, предъявляемых к биологическим препаратам. Ежегодное обновление сезонного штамма проводится по укоренной процедуре [8].

Два раза в год (февраль и сентябрь) ВОЗ публикует рекомендации о предполагаемом штамме вируса, который может вызвать очередную сезонную эпидемию гриппа. Основываясь на рекомендациях ВОЗ и учитывая национальные особенности, ЕМА обычно в марте публикует свои рекомендации о штамме сезона гриппа. На основе данных рекомендаций производители осуществляют замену сезона гриппа вакцины против гриппа и подают заявку на внесение изменений состава вакцины (обновление сезона гриппа).

В новом документе приведен перечень документов, которые необходимо представить вместе с заявлением, и четко прописаны сроки, регламентирующие процедуру регистрации изменений в связи с заменой сезона гриппа. Процедура сезона гриппа обновления штамма проходит в два этапа. На первом этапе производитель представляет документы, в основном касающиеся вопросов качества нового штамма — его характеристики, а также характеристики производственного процесса получения вакцины с новым штаммом, характеристики субстанции и готовой формы препарата и др.

Требования к досье, касающиеся вопросов качества, при замене/обновлении сезона гриппа

Замена/обновление штамма инактивированных сезонных вакцин

При ежегодном обновлении штамма проводятся исследования, связанные только с вносимыми изменениями. Для нового штамма вируса требования к качеству соответствуют требованиям, предъявляемым к качеству инактивированных вакцин. При характеристике посевных серий необходимо учесть возможные риски, которые могут появиться в связи с обновлением штамма. Например, если для контроля посторонних примесей используется метод ПЦР, то эти данные должны быть включены в заявку на регистрацию.

В досье необходимо представить все процедуры, которые касаются оптимизации производственного процесса, связанные с обновлением штамма. При этом необходимо представить материалы валидации критических этапов производства, в первую очередь инактивации и расщепления. Эти материалы необходимо подтвердить данными контроля (включая оценку нейраминидазы) трех последовательных серий одновалентного балка в следующих случаях:

- если используется новый кандидат посевного материала;
- если процедура подготовки посевного материала отличается от ранее утвержденной.

В подобной ситуации необходимо представить материалы валидации аналитических методов, которые используются для характеристики обновления штамма (например, SRD).

Для обновленного штамма практически невозможно провести исследование стабильности в полном объеме. Поэтому для тех субстанций, которые используются более года, необходимо проведение исследований стабильности в режиме реального времени. Для готовой формы вакциниального препарата должны быть представлены програм-

ма проведения исследований стабильности и обязательство об изучении стабильности после регистрации изменений замены штамма.

Замена/обновление штамма препандемической (зоонозной) вакцины

Препандемические вакцины предназначены для иммунизации во время вспышки зоонозного гриппа с пандемическим потенциалом, включая пандемии, вызванныеенным штаммом или сходным. Регистрация новой пандемической вакцины и внесение изменения в состав вакцины производятся по стандартной процедуре.

При низкой или незначительной перекрестной реактивности штамма вируса гриппа препандемической вакцины возникает необходимость его замены. Возможны два варианта замены штамма:

а) замена зарегистрированного штамма на другой подтип (например, замена одного подтипа H5N1 на другой подтип H5N1). В данной ситуации в досье должна быть представлена такая же информация, как и в случае обновления штамма сезона вакцины;

б) замена подтипа HA/NA штамма (например, замена оригинального штамма H5N1 на H7N7). При этом ЕМА принимает решение о том, какие требования необходимо выполнить для внесения данных изменений, определяет какие данные и в каком объеме необходимо представить по результатам дополнительных доклинических и клинических исследований.

Замена/обновление штамма пандемической вакцины

Если при обновлении штамма используются материалы, информация о безопасности которых недостаточно известна, необходимо обеспечить оценки рисков. Любые изменения, касающиеся посевного штамма вируса в процессе производства пандемической вакцины (например, использование более продуктивного реассортантного вируса или введение дополнительных пассажей), должны быть обоснованы.

Любые различия (например, остаточное содержание деоксихолата натрия) устанавливаются в процессе исследований сопоставимости между вакцинами, полученными до и после замены штамма. При этом необходимо провести критический анализ относительно влияния выявленных различий на безопасность и иммуногенность вакциниального препарата. При установлении высокой степени различий может потребоваться представление дополнительных материалов.

Внесение изменений в производственный процесс (например, с целью интенсификации производства и повышения выхода продукции) должно быть обосновано и подтверждено. Для доказательства того, что внесенные изменения не влияют на иммуногенные свойства вакцины, необходимо проведение соответствующих исследований. Если данные об иммуногенности препарата для человека недоступны, результаты исследований иммуногенности, полученные на животных (как минимум одной серии препарата), могут служить обоснованием для внесения изменений.

Не стоит ожидать полной сопоставимости вакцинальных препаратов до и после обновления штамма, однако критические показатели качества должны быть сопоставимы. Любые выявленные различия должны быть оценены с точки зрения их влияния на безопасность и иммуногенность вакцины.



Рис. 1. Ускоренная процедура ежегодного обновления штамма вакцины против гриппа (EMA — Европейское медицинское агентство по лекарственным средствам, BWP — рабочая группа по биологическим препаратам EMA, CHMP — Комитет по медицинским препаратам для человека EMA) [8].

В досье на замену пандемического штамма должны быть включены результаты испытаний стабильности субстанции и готовой формы препарата. Полные данные о стабильности (изучение в условиях реального времени) не могут быть представлены при замене штамма. В этом случае представляются данные сравнительного изучения стабильности препаратов в стрессовых условиях хранения до и после замены штаммов.

Замена/обновление сезонного штамма живой вакцины против гриппа, полученной из аттенуированного штамма

При подаче заявки на сезонное обновление штамма живой вакцины из аттенуированного штамма в модуле досье по качеству необходимо представить в первую очередь информацию о штамме.

Описание получения посевного материала должно включать:

- описание получения посевного исходного образца штамма — донора аттенуации вируса гриппа и рекомендованного ВОЗ штамма;
- историю пассажей;
- генетическую характеристику посевного штамма;
- фенотипическую характеристику, включая исследование маркеров аттенуации (*in vivo*) и фенотипов, адапти-

рованных к холоду или чувствительных к температуре (*in vitro*), которая проводится для выявления ревертантов дикого типа, а также методы для идентификации НА и НА;

– данные о генетической стабильности посевных серий, включая определение соответствующих генотипических и фенотипических маркеров (например, полная генетическая характеристика);

– протоколы аналитических исследований (включая оценку безопасности и наличия посторонних агентов). Если в посевных сериях наличие посторонних включений установлено с помощью ПЦР, то результаты этих дополнительных исследований должны быть включены в досье;

– оценка нейровирулентности нового штамма (штамма с антигенным дрейфом), как правило, не требуется, однако она необходима в случае использования нового подтипа вируса гриппа А (например, не H1 или не H3 подтипы) или нового типа вируса гриппа В.

В досье должны быть описаны и обоснованы любые изменения производственного процесса, связанные с заменой сезонного штамма. Необходимо оценить критические этапы производства для нового сезонного штамма. При этом необходимо представить результаты испытаний первых серий монovalентных баллов и серий готового вакцинного препарата.

Необходимо представить валидацию аналитических процедур, которые связаны с изменением штамма, например, процедуры оценки активности. Показатели, включенные в спецификацию, и аналитические методы должны быть представлены в виде таблицы.

Если одновалентные балки используются больше одного года, то необходимо представить материалы изучения его стабильности. Досье должно включать протокол изучения стабильности в режиме реального времени в пострегистрационном периоде.

Значения срока годности, указанные в спецификации, должны быть подтверждены результатами изучения стабильности нового штамма в стрессовых условиях хранения (условия «ускоренного старения»).

Этапы ускоренной процедуры регистрации замены/обновления сезонного штамма вакцины против гриппа

Ускоренная процедура регистрации распространяется только на изменения, касающиеся замены/обновления сезона штамма, регистрация других изменений проводится по стандартной процедуре. Процедура регистрации изменений при замене сезона штамма проводится в два этапа.

На первом этапе продолжительностью 45 дней проводится оценка представленных материалов, характеризующих качество вакцины. При этом эксперты на основании изучения документов могут сделать следующие заключения: утвердить вносимые изменения, отклонить вносимые изменения или сделать запрос для представления дополнительных данных.

Если экспертная организация выдает положительное заключение о замене/обновлении сезона штамма вакцины, то процедура регистрации проходит в течение 45 дней и ограничивается только первым этапом.

Если формируется запрос о представлении дополнительных данных, то процедура регистрации приостанавливается («стоп-тайм») сроком до 30 дней и переходит во второй этап. При этом заявителю рекомендуется представить запрашиваемые данные в течение 12 дней, а затем в течение 10 дней экспертное учреждение готовит окончательное заключение (рис. 1).

Запрос на представление дополнительных материалов может включать не только материалы, касающиеся характеристики качества, но и данные клинических исследований вакцин против гриппа [7]. Оптимальным сроком подачи заявки будет тот период, который позволит провести экспертизу представленных материалов в июле.

Особенности регистрации пандемических вакцин против гриппа

При появлении только признаков пандемии гриппа заявитель может разработать и лицензировать так называемую «вакцину готовности к пандемии» («pandemic preparedness vaccine»). Данный тип вакцины обычно основан на принципе модуля (mock-up) (модель в натуральную величину), который позволяет полностью имитировать вакцину против штамма пандемического гриппа.

При этом заявитель представляет так называемое «досье для пандемической вакцины». Если к этому времени пандемия признана ВОЗ или на уровне ЕС, подается заявка для лицензирования препарата «установленного пандемического штамма», которая рассматривается по ус-

коренной процедуре. Кроме того, заявитель представляет заявление и материалы так называемого «досье для пандемии», которое содержит информацию о соответствующем пандемическом штамме. Естественно, что в условиях пандемии невозможно подготовить полноценное досье, поэтому «досье для пандемии» будет содержать неполную информацию, которая предоставляется при лицензировании.

В данной ситуации препарат будет зарегистрирован на основании требований «условной лицензии», с условием, что заявитель представит отсутствующие данные позже и включит их в досье. Если заявителем не обосновано проведение ускоренной процедуры, то проводится стандартная процедура регистрации.

Если ВОЗ или ЕС официально признали пандемию гриппа, но у производителя появилась обоснованная необходимость изменения пандемического штамма, то заявитель может подать заявление об изменении пандемического штамма с отсутствующими некоторыми доклиническими и клиническими данными. В последующем заявитель обязан предоставить недостающие доклинические и клинические данные в сроки, оговоренные в лицензии на препарат. При необходимости регистрации проводится по ускоренной процедуре.

Последние пандемии гриппа выявили проблемы и некоторые слабые стороны, связанные с обеспечением здравоохранения актуальными вакцинами. Это потребовало пересмотра требований, регламентирующих оценку качества и регистрацию вакцин в условиях ограниченного периода времени. ЕМА в 2014–2016 гг. были пересмотрены основные требования для оценки качества, проведения доклинических и клинических исследований и процедуры регистрации по ускоренной схеме. В настоящее время в нашей стране проводится подготовка нормативных требований для оценки качества, проведения доклинических и клинических исследований и процедуры регистрации по ускоренной схеме для стран Евразийского экономического Союза (ЕАЭС). Подготовка нормативных требований для ЕАЭС потребует и пересмотра отечественного законодательства по данному вопросу. При этом опыт, накопленный ЕМА, может быть полезным при подготовке отечественной нормативной базы, что позволит повысить эффективность и безопасность вакцин против гриппа.

Литература

- Щелканов МЮ, Львов ДК. Генотипическая структура рода *Influenza A virus*. Вестник РАМН. 2011; (5): 19–23.
- Колобухина ЛВ, Щелканов МЮ, Меркулова ЛН, Базарова МВ, Бурцева ЕИ, Самохвалов ЕИ и др. Этиотропная терапия гриппа: уроки последней пандемии. Вестник РАМН. 2011; (5): 35–40.
- Генон ЮЗ. Свиной грипп H1N1/Калифорния — страсти и факты. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии 2010; (4): 105–14.
- Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; 325(5937): 197–201.
- Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009; 459(7250): 1122–5.
- Guideline on influenza vaccines — quality module (25 April 2014. EMA/CHMP/BWP/310834/2012). Available from: <https://goo.gl/xOnHht>.
- Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module (21 July 2016. EMA/CHMP/VWP/457259/2014). Available from: <https://goo.gl/6AoNPn>.

8. Guideline on influenza vaccines — submission and procedural requirements. Regulatory and procedural requirements module. (May 2015 EMA/56793/2014). Available from: <https://goo.gl/Yly7zd>.
9. Vaccines for human use. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
10. Influenza vaccine (split virion, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
11. Influenza vaccine (surface antigen, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
12. Influenza vaccine (whole virion, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
13. Influenza vaccine (surface antigen, inactivated, virosome). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
14. Influenza vaccine (whole virion, inactivated, prepared in cell cultures). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
15. Influenza vaccine (surface antigen, inactivated, prepared in cell cultures). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
16. WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines. WHO Technical Report Series No 941, 2007 Annex 5.
17. Q5C Note for Guidance on Quality of Biotechnological Products: Stability testing of biotechnological/biological products (CPMP/ICH/138/95).
18. 2.6.18. Tests for neurovirulence of live virus vaccines. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
19. Ward AC. Neurovirulence of influenza A virus. J Neurovirol. 1996; 2(3): 139–51.
20. World Health Organization. WHO Technical Report Series, No. 927, 2005 Annex 4. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals (Addendum 2003). Available from: <https://goo.gl/f1J3w0>.
21. CPMP Note for guidance on virus validation studies. The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95). Available from: <https://goo.gl/GepjYR>.
22. 5.2.2. Chicken flocks free from specified pathogens for the production and quality control of vaccines. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Солдатов Александр Алексеевич. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук.

Авдеева Жанна Ильдаровна. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Солдатов Александр Алексеевич; Soldatov@expmed.ru

Update of influenza vaccine strains in Europe. Quality issues

A. A. Soldatov, Zh. I. Avdeeva, V. P. Bondarev

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

In 2009–2010 there was an influenza pandemic that occurred despite all preventive measures. Analysis of this pandemic revealed some gaps in the regulatory requirements applied both to the development of new influenza vaccines and to the change/update of the seasonal influenza vaccine strains. Taking into account the lessons learned from this pandemic the European Medicines Agency revised the existing guidelines in 2014–2016 and proposed new recommendations on quality evaluation and conduct of non-clinical and clinical trials in the development of influenza vaccines. The revised requirements encompass not only quality evaluation issues, but also changes/update of strain composition of seasonal, pre-pandemic and pandemic influenza vaccines. The experience acquired by the Agency can help update the Russian regulatory framework in order to improve efficacy and safety of influenza vaccines.

Key words: influenza vaccines (seasonal, pandemic, pre-pandemic); attenuated vaccines (attenuated vaccine strains); seasonal strain change.

For citation: Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Bondarev VP. Update of influenza vaccine strains in Europe. Quality issues. BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2017; 17(1): 3–12.

References

1. Shchelkanov MYu, Lvov DK. Genotypic structure of the genus Influenza A virus. Annals of the Russian academy of medical sciences 2011; (5): 19–23 (in Russian).
2. Kolobukhina LV, Shchelkanov MYu, Merkulova LN, Bazarova MV, Burtseva EI, et al. Etiotropic therapy of influenza: lessons from the last pandemic. Annals of the Russian academy of medical sciences 2011; (5): 35–40 (in Russian).
3. Ghendon YuZ. Swine-origin influenza H1N1 / California — passions and facts. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology 2010; (3): 105–14 (in Russian).
4. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science 2009; 325(5937): 197–201.
5. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. Nature 2009; 459(7250): 1122–5.
6. Guideline on influenza vaccines — quality module (25 April 2014. EMA/CHMP/BWP/310834/2012). Available from: <https://goo.gl/xOnHht>.

7. Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module (21 July 2016. EMA/CHMP/VWP/457259/2014). Available from: <https://goo.gl/6AoNPn>.
8. Guideline on influenza vaccines — submission and procedural requirements. Regulatory and procedural requirements module. (May 2015 EMA/56793/2014). Available from: <https://goo.gl/Yly7zd>.
9. Vaccines for human use. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
10. Influenza vaccine (split virion, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
11. Influenza vaccine (surface antigen, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
12. Influenza vaccine (whole virion, inactivated). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
13. Influenza vaccine (surface antigen, inactivated, virosome). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
14. Influenza vaccine (whole virion, inactivated, prepared in cell cultures). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
15. Influenza vaccine (surface antigen, inactivated, prepared in cell cultures). European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
16. WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines. WHO Technical Report Series No 941, 2007 Annex 5.
17. Q5C Note for Guidance on Quality of Biotechnological Products: Stability testing of biotechnological/biological products (CPMP/ICH/138/95).
18. 2.6.18. Tests for neurovirulence of live virus vaccines. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
19. Ward AC. Neurovirulence of influenza A virus. J Neurovirol. 1996; 2(3): 139–51.
20. World Health Organization. WHO Technical Report Series, No. 927, 2005 Annex 4. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals (Addendum 2003). Available from: <https://goo.gl/f1J3w0>.
21. CPMP Note for guidance on virus validation studies. The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95). Available from: <https://goo.gl/GepjYR>.
22. 5.2.2. Chicken flocks free from specified pathogens for the production and quality control of vaccines. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation. Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Soldatov AA. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Allergens, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences.

Avdeeva Zh. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Allergens, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Bondarev VP. Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств

Н. А. Алпатова, Л. А. Гайдерова, А. К. Яковлев, Е. В. Мотузова, С. Л. Лысикова,
А. А. Солдатов, Ж. И. Авдеева

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*

Поступила 04.10.2016 г. Принята к публикации 07.02.2017 г.

Обзор посвящен вопросам оценки специфической активности биотехнологических лекарственных средств, которая является одним из основных показателей их качества. Подходы к изучению данного показателя и выбор методик зависят от природы и свойств лекарственного препарата. Методики должны быть адекватными и обладать достаточной чувствительностью и специфичностью. Для оценки специфической активности указанной группы лекарственных препаратов могут быть использованы биологические методы исследования как в условиях *in vivo* на лабораторных животных, характеризующихся наиболее адекватным ответом на исследуемый препарат, так и в условиях *in vitro* с использованием чувствительных клеточных линий. Оценка специфической биологической активности позволяет охарактеризовать фармакологическое действие препарата и направленно изучить механизмы его терапевтических эффектов при клиническом применении. Поэтому специфическую активность биотехнологических препаратов предпочтительно оценивать с использованием методов, соответствующих предполагаемому механизму действия препарата. Для многих биотехнологических лекарственных средств, включая препараты системы цитокинов, МкАТ, белков слияния/фьюжен белков и др., используются индивидуальные методы оценки специфической активности. Биотехнологические лекарственные препараты успешно применяются для лечения заболеваний аутоиммунной природы, инфекционных, онкологических и аллергических заболеваний.

Ключевые слова: биотехнологические лекарственные препараты; цитокины; моноклональные антитела; специфическая биологическая активность; методы исследования в условиях *in vitro* и *in vivo*; линии клеток.

Библиографическое описание: Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Мотузова ЕВ, Лысикова СЛ, Солдатов АА, Авдеева ЖИ. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(1): 13–26.

Биотехнологические лекарственные препараты занимают одно из ведущих мест на современном фармацевтическом рынке. Разработка новых лекарственных препаратов указанной группы является одним из перспективных направлений в области создания лекарственных средств для лечения тяжелых хронических прогрессирующих аутоиммунных, онкологических, инфекционных заболеваний в связи с их высокой специфичностью по отношению к факторам, связанным с патогенезом заболевания, что позволяет достигать высокой клинической эффективности.

Биотехнологические лекарственные препараты — лекарственные препараты, производство которых осуществляется с использованием биотехнологических процессов и методов (в том числе ДНК-рекомбинантной технологии, технологии контролируемой экспрессии генов, кодирующих биологически активные белки в прокариотах и эукариотах, включая измененные клетки млекопитающих), гибридного метода и метода моноклональных антител [1].

Действующим веществом в биотехнологических лекарственных препаратах являются белки, принадлежащие к различным группам биологически активных веществ — рекомбинантные цитокины человека, моноклональные антитела (МкАТ), белки слияния/фьюжен белки и др. Учитывая, что биотехнологические лекарственные средства являются сложными препаратами белковой природы, которые длительно, а в некоторых случаях и пожизненно, применяются для лечения хронических тяжело протекаю-

щих заболеваний, необходимо уделять особое внимание качеству лекарственных препаратов данной группы.

Оценка подлинности препарата, его физико-химических свойств, количественных характеристик и показателей чистоты (определение содержания родственных соединений и посторонних примесей, молекулярно-массовое распределение и др.) должна проводиться с использованием современных высокочувствительных физико-химических, иммунохимических, биохимических методов и высокотехнологичного оборудования. Однако на основании результатов оценки физико-химических показателей биотехнологических препаратов невозможно в полном объеме прогнозировать проявления их биологической активности и клинических эффектов при использовании в медицинской практике.

Целью настоящего обзора является анализ особенностей определения биологической активности различных групп биотехнологических лекарственных средств в зависимости от механизмов их действия.

Специфическая биологическая активность, т.е. специфическая способность препарата вызывать определенный биологический эффект, является одним из наиболее важных показателей качества биотехнологических лекарственных препаратов. Подходы к изучению данного показателя и выбор методик зависят от природы и свойств лекарственного препарата. Используют методики *in vitro* и *in vivo*, основанные на различных принципах, с помощью которых можно показать специфичность действия активного компонента лекарственного препарата. Методики должны

быть адекватными и обладать достаточной чувствительностью и специфичностью [2–5].

Точность результатов, полученных при определении специфической активности, — необходимое условие обеспечения качества лекарственных препаратов. В связи с этим, аналитические методики, используемые для оценки активности, должны быть откалиброваны/стандартизованы с использованием международного или национального стандартного образца. Если такие стандарты недоступны, должен быть разработан рабочий стандартный образец (стандартный образец предприятия) в соответствии с рекомендациями ВОЗ [2]. В настоящее время для многих рекомбинантных цитокинов человека разработаны Международные стандарты и стандарты Европейской фармакопеи как для оценки физико-химических свойств, так и для определения специфической активности.

Разработка отечественных стандартных образцов для оценки качества лекарственных средств является в настоящее время одной из приоритетных задач. В ФГБУ «НЦЭСМП» Миздрава России в рамках выполнения НИР «Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств» разработан и аттестован отраслевой стандартный образец (ОСО) активности филграстима, проводятся исследования по аттестации ОСО активности эритропоэтина [6, 7].

Для препаратов на основе МкАТ и белков слияния Международные и фармакопейные стандартные образцы не разработаны, в этом случае производителем разрабатывается стандартный образец предприятия, который и используется при оценке качества каждого конкретного препарата.

Оценка специфической биологической активности позволяет охарактеризовать фармакологическое действие препарата и изучить механизмы его терапевтических эффектов при клиническом применении. Поэтому специфическую активность биотехнологических препаратов предпочтительно оценивать с использованием методов, соответствующих предполагаемому механизму действия препарата. Для многих биотехнологических лекарственных препаратов, включая препараты системы цитокинов, МкАТ и др., используются индивидуальные методы оценки специфической активности [3, 4].

Цитокины — белковые или полипептидные факторы, которые в основном продуцируются активированными клетками кроветворной и иммунной систем и опосредуют межклеточные взаимодействия при кроветворении, воспалении, иммунных процессах в организме. Они являются универсальными регуляторами жизненного цикла клеток, контролируют процессы дифференцировки, пролиферации, функциональной активации и апоптоза клеток. Одной из важнейших особенностей цитокинов является их способность влиять на все клетки организма, обеспечивая межклеточное взаимодействие и контроль внутренней среды [8, 9]. Система цитокинов включает клетки, продуцирующие цитокины, растворимые цитокины, клетки, экспрессирующие рецепторы для цитокинов (клетки-мишени), белки-антагонисты цитокинов или их рецепторов.

Активная продукция цитокинов происходит в ответ на воспалительные или антигенные стимулы. Действие цитокинов осуществляется через рецепторы, количество которых значительно увеличивается при активации клеток. Связывание цитокина со специфическим рецептором вызывает активацию клетки, пролиферацию, дифференци-

ровку или ее гибель. Знание природы таких рецепторов имеет значение для разработки препаратов, блокирующих эти рецепторы [8].

Цитокины подразделяются на несколько классов — интерлейкины (ИЛ), интерфероны (ИФН α , β , γ), факторы некроза опухолей (ФНО α , β), факторы роста гемопоэтических клеток (колониестимулирующие факторы (Г-КСФ, М-КСФ, ГМ-КСФ), эритропоэтин, тромбопоэтин и др.), факторы роста нелимфоидных клеток (фактор роста фибробластов, фактор роста эндотелиальных клеток, эпидермальный фактор роста и трансформирующие факторы роста (ТФР β , ТФР α)).

Интерлейкины — биологически активные вещества, являются главными участниками развития иммунного ответа на внедрение микроорганизмов, формирования воспалительной реакции, осуществления противоопухолевого иммунитета и др. Они подразделяются на провоспалительные и противовоспалительные, ростовые и дифференцировочные факторы лимфоцитов, хемокины, отдельные регуляторные цитокины [9].

Провоспалительные цитокины — ИЛ-1, ФНО α и ИЛ-6 являются главными медиаторами острофазной реакции организма, развивающейся в процессе инфекционного заболевания или механического повреждения тканей.

Важным иммунорегуляторным цитокином, участвующим в развитии иммунного ответа и обладающим множеством системных эффектов, является ИЛ-1. Он играет существенную роль в активации Т-Лф, стимулируя продукцию ИЛ-2, активирует Th1 звено иммунного ответа. ИЛ-1 стимулирует выработку гепатоцитами белков острой фазы, при действии на центр терморегуляции гипоталамуса вызывает развитие лихорадки. Также ИЛ-1 стимулирует пролиферацию и дифференцировку различных типов клеток. Усиливая экспрессию рецепторов для колониестимулирующих факторов, ИЛ-1 способствует усилиению гемопоэза, с чем связано его радиозащитное действие, стимулирует выход лейкоцитов из костного мозга [8–10] (рис. 1).

На основе рекомбинантного цитокина ИЛ-1 β человеком разработан отечественный лекарственный препарат «Беталейкин» (ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, С.-Петербург).

Фактор некроза опухолей альфа (ФНО α) — провоспалительный цитокин с широким спектром активности, является членом большого семейства молекул суперсемейства ФНО, к которому относят лимфотоксины α и β и др. Основные производители ФНО α как и ИЛ-1 — моноциты (Мо) и макрофаги (Мф). ФНО α усиливает экспрессию молекул адгезии, синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, белков острой фазы и т.д. Наряду с ИЛ-1, ФНО α участвует в формировании всех основных местных, а также некоторых системных проявлений воспаления [8, 9].

ИЛ-6 является провоспалительным цитокином широкого действия, участвует в индукции практически всего комплекса местных проявлений воспаления. Однако его провоспалительные свойства выражены слабее, ИЛ-6 сочетает свойства про- и противовоспалительных цитокинов и участвует не только в развитии, но и в ограничении воспалительной реакции [8].

ИЛ-2 является специфическим ростовым фактором для Т-клеток. Продуцируемый активированными Т-Лф, ИЛ-2 выполняет ключевую роль в процессе инициации и развития иммунного ответа. Он стимулирует активацию Т-хелперов, цитотоксических Т-клеток, В-Лф, естественных (нормальных) киллеров (NK-клеток) и Мф. При стиму-

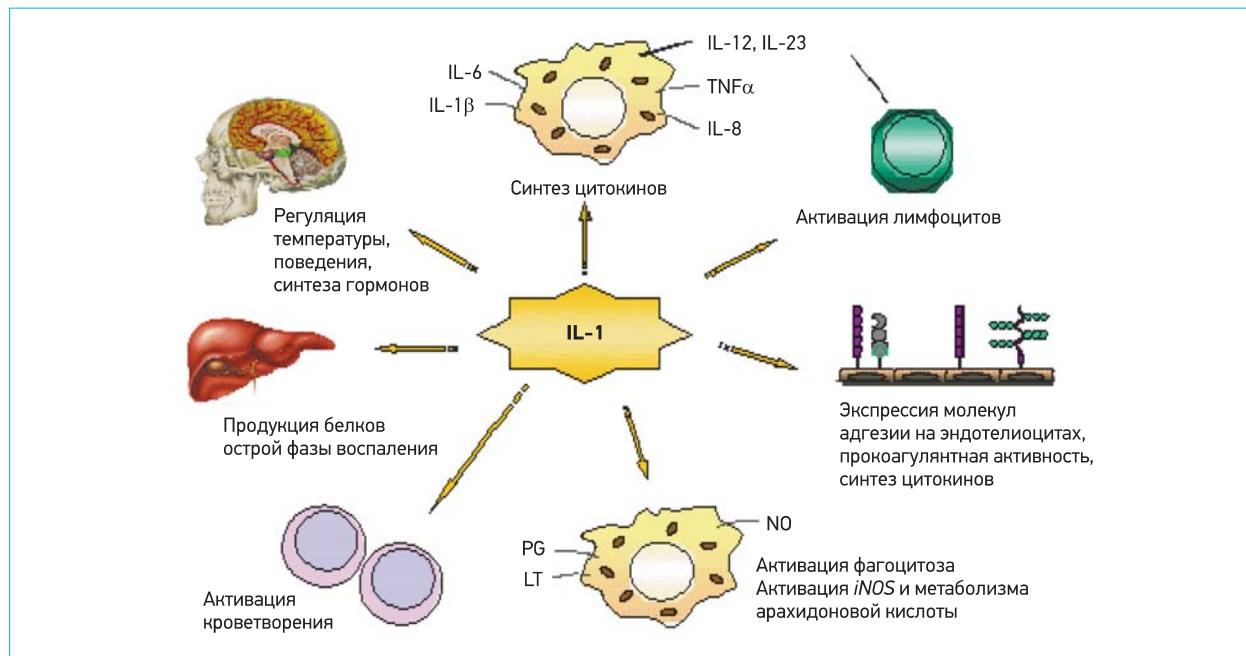


Рис. 1. Участие интерлейкина-1 в защитных реакциях организма: плейротропность эффектов [11].

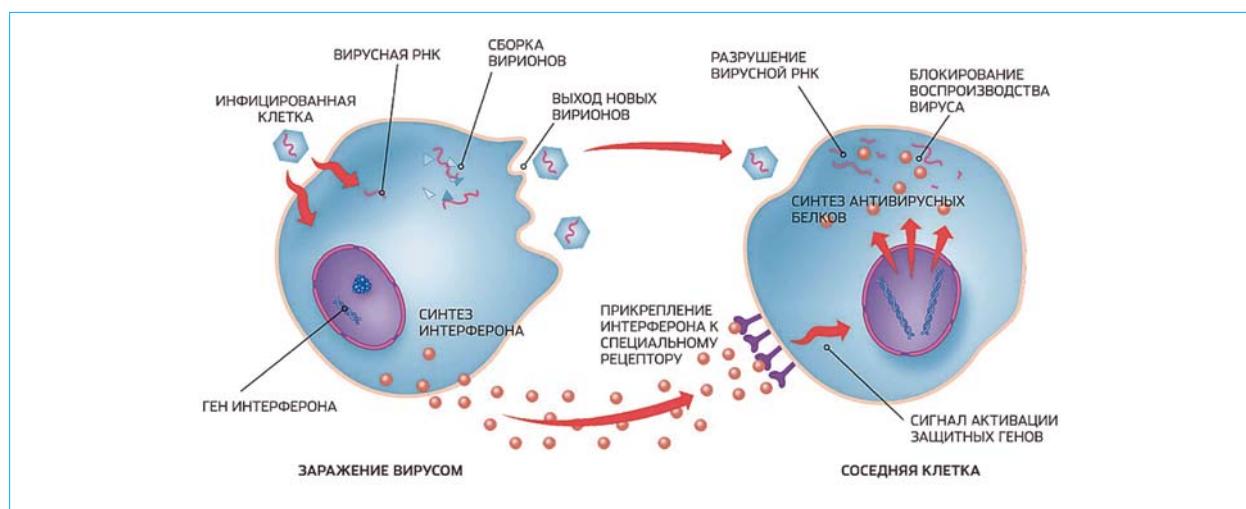


Рис. 2. Механизм действия интерферона [15].

ляции ИЛ-2 формируются лимфокин-активированные киллеры (ЛАК), обладающие высокой противоопухолевой активностью. От присутствия ИЛ-2 зависит развитие цитолитической активности NK-клеток и цитотоксических Т-ЛФ [8, 9, 12, 13].

ИЛ-2 играет основную роль не только в клональной пролиферации активированных Т-ЛФ, но и является фактором их жизнеспособности, поскольку в отсутствие ИЛ-2 активированные клетки подвергаются апоптозу. На основе рекомбинантного белка ИЛ-2 человека разработаны лекарственные препараты — отечественный препарат Ронколейкин (ООО «НПК «БИОТЕХ», С.-Петербург) и зарубежный препарат Пролейкин (Альдеслейкин) («Cetus», США и «Chiron», Нидерланды).

Интерфероны (ИФН) — защитные вещества белковой природы, вырабатываемые клетками в ответ на вирусную инфекцию и другие стимулы, обладают противовирусной,

противоопухолевой, иммуномодулирующей активностью. Известно около 20 разновидностей ИФН, объединенных в 3 вида и 2 типа. Наиболее важное свойство ИФН — способность оказывать противовирусное действие. Противовирусная активность наиболее высока у ИФН типа I (α , β), при этом ИФН не проникает в клетки, а взаимодействует с рецепторами на их поверхности. Далее происходит активация генов, кодирующих ферменты с прямым противовирусным действием, вызывающих блокаду синтеза белков и разрушение вирусной мРНК (рис. 2). Противовирусная активность ИФН типа III также сильно выражена, хотя и обусловлена другими механизмами и развивается несколько медленнее. Также подобно другим цитокинам, ИФН участвуют в регуляции иммунных процессов. Сочетание указанных свойств ИФН служит основанием для их широкого применения в качестве лекарственных препаратов [14].

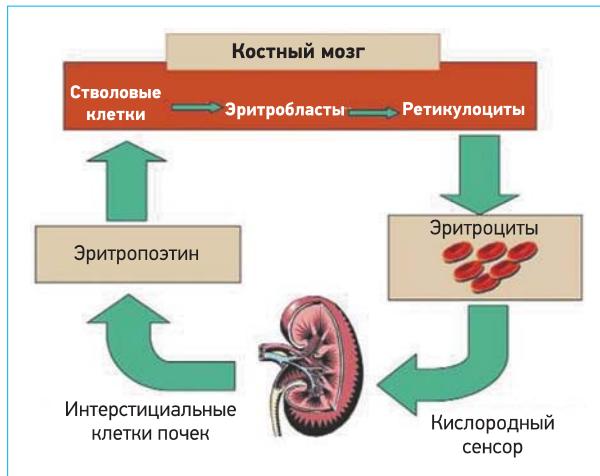


Рис. 3. Синтез и действие эритропоэтина [19].

К факторам гемопоэтических клеток, основной биологической функцией которых является поддержание жизнеспособности и пролиферации кроветворных клеток, относятся колониестимулирующие факторы, эритропоэтин, тромбопоэтин и др. Колониестимулирующие факторы (Γ -КСФ, М-КСФ и ГМ-КСФ) продуцируются различными типами клеток, такими как эндотелиальные клетки, фибробласти, а также Мо/Мф и Т-Лф. Γ -КСФ регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников в костном мозге и высвобождение нейтрофилов в периферической крови; является регулятором гранулопоэза, повышает эффекторные функции нормальных зрелых нейтрофилов. Свою активность Γ -КСФ проявляет за счет связывания со специфическим трансмембранным рецептором, экспрессированным на различных гемопоэтических клетках. В клинической практике используются препараты Γ -КСФ, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК в системе клеток *Escherichia coli* (филграстим) или в системе клеток яичника китайского хомячка (СНО) (ленограстим) для лечения нейтропении после цитотоксической химиотерапии по поводу злокачественных заболеваний и др. [16].

Основным регулятором эритропоэза является эритропоэтин, он способствует пролиферации и дифференцировке клеток эритроидного ростка костного мозга, в организме человека в основном вырабатывается клетками почек [8, 9]. Главным фактором, регулирующим выработку эритропоэтина в организме, является гипоксия. Продукция эритропоэтина имеет обратную зависимость от парциального давления кислорода в крови [17, 18] (рис. 3).

Эритропоэтин является гетерогенным гликопротеином, состоящим из нескольких различных изоформ, образующихся преимущественно путем гликозилирования. В медицинской практике применяется 14 лекарственных препаратов на основе рекомбинантного эритропоэтина (эпоэтина) человека. Гликозилирование молекул рекомбинантного эритропоэтина приводит к образованию нескольких биологически активных форм с различной молекулярной массой и биологической активностью. В настоящее время существует девять международных непатентованных наименований (МНН) рекомбинантного эритропоэтина (эпоэтины альфа, бета, гамма, дельта, эпсилон,kappa, омега, тета и дзета) [17, 18].

Для оценки специфической активности препаратов системы цитокинов могут быть использованы биологиче-

ские методы исследования как в условиях *in vivo* на лабораторных животных, характеризующихся наиболее адекватным ответом на исследуемый препарат, так и в условиях *in vitro* с использованием клеточных линий, чувствительных к определенному цитокину. В зависимости от основных биологических свойств цитокинов и их механизмов действия на клетки-мишени, специфическая активность указанной группы препаратов может оцениваться по стимуляции пролиферации клеток-мишеней, цитотоксическому эффекту, индукции дифференцировки костномозговых предшественников, противовирусному действию [5, 20].

Метод определения пролиферативной активности клеток является одним из наиболее часто используемых методов оценки специфической биологической активности лекарственных препаратов цитокинов. В данном тесте используются соответствующие линии клеток, рост и пролиферация которых зависит от присутствия цитокина в среде культивирования и обусловлена его взаимодействием со специфическими рецепторами на их поверхности. В настоящее время большое количество клеточных линий, чувствительных к различным цитокинам человека, присутствует в каталогах международных и отечественных коллекций клеточных культур.

Разновидности указанного метода определяются стимулирующим или ингибирующим действием препарата на уровень пролиферации, видом используемой клеточной культуры, способом детекции результатов. Методы оценки влияния изучаемого препарата на жизнеспособность и пролиферацию клеток, а также на различные метаболические процессы основаны на определении количественного содержания бластных клеток по включению радиоактивной или другой метки в пролиферирующие клетки; использовании витальных или флуоресцентных красителей, с помощью МТТ-теста, ХТТ-теста и т.д. [20, 21] (табл. 1).

Как видно из данных, представленных в таблице 1, для оценки специфической активности препаратов цитокинов используют методы исследования как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*, в частности для препаратов на основе филграстима или эритропоэтина. Гемостимулирующую активность филграстима оценивают на модели индуцированной цитостатической миелосупрессии, определяя количественное содержание лейкоцитов и нейтрофилов у животных с иммуносупрессией после введения филграстима. Активность эритропоэтина оценивают по стимулирующему влиянию на эритропозз у соответствующих линий нормоцитемических мышей, определяя количество ретикулоцитов после введения препаратов.

Специфическую противовирусную активность лекарственных препаратов на основе ИФН определяют по их защите чувствительных культур клеток от цитопатического действия вирусов-индикаторов.

Специфическая активность ФНО α может быть оценена по цитолитическому действию на чувствительные к нему линии клеток (например, клеток фибробластов мышь линий L-929, клеток фиброзаркомы WEHI-164). Оценка результатов проводится по уровню сохранения жизнеспособности клеток, учитываемой по включению метки, аналогично определению уровня пролиферации клеток.

В клинической практике выделяют основные направления использования цитокинов — цитокиновая иммунотерапия, при которой цитокины выступают в роли лекарственных средств; антицитокиновая терапия, направленная на блокирование биологического действия или удаление избытка цитокинов из организма. Цитокинотерапия мо-

Таблица 1. Лекарственные препараты на основе рекомбинантных цитокинов человека

Группа лекарственных препаратов на основе цитокинов	Показания для клинического применения	Биологическое действие	Метод определения специфической активности
Колониестимулирующие факторы – Г-КСФ (филграстим, ленограстим), – ГМ-КСФ (молграмостим), – М-КСФ	Стимуляция лейкопоэза для восстановления нормального числа лейкоцитов, сниженного после химиотерапии у онкологических больных	Стимуляция пролиферации, дифференцировки и функциональной активности гемопоэтических клеток, активация процессов кроветворения, регуляция гранулопоэза	Гемостимулирующая активность (in vivo) на модели цитостатической миелосупрессии; Стимулирующее действие на пролиферацию (in vitro) – клеток костного мозга, – клеток миелолейкоза мышей, – клеток эритролейкемии, чувствительных к ГМ-КСФ
Эритропоэтины эпoэтины – альфа, – бета, – каппа, – тета, – зета и др.	Лечение анемии различного генеза (больные с хронической почечной недостаточностью, онкологические больные)	Стимуляция эритроидного ростка костного мозга	Стимуляция эритропоэза у мышей (<i>in vivo</i>); Стимуляция пролиферации чувствительных клеток (<i>in vitro</i>)
Интерлейкины – ИЛ-1 бета (Беталейкин) – ИЛ-2 (Ронколейкин)	ИЛ-1 бета — стимулятор лейкопоэза при токсической лейкопении – средство экстренной противолучевой терапии – вторичные иммунодефицитные состояния ИЛ-2 — – сепсис – иммунодефицитные состояния – инфекционные заболевания – плоскоклеточный рак почки	Провоспалительное действие, стимуляция кроветворения Влияние на рост, дифференцировку и активацию Мф, Т- и В-Лф, повышение активности натуральных киллеров и цито-токсических Т-Лф	Усиление пролиферации тимоцитов мышей , стимулированных субоптимальной дозой митогена (<i>in vitro</i>) Стимуляция пролиферации линии клеток CTL-2, зависимой от присутствия ИЛ-2 (<i>in vitro</i>)
Интерфероны α-лейкоцитарный β-фибробластный γ-иммунный	Использование в терапии различных вирусных инфекций и онкологических заболеваний	Наличие противовирусной активности, участие в регуляции иммунных процессов	Оценка противовирусного действия (<i>in vitro</i>) на чувствительных к данному типу ИФН линиях клеток (A-549, MDBK, Vero и др.), с использованием соответствующего вируса-индикатора (вирусы везикулярного стоматита, энцефаломиокардита мышей)
Эпидермальный фактор роста (ЭФР)	При синдроме диабетической стопы у пациентов с трофическими и невропатическими язвами 3 и 4 степени	Стимуляция пролиферации фибробластов, кератиноцитов, эндотелиальных и других клеток, участвующих в заживлении ран	Стимуляция пролиферации линии клеток, чувствительных к фактору роста

жет использоваться как самостоятельный метод лечения или входить в состав комплексной терапии ряда заболеваний [8].

МкАТ представляют собой относительно новую группу лекарственных препаратов, успешно применяемых при лечении онкологических, аутоиммунных, инфекционных, аллергических и ряда других заболеваний. Терапия с помощью препаратов МкАТ высокоспецифична и эффективна, поскольку направлена на определенные патогенетически значимые механизмы развития заболевания, которые ранее не удавалось контролировать с помощью фармакологических средств [8, 22, 23]. Использование лекарственных препаратов МкАТ в качестве терапевтических агентов явилось для медицины стратегическим этапом в смене концепции лечения — от неспецифической к специфической (таргетной) терапии [24].

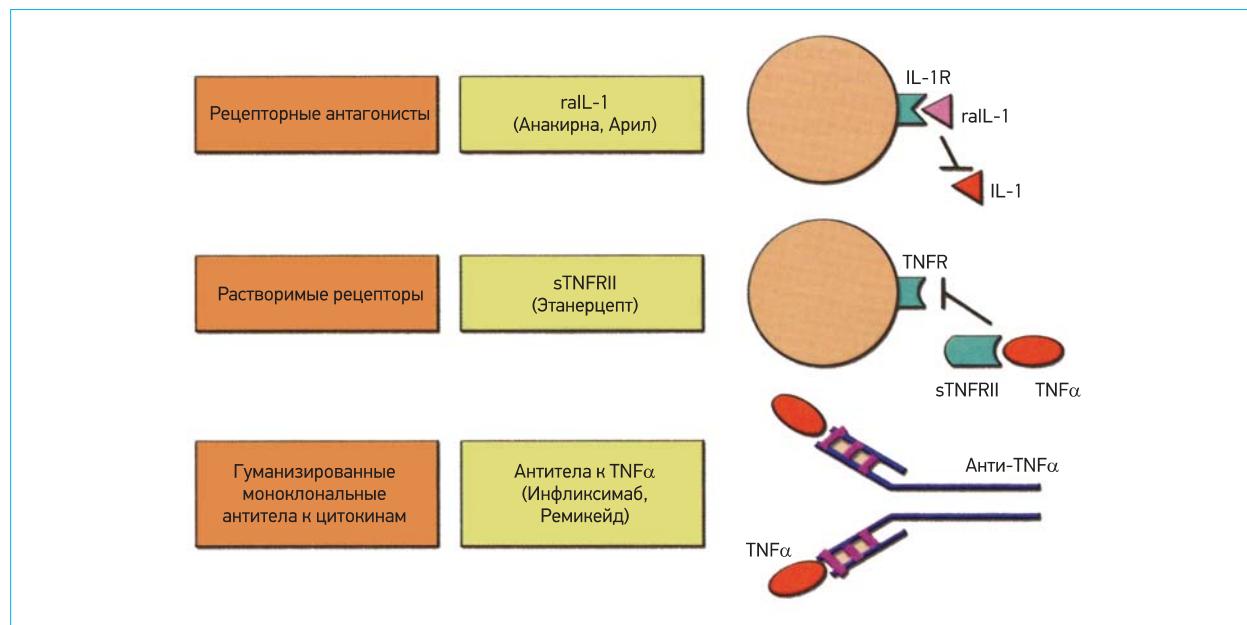
С каждым годом на фармацевтическом рынке увеличивается количество лекарственных препаратов МкАТ и расширяется диапазон их клинического применения. Работа новых препаратов позволяет ожидать появления в ближайшем будущем еще более разнообразных и эф-

ективных лекарственных средств на основе модифицированных МкАТ или их производных [25].

При оценке специфической активности препаратов МкАТ, определяющей их клиническую эффективность, используют методы, соответствующие предполагаемому механизму действия МкАТ, воспроизводимые в условиях *in vitro*. Направленность действия МкАТ осуществляется за счет использования лиганд-опосредованного механизма, который способствует связыванию препарата с соответствующими антигенами (АГ) на поверхности клеток. В связи с этим, в методиках определения специфической активности необходимо использование клеточных линий, которые несут на своей поверхности соответствующие опухолевые-ассоциированные АГ (различные культуры опухолевых тканей человека); экспрессируют рецепторы к ростовым факторам и биологически активным цитокинам, а также иные мембранные молекулы, на которые направлены МкАТ. Все большее распространение получают линии клеток, трансформированные геном люциферазы, которая может использоваться для оценки уровня АТФ в клетках, что позволяет оценить жизнеспособность или

Таблица 2. Механизм действия МкАТ и методы оценки их специфической активности [8, 25, 26]

Механизм действия моноклональных антител	Метод оценки специфической активности
<p>Иммуноопосредованная (антитело-и комплементзависимая цитотоксичность)</p> <p>Стимуляция фагоцитоза опухолевых клеток</p> <p>Блокада рецепторов факторов роста</p> <p>Торможение роста опухоли за счет подавления пролиферации эндотелиальных клеток сосудов</p> <p>Ингибиция проявлений биологически активных цитокинов</p> <p>Индукция апоптоза</p>	<p>1) Оценка комплементзависимой цитотоксичности — происходит активация комплемента, обусловленная реакцией АГ-АТ, которая приводит к повреждению клеточной мембраны и гибели клетки</p> <p>2) Оценка антителозависимой цитотоксичности — разрушение клеток-мишеней происходит под воздействием эффекторных клеток в присутствии специфических антител</p> <p>3) Оценка активности люциферазы, вырабатываемой клетками, рост и пролиферация которых зависит от присутствия факторов роста</p> <p>4) Оценка ингибции пролиферации клеток, обусловленной нейтрализацией активности цитокина, от присутствия которого зависит рост и пролиферация исследуемых клеток</p> <p>5) Оценка нейтрализации цитопатогенного действия цитокинов с помощью исследуемых специфических МкАТ</p>

**Рис. 4.** Средства антицитокиновой терапии и принципы их использования при системных воспалительных процессах [27]: raIL-1 — receptorный антагонист интерлейкина 1; IL-1R — receptor к интерлейкину 1; TNFα — фактор некроза опухолей альфа; sTNFRII — растворимый receptor к фактору некроза опухолей альфа II типа.

активность клеток. При увеличении в культуре количества жизнеспособных клеток возрастает количество АТФ и добавление к клеткам субстрата люциферина способствует повышению уровня люминесценции, опосредованного взаимодействием фермента с люциферином и АТФ (кофактор реакции).

В связи с высокой избирательностью и специфичностью действия на определенные звенья патогенеза заболевания, МкАТ в минимальной степени затрагивают процессы нормального функционирования иммунной системы и обладают способностью подавлять системные реакции воспаления при аутоиммунных заболеваниях и активировать иммунную систему при новообразованиях [26].

Для лечения аутоиммунных заболеваний широко используются лекарственные препараты МкАТ, действие которых направлено на подавление активности провоспалительных цитокинов. При системных воспалительных заболеваниях аутоиммунной природы наблюдается избыточная продукция провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 и ИЛ-6), при этом их концентрация в сыворотке кро-

ви значительно повышается. Это сопровождается проявлением системных эффектов провоспалительных цитокинов, поскольку они являются главными медиаторами острофазной реакции организма, обладают пирогенным эффектом, способны вызывать синдром повышения проницаемости капилляров.

Лекарственные препараты, направленные на ослабление действия биологически активных цитокинов, могут реализовать свое действие на разных уровнях: подавлять синтез или секрецию цитокина, связывать секретированный цитокин, конкурировать с ним за взаимодействие с рецептором на клетке-мишени и блокировать передачу сигнала с цитокинового рецептора в клетку-мишень [8, 27].

На рисунке 4 представлена схема механизмов действия указанных групп лекарственных препаратов.

Наиболее важной мишенью для антицитокиновой терапии является ФНО α . К препаратам, обнаружившим высокую эффективность при лечении ревматоидного артрита, псориаза, анкилозирующего спондилита, относятся

Таблица 3. Лекарственные препараты, нейтрализующие действие провоспалительных цитокинов

Лекарственный препарат	Показания для клинического применения	Биологическое действие	Метод определения специфической активности
Инфликсимаб химерные МкАТ к ФНО α Адалимумаб полностью человеческие МкАТ к ФНО α Голимумаб полностью человеческие МкАТ к ФНО α Этанерцепт белок слияния (рецептор к ФНО α и Fc-фрагмент IgG1 человека)	Ревматоидный артрит Болезнь Крона Псориатический артрит Псориаз Ревматоидный артрит Псориатический артрит Ювенильный идиопатический артрит	Нейтрализация биологического действия ФНО α и других, связанных с ним провоспалительных цитокинов	Нейтрализация цитолитического действия ФНО α на клетках линий чувствительных к ФНО α (WEHI 164 var 13, WEHI-164, L-929) (<i>in vitro</i>) Подавление биологической активности ФНОα, оцениваемой по ингибции апоптоза клеток, индуцированного ФНОα (<i>in vitro</i>)
Тоцилизумаб гуманизированные МкАТ к рецептору ИЛ-6	Ревматоидный артрит	Связывание растворимых и мембранных рецепторов ИЛ-6 (sIL-6R и mIL-6R)	Подавление пролиферации клеток линии, чувствительной к ИЛ-6 (<i>in vitro</i>)
Канакинумаб полностью человеческие МкАТ к ИЛ-1 β	Острый подагрический артрит Активная фаза системного ювенильного идиопатического артрита у детей	Связывание ИЛ-1 β , нейтрализация его биологического действия за счет блокады взаимодействия ИЛ-1 β с его рецепторами	Подавление ИЛ-1β зависимой индукции люциферазной активности клеток соответствующей линии (<i>in vitro</i>)

блокаторы ФНО α или его рецепторов [28, 29]. МкАТ к ФНО α связывают как растворимые, так и трансмембранные формы ФНО α и препятствуют их взаимодействию со специфическим рецептором на мемbrane клеток-мишени. В медицинской практике для лечения указанных заболеваний используются лекарственные препараты — инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб (МкАТ к ФНО α); белок слияния этанерцепт, включающий рецептор к ФНО α и Fc-фрагмент IgG1 человека. Также при лечении ревматоидного артрита применяются МкАТ к рецептору ИЛ-6 (тоцилизумаб), при лечении острого подагрического артрита — МкАТ к ИЛ-1 β (канакинумаб) (табл. 3).

Для оценки специфической активности данной группы препаратов используют следующие методы: нейтрализация цитолитического действия ФНО α на чувствительных линиях клеток; подавление пролиферации клеток, чувствительных к ИЛ-6.

В основе механизмов действия другой группы лекарственных препаратов лежит их способность оказывать модулирующее влияние на костимулирующие сигналы в процессе развития иммунного ответа. Известно, что для активации цитотоксических клеток / Т-ЛФ необходимо взаимодействие рецептора Т-клеток с АГ в комплексе с антигенами главного комплекса гистосовместимости (АГ ГКГ) класса II. Кроме активирующего сигнала нужны костимулирующие сигналы для индукции пролиферации Т-клеток, секреции цитокинов, проявления эффекторных функций и активации цитотоксических Т-ЛФ. Костимулирующие сигналы возникают благодаря взаимодействию маркера ранней активации CD28 на Т-ЛФ с костимулирующими молекулами CD80 и CD86 на антигенпрезентирующими клетках (АПК). Взаимодействие маркера поздней активации цитотоксических CTLA-4 на Т-ЛФ с CD80 и CD86 на АПК приводит к регулированию и подавлению активации Т-ЛФ [8].

Лекарственные препараты (абатацепт, белатацепт), активным компонентом которых является рекомбинантный белок слияния, состоящий из домена CTLA-4 и Fc-фрагмента IgG1 человека, взаимодействуя с костиму-

лирующими молекулами CD80 и CD86 на АПК, блокируют избыточную стимуляцию Т-ЛФ, осуществляющую за счет CD28 (рис. 5). Указанные препараты используются для лечения аутоиммунной патологии, при трансплантации органов для предотвращения реакции отторжения (табл. 4).

Лекарственный препарат на основе МкАТ к антигену CTLA-4 (ипилимумаб) применяется для лечения онкологических заболеваний, так как блокада CTLA-4 специфическими МкАТ приводит к подавлению супрессирующих сигналов, следствием чего является активация цитотоксических Т-ЛФ, за счет воздействия которых отмечается подавление роста опухолевых клеток [31, 32].

Специфическая активность указанных лекарственных препаратов оценивается по подавлению синтеза ИЛ-2 в культуре клеток или оценке степени активации Т-ЛФ при совместном культивировании Т- и В-клеток.

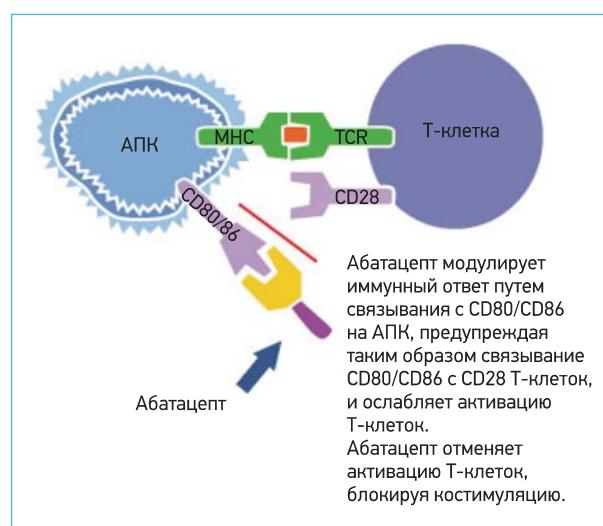
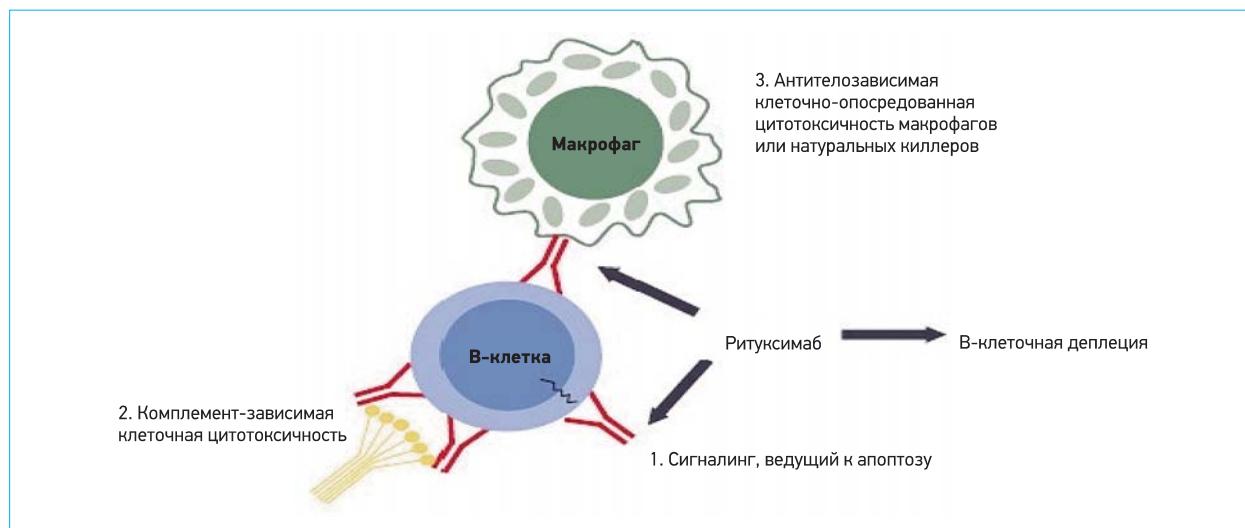


Рис. 5. Механизм действия абатацепта [30]: ТCR — Т-клеточный рецептор; МНС — главный комплекс гистосовместимости; АПК — антигенпрезентирующие клетки.

Таблица 4. Лекарственные препараты, модулирующие костимулирующие сигналы

Лекарственный препарат	Показания для клинического применения	Биологическое действие	Метод определения специфической активности
Абатацепт			
Белатацепт			
рекомбинантный белок слияния (внеклеточный домен CTLA-4 и Fc-фрагмент IgG1 человека)	Аутоиммунная патология Профилактика реакции отторжения трансплантата Лечение онкологических заболеваний	Подавление активации Т-ЛФ за счет блокады взаимодействия CD28 с CD80/CD86 (ингибиция костимулирующего сигнала) Созревание цитотоксических Т-ЛФ за счет связывания антигена CTLA-4 повышает интенсивность иммунного ответа против опухолевых клеток	Ингибирование синтеза ИЛ-2 при совместном культивировании Т- и В-клеток человека (<i>in vitro</i>) Оценка степени активации Т-клеток (<i>in vitro</i>)
Ипилимумаб	полностью человеческие МкАТ к антигену CTLA-4 человека		

**Рис. 6.** Механизмы возможного действия ритуксимаба [30, 34, 35].

Наиболее широко лекарственные препараты МкАТ применяются в онкологии. Разработан целый ряд препаратов МкАТ, направленных к различным опухолеассоциированным АГ [33]. При лечении лейкозов используют препараты, активным компонентом которых являются МкАТ к мембранным молекулам, характерным для клеток, вовлеченных в лейкозный процесс. В этом случае специфическое связывание МкАТ с трансмембранным антигеном CD20 на опухолевых В-клетках способствует элиминации клеток за счет комплемент-зависимого цитолиза или антителозависимого контактного цитолиза. Регионы АГ, ответственные за распознавание АГ, связываются с CD20 на опухолевой В-клетке, а Fc-регионы путем связывания с первым компонентом комплемента или Fc-рецепторами на эффекторных клетках инициируют иммунные механизмы разрушения клетки (рис. 6).

Лекарственные препараты на основе МкАТ, специфичных к CD20 (ритуксимаб, обинутузумаб, офатумумаб), используются при лечении неходжкинской лимфомы и хронического лимфолейкоза, а также ревматоидного артрита, поскольку в настоящее время доказана возможность эффективного контроля аутоиммунных патологических состояний путем истощения (и/или модуляции функции) активированных В-клеток [21, 36–39]. Специфическая активность препаратов данной группы оценивается биологическими методами *in vitro*: метод комплемент-зависимой цитотоксичности с использованием В-лимфобластоидных клеток линии WIL2-S, экспрессирующих CD20;

метод антитело-зависимой цитотоксичности с использованием клеток, экспрессирующих CD20, и клеток-эффекторов (табл. 5).

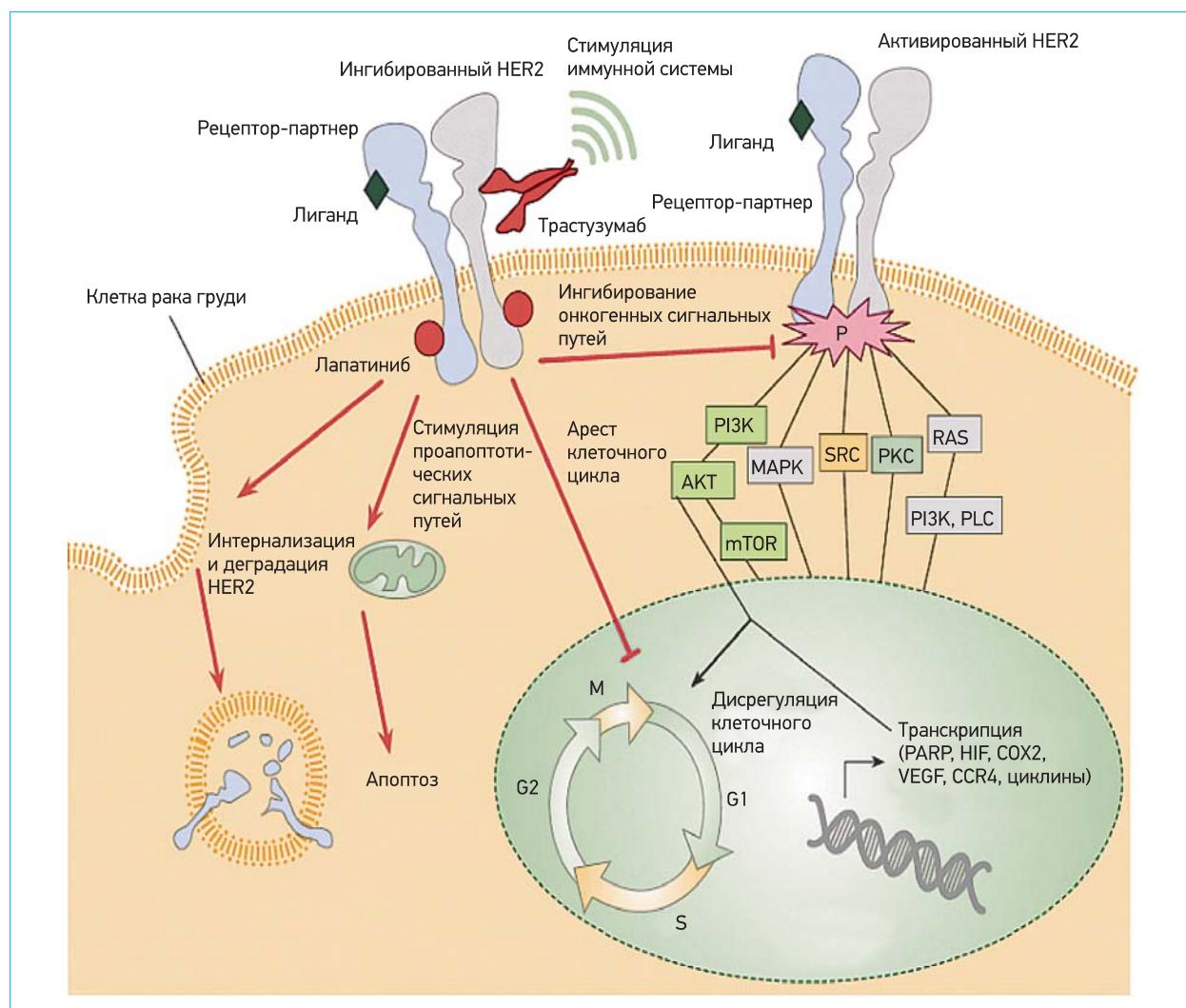
Важными факторами функционирования клеток, в том числе опухолевых, являются регуляция процессов сигнальной трансдукции, включая активность факторов роста, транскрипционных факторов и тесно связанных с ними процессов клеточной пролиферации,angiогенеза, а для опухолевых клеток — инвазии и метастазирования [40].

Факторы роста обеспечивают и регулируют рост, дифференцировку и функциональную активность клеток. К факторам роста, играющим важную роль в опухолевых процессах, относятся эпидермальный фактор роста (ЭФР), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов и др. [8–10].

Одним из наиболее изученных противоопухолевых препаратов МкАТ является трастузумаб (гуманизированные МкАТ к внеклеточному домену рецептора эпидермального фактора роста 2 типа (HER2)). Гиперэкспрессия указанного рецептора на поверхности опухолевых клеток связана с неблагоприятным течением заболевания. Поэтому он является важной мишенью для противоопухолевой терапии. Трастузумаб обладает комплексным механизмом противоопухолевого действия, который обусловлен блокадой внутриклеточных путей передачи сигнала, которые запускает HER2, а также стимуляцией противоопухолевого иммунного ответа. Он подавляет пролифера-

Таблица 5. Лекарственные препараты моноклональных антител, специфичных к CD20

Лекарственный препарат	Показания для клинического применения	Биологическое действие	Метод определения специфической активности
Ритуксимаб химерные МкАТ к молекуле CD20 на В-Лф и опухолевых клетках	Неходжкинская лимфома Ревматоидный артрит Хронический лимфолейкоз	Специфическое связывание МкАТ с CD20 В-Лф приводит к элиминации клеток	Комплементзависимая цитотоксичность с использованием В-лимфобластоидных клеток, экспрессирующих CD20 (<i>in vitro</i>)
Офатумумаб полностью человеческие МкАТ к молекуле CD20	Хронический лимфолейкоз		Антитело-зависимая цитотоксичность с использованием клеток, экспрессирующих CD20 , и клеток-эффекторов (<i>in vitro</i>)
Обинутузумаб гуманизированные МкАТ II типа к молекуле CD20 с модифицированной схемой гликозилирования			

**Рис. 7.** Механизм действия трастузумаба [41, 44]: HER2 — внеклеточный домен рецептора эпидерmalного фактора роста 2 типа.

цию, восстанавливает способность опухолевых клеток к апоптозу и др. [41] (рис. 7).

В комбинации с пертузумабом (гуманизированные МкАТ к домену димеризации рецептора HER2) клиническая эффективность трастузумаба значительно повышается. Считается, что механизмы действия трастузумаба и пертузумаба дополняют друг друга, так как оба препарата связываются с HER2-рецептором, но в разных областях [41–43].

Специфическая активность указанных препаратов оценивается по их антипролиферативному действию на культурах клеток карциномы молочной железы человека (табл. 6).

Одним из основных факторов микроокружения опухоли, приводящим к росту и метастазированию заболевания, является ангиогенез. Взаимодействие фактора роста эндотелия сосудов с его рецепторами приводит к пролиферации эндотелиальных клеток и образованию новых

Таблица 6. Лекарственные препараты, подавляющие активность факторов роста

Лекарственный препарат	Показания для клинического применения	Биологическое действие	Метод определения специфической активности
Трастузумаб гуманизированные МкАТ к внеклеточному домену рецептора HER2	Диссеминированный рак молочной железы с гиперэкспрессией HER2	Связывание с IV доменом HER2-рецептора, блокирует HER2-опосредованные сигнальные пути, активирует клеточную цитотоксичность	Подавление пролиферации клеток линий карциномы молочной железы человека (<i>in vitro</i>)
Пертузумаб гуманизированые МкАТ к домену димеризации рецептора HER2	Метастатический или местнорецидивирующий неоперабельный рак молочной железы с гиперэкспрессией HER2	Связывание с доменом димеризации блокирует гиперактивацию сигнальных путей, опосредованных как через HER2, так и через рецепторы HER1/3/4	
Бевацизумаб гуманизированные МкАТ к VEGF	Метастатический колоректальный рак Местно рецидивирующий или метастатический рак молочной железы Распространенный и/или метастатический почечно-клеточный рак Глиобластома Эпителиальный рак яичника, маточной трубы и первичный рак брюшины	Связывание с VEGF предотвращает его взаимодействие с рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток сосудов, подавляя их рост	Подавление пролиферации эндотелиальных клеток пупочной вены человека, экспрессирующих рецептор к VEGF (<i>in vitro</i>)
Афлиберцепт (рекомбинант-ный белок слияния) содержит домен рецептора VEGF и Fc-фрагмент IgG1 человека	Метастатический колоректальный рак (для лекарственного препарата «Залтрап®») В офтальмологии (для лекарственного препарата «Эйлеа®») – неоваскулярная (влажная) возрастная макулярная дегенерация – макулярный отек вследствие окклюзии центральной вены сетчатки	Связывание со всеми формами VEGF (VEGF-A, VEGF-B), блокирует активацию рецепторов к VEGF и пролиферацию эндотелиальных клеток	Снижение активности люциферазы, вырабатываемой клетками (линия клеток, рост и пролиферация которой зависит от VEGF) (<i>in vitro</i>)
Рабинизумаб Fab-фрагмент человеческих МкАТ к VEGF A	Эксудативно-геморрагическая форма возрастной макулярной дегенерации и отек макулы на фоне сахарного диабета и тромбоза вен сетчатки	Обладает антиангиогенным эффектом за счет связывания с эндотелиальным фактором роста сосудов. Это подавляет пролиферацию сосудов и неоваскуляризацию	Подавление пролиферации эндотелиальных клеток пупочной вены человека, экспрессирующих рецептор к VEGF (<i>in vitro</i>)

кровеносных сосудов. Специфическое связывание соответствующих МкАТ с VEGF предотвращает его взаимодействие с рецепторами на поверхности клеток эндотелия опухолевых клеток, что приводит к снижению васкуляризации опухоли и угнетению ее роста (рис. 8).

Для лечения онкологических заболеваний используются лекарственные препараты МкАТ — бевацизумаб (МкАТ к VEGF), панитумумаб (МкАТ к рецептору VEGF); препарат на основе белка слияния — афлиберцепт, который содержит в своей структуре домены рецепторов VEGF и

Fc-фрагмент IgG1 человека. Лекарственные препараты на основе Fab-фрагмента человеческих МкАТ к фактору роста эндотелия сосудов А (рабинизумаб), а также афлиберцепт применяются в офтальмологии для лечения неоваскулярной (влажной) формы возрастной макулярной дегенерации.

Специфическую активность указанных препаратов оценивают по подавлению пролиферации эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC, экспрессирующих рецептор к VEGF, или по снижению активности люциферазы, вырабатываемой клетками в ответ на стимуляцию VEGF (табл. 6).

Индуцированный различными стимуляторами, митогенами синтез цитокинов отражает потенциальную, резервную способность клеток отвечать на антигенный стимул (в частности, на действие лекарственных препаратов). Сниженная индуцированная продукция цитокинов может служить одним из признаков иммунодефицитного состояния.

У лекарственных препаратов с иммуномодулирующей активностью, а также многих препаратов МкАТ, специфическая активность может быть определена по их влиянию на активацию клеток, оцениваемую по способности клеток продуцировать цитокины (например, такие как ИЛ-2, ФНО α и др.). Для препаратов МкАТ, в соответствии с их механизмом действия, в данном случае характерно подав-

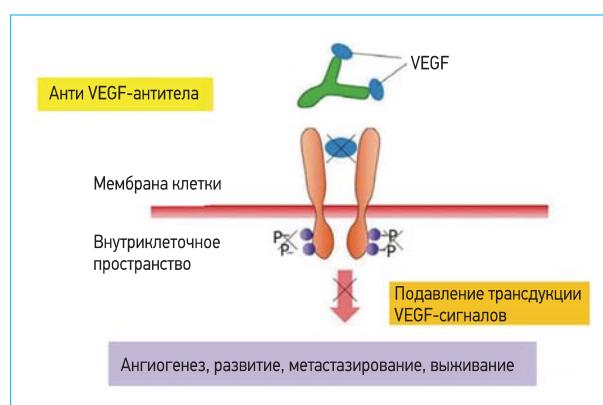


Рис. 8. Действие VEGF и результаты блокирования его активности с помощью моноклональных антител [45].

ление активации клеток и дозозависимое снижение уровня синтезируемых цитокинов.

Для выявления синтезированных цитокинов в супернатанте культивируемых клеток или цитокин-продуцирующих клеток используют методы, основанные на следующих принципах:

- выявление цитокинов (внутриклеточных и мембраноассоциированных) соответствующими MkАТ, мечеными флуорохромами, путем регистрации клеток, экспрессирующих цитокины, на проточном цитофлуориметре;
- выявление клеток, секретирующих определенные цитокины (метод EliSpot);
- оценка интенсивности пролиферации соответствующих цитокин-зависимых клеточных линий под влиянием цитокинов, содержащихся в супернатанте культивируемых клеток;
- иммуноферментный анализ для выявления секретируемых цитокинов [25].

При оценке качества биотехнологических лекарственных препаратов также применяются методы, характеризующие специфичность связывания АГ с соответствующими АТ. С этой целью могут быть использованы методы иммуноферментного анализа (ИФА), поверхностного плазмонного резонанса, а также методы, основанные на технологии Alpha (AlphaScreen®, AphaLISA® и AlphaPlex™) и др. Метод поверхностного плазмонного резонанса позволяет оценить биоспецифичное связывание иммобилизованного АТ с соответствующим АГ при их взаимодействии на биосенсорном чипе по изменению показателя преломления электромагнитной волны. Технология Alpha представляет собой люминесцентную технологию, основанную на взаимодействии частиц (гранул), разработанную для измерений биологических взаимодействий. Следует учитывать, что указанные методы не характеризуют проявления биологической активности лекарственных препаратов.

Таким образом, биотехнологические препараты в настоящее время достаточно широко применяются в медицинской практике. Одним из основных показателей, характеризующих качество лекарственных средств, является специфическая активность, позволяющая оценить способность препарата проявлять определенный биологический эффект. Охарактеризованные в обзоре методы исследования в условиях *in vivo* и *in vitro* позволяют эффективно оценивать специфическую активность современных биотехнологических лекарственных препаратов и могут быть использованы при разработке, создании и испытаниях новых лекарственных средств, относящихся к данной категории.

С каждым годом количество данных препаратов увеличивается, на фармацевтическом рынке появляются новые препараты как для лечения онкологических и аутоиммунных заболеваний, так и для использования в схемах лечения заболеваний другого профиля. Расширяется и спектр аналитических методик для оценки специфической активности новых биотехнологических лекарственных препаратов.

Литература

1. Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
2. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 814. WHO. 2013.
3. Авдеева ЖИ, Волкова РА, Аллатова НА, Борисевич ИВ. Общие принципы разработки программы доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии. Цитокины и воспаление 2011; 10(4): 5–10.
4. Авдеева ЖИ, Аллатова НА, Солдатов АА, Бондарев ВП, Бунятыян НД, Меркулов ВА и др. Особенности доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов. Иммунология 2015; 36(5): 306–12.
5. Аллатова НА, Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Бондарев ВП, Медуницын НВ. Принципы оценки специфической активности биотехнологических лекарственных препаратов. Цитокины и воспаление 2015; 14(3): 12–6.
6. Яковлев АК, Гайдерова ЛА, Аллатова НА, Лобанова ТН, Постнова ЕЛ, Юрчикова ЕИ и др. Изучение принципов стандартизации фармакологической активности препаратов рекомбинантных эритропоэтинов. Стандартные образцы 2016; (1): 8–20.
7. Мотузова ЕВ, Аллатова НА, Гайдерова ЛА, Рунова ОБ, Волкова РА, Мыца ЕД и др. Разработка и аттестация отраслевого стандартного образца активности филграстима. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16(3): 172–8.
8. Ярилин АА. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
9. Кеплинский СА, Симбирцев АС. Цитокины. СПб: Фолиант; 2008.
10. Симбирцев АС. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма. Цитокины и воспаление 2002. 1(1): 9–16.
11. Баринов АН. Тазовые боли с позиции невролога. Available from: <http://immedia.info/images/restricted/pelvicpain.pdf>.
12. Медуницын НВ, Авдеева ЖИ, Аллатова НА. Препараты на основе цитокинов для иммунотерапии. В кн.: Сб. трудов 5-го Конгресса «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии». Т. 1. Актуальные и пленарные лекции. М., 2002. С. 381–97.
13. Авдеева ЖИ. Лекарственные препараты цитокинов. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2005; (1): 17–21.
14. Попов ВФ, Попов ОВ. Лекарственные формы интерферонов: Справ. Врача. М.: Триада-Х, 2002.
15. Ржешевский АВ. Золотой век вирусов. Популярная механика 2015; (9): 410–44.
16. Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Аллатова НА, Киселевский МВ, Лысикова СЛ, Бондарев ВП и др. Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Оценка качества. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015; (1): 4–14.
17. Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: a common mechanism of action. Exp Hematol. 2008; 36(12): 1573–84.
18. Меркулов ВА, Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Аллатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Медуницын НВ. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов и их характеристика. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2013; (3): 4–11.
19. Шестакова МВ, Мартынов СА. Анемия при диабетической нефропатии: прогностическое значение, диагностика и лечение. Consilium medicum 2006; (9): 39–43.
20. Ковалчук ЛВ, Ганковская ЛВ, Мешкова РЯ. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.
21. Лягоскин ИВ, Берестовой МА, Потеряев ДА, Зейналова ЭС, Вишневский АЮ, Казаров АА. Валидация ХТТ-теста для оценки антитромбоцитарной активности препаратов на основе моноклональных антител. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015; (1): 45–50.
22. Guideline on development, production, characterization and specifications for monoclonal antibodies and related products. London, EMA. 2008.
23. Авдеева ЖИ, Аллатова НА, Волкова РА, Лаптева ЛК. Лекарственные препараты на основе генно-инженерных моноклональных антител. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2011; (2): 14–9.
24. Иванов АА, Белецкий ИП. Терапия моноклональными антителами — панацея или паллиатив? Ремедиум 2011; (3): 12–6.

25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая. М.: Гриф и К, 2013.
26. Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Алпатова НА, Медуницаин НВ, Бондарев ВП, Миронов АН и др. Лекарственные препараты моноклональных антител нового поколения (проблемы и перспективы). Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015; (1): 21–35.
27. Хаитов РМ, Ярилин АА, Пингегин БВ. Иммунология. Атлас. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. С. 302; 333.
28. Сигийн ЯА, Лукина ГВ. Биологическая терапия в ревматологии. М.: Практическая медицина; 2009.
29. Елисеев МС, Барскова ВГ, Насонов ЕЛ. Роль фактора некроза опухоли-α (ФНО α) в развитии обменных нарушений и атеросклероза и влияние на них ингибиторов ФНО α у больных ревматическими заболеваниями. Научно-практическая ревматология 2009; (2): 67–73.
30. Коваленко ВН, Головач ИЮ, Борткевич ОП. Современные мишени для целевой терапии ревматоидного артрита: от моноклональных антител до блокаторов сигнальных молекул. Украинский ревматологический журнал 2012; 49(3): 5–14.
31. Tarhini AA, Iqbal F. CTLA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments. Onco Targets Ther. 2010; 3: 15–25.
32. Демидов ЛВ, Харкевич Ю, Михайлова ИН, Петенко ИН, Самойленко ИВ, Утяшев ИА. Новые направления в лечении больных меланомой кожи. Вестник московского онкологического общества. Информационный бюллетень 2011; 9(580): 4–6.
33. Моисеенко ВМ. Возможности моноклональных антител в лечении злокачественных опухолей. Практическая онкология 2002; 3(4): 253–61.
34. Проценко ГА. Перспективы применения ритуксимаба в ревматологии. Украинский ревматологический журнал 2009; (1): 44–7.
35. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Eurie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to an-
- ti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. Arthritis Rheum. 2006; 54(9): 2793–806.
36. Насонов ЕЛ. Ритуксимаб в лечении ревматических болезней. Научно-практическая ревматология 2008. Приложение к № 1: 3–10.
37. Насонов ЕЛ, ред. Анти-В-клеточная терапия в ревматологии: фокус на ритуксимабе. Монография. М.: ИМА-ПРЕСС; 2012.
38. Maddocks KJ, Lin TS. Update in the management of chronic lymphocytic leukemia. J Hematol Oncol. 2009; 2: 2–29.
39. Taylor RP, Lindorfe MA. Drug Insight: the mechanism of action of Rituximab in autoimmune disease—the immune complex decay hypothesis. Nat Clin Pract Rheumatol. 2007; 3(2): 86–95.
40. Мирошнико ОА, ред. Иммуномодуляторы в России: Справочник. Т. 1. Омск: ГП «Омская областная типография»; 2014.
41. Бесова НС. Продолжительность терапии Герцептином при HER2-позитивном раке молочной железы. Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология 2012; (1): 14–21.
42. Ганьшина ИП, Жукова ЛГ, Тюрин ИЕ. Пертузумаб — новый взгляд на HER2-положительный метастатический рак молочной железы. Фарматека 2014; (17): 52–9.
43. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, et al. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. J Clin Oncol. 2010; 28(7): 1138–44.
44. Jones K, Buzdar AU. Evolving novel anti-HER2 strategies. Lancet Oncol. 2009; 10(12): 1179–87.
45. Корман ДБ. Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов. М.: «Практическая медицина», 2014. С. 150.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Алпатова Наталья Александровна. Главный эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Гайдерова Лидия Александровна. Начальник лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Яковлев Алексей Константинович. Ведущий микробиолог лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Мотузова Екатерина Валерьевна. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

Лысикова Светлана Леонидовна. Эксперт 1-й категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Солдатов Александр Алексеевич. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук.

Авдеева Жанна Ильдаровна. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Алпатова Наталья Александровна; naal-cytok@yandex.ru

Assessment of biotechnological products specific activity

**N. A. Alpatova, L. A. Gayderova, A. K. Yakovlev, E. V. Motuzova, S. L. Lysikova,
A. A. Soldatov, Zh. I. Avdeeva**

*Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

The review looks into various aspects of assessing specific activity of biotechnological products, which is one of their key quality parameters. Approaches to the analysis of this parameter and the choice of test procedures are governed by the nature and characteristics of a medicinal product. Test procedures should be adequate and have sufficient sensitivity and specificity. Specific activity of the products in question can be assessed by biological methods both *in vivo* using laboratory animals, which demonstrate the most adequate response to the tested product, and *in vitro* using sensitive cell lines. As-

essment of specific biological activity helps to characterize the product's pharmacological action and systematically examine the mechanisms of therapeutic effects in clinical practice. Therefore, specific activity of biotechnological products should be assessed using methods appropriate for the proposed mechanism of action. Many biotechnological products, such as cytokine system products, mAbs, fusion proteins and some others call for individual methods for assessment of their specific activity. Biotechnological products are successfully used in the treatment of autoimmune, infectious, oncological, and allergic diseases.

Key words: biotechnological products; cytokines; monoclonal antibodies; specific biological activity; *in vitro* and *in vivo* test methods; cell lines.

For citation: Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Motuzova EV, Lysikova SL, Soldatov AA, Avdeeva Zhl. Assessment of biotechnological products specific activity. *Biopreparations. Prevention, diagnosis, treatment* 2017; 17(1): 13–26.

References

1. Federal Law of 12.04.2010, № 61-ФЗ «On Circulation of Medicines» (in Russian).
2. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 814. WHO. 2013.
3. Avdeeva Zhl, Volkova RA, Alpatova NA, Borisevich IV. General principles of development of preclinical studies program for immunobiological medicinal preparations produced using genetic engineering methods. *Tsitokiny i vospalenie*. 2011; 10(4): 5–10 (in Russian).
4. Avdeeva Zhl, Alpatova NA, Soldatov AA, Bondarev VP, Bunyatyan ND, Merkulov VA, et al. Aspects of preclinical studies of biotech drugs. *Immunologiya* 2015; 36(5): 306–12 (in Russian).
5. Alpatova NA, Avdeeva Zhl, Soldatov AA, Bondarev VP, Medunitsyn NV. Basis of measurement the specific activity of biotech medicinal preparations. *Tsitokiny i vospalenie* 2015; 14(3): 12–6 (in Russian).
6. Yakovlev AK, Gayderova LA, Alpatova NA, Lobanova TN, Postnova EL, Yurchikova El, et al. Studying of the standardization principles of pharmacological activity of recombinant erythropoietin preparations. *Standartnye obraztsy* 2016; (1): 8–20 (in Russian).
7. Motuzova EV, Alpatova NA, Gayderova LA, Runova OB, Volkova RA, Mytsa ED, et al. Development and certification of an industrial reference standard for determination of filgrastim activity. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(3): 172–8 (in Russian).
8. Yarilin AA. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media; 2010 (in Russian).
9. Ketlinskij SA, Simbircev AS. Cytokines. St. Petersburg: Foliant; 2008 (in Russian).
10. Simbircev AS. Cytokines — a new system of regulation of defense reactions. *Tsitokiny i vospalenie*. 2002; 11(1): 9–16 (in Russian).
11. Barinov AN. Pelvic pain from the position of neurologist. Available from: <http://inmedia.info/images/restricted/pelvicpain.pdf> (in Russian).
12. Medunitsyn NV, Avdeeva Zhl, Alpatova NA. Preparations based on cytokines for immunotherapy. In: Sb. trudov 5-go Kongressa «Sovremennye problemy allergologii, immunologii i immunofarmakologii». V. 1. Aktovye i plenarnye lektsii. Moscow. 2002. P. 381–97 (in Russian).
13. Avdeeva Zhl. Medications of cytokines. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2005; (1): 17–21 (in Russian).
14. Popov VF, Popov OV. Dosage forms of interferon: Ref. Physician. Moscow: Triada-X, 2002 (in Russian).
15. Rzheshevskiy AV. The golden age of viruses. *Populyarnaya mekhanika* 2015; (9): 410–44 (in Russian).
16. Avdeeva Zhl, Soldatov AA, Alpatova NA, Kiselevskiy MV, Lysikova SL, Bondarev VP, et al. Recombinant granulocyte colony stimulating factor biosimilars. Quality assessment. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015; (1): 4–14 (in Russian).
17. Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: a common mechanism of action. *Exp Hematol*. 2008; 36(12): 1573–84.
18. Merkulov VA, Soldatov AA, Avdeeva Zhl, Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Medunitsyn NV. Recombinant erythropoietin preparations and their characteristics. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2013; (3): 4–11 (in Russian).
19. Shestakova MV, Martynov SA. Anemia in diabetic nephropathy: prognostic value, diagnosis and treatment. *Consilium medicum* 2006; 9: 39–43 (in Russian).
20. Koval'chuk LV, Gankovskaya LV, Meshkova RY. Clinical immunology and allergology with the basics of immunology. Moscow: GEOTAR-Media; 2012 (in Russian).
21. Lyagoskin IV, Berestovoy MA, Poteryaev DA, Zeynalova ES, Vishnevskiy AYu, Kazarov AA. Validation of the XTT-test for assessing the antiproliferative activity of biologics on the basis of monoclonal antibodies. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015; (1): 45–50 (in Russian).
22. Guideline on development, production, characterization and specifications for monoclonal antibodies and related products. London: EMA. 2008.
23. Avdeeva Zhl, Alpatova NA, Volkova RA, Lapteva LK. Medicinal preparations based on monoclonal antibodies. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2011; (2): 14–9 (in Russian).
24. Ivanov AA, Beletskiy IP. Monoclonal antibody therapy — panacea or palliative? *Remedium* 2011; (3): 12–6 (in Russian).
25. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs (immunobiological medicines). V. II. Moscow: Grief and K; 2013 (in Russian).
26. Avdeeva Zhl, Soldatov AA, Alpatova NA, Medunitsyn NV, Bondarev VP, Mironov AN, et al. Preparations of next generation monoclonal antibodies (issues and prospects). *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015; (1): 21–35 (in Russian).
27. Khaitov RM, Yarilin AA, Pinegin BV. Immunology. Atlas. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. P. 302 (in Russian).
28. Sigidin YaA, Lukina GV. Biological therapy in rheumatology. Moscow: Practical Medisits; 2009 (in Russian).
29. Eliseev MS, Barskova VG, Nasonov EL. Tumor necrosis factor α (TNF α) role in the development of metabolic disturbances and atherosclerosis and TNF α antagonists influence on them in patients with rheumatic diseases. *Rheumatology Science Practice* 2009; 2: 67–73 (in Russian).
30. Kovalenko VN, Golovach IYu, Bortkevych OP. Current objectives for target treatment of rheumatoid arthritis: from monoclonal antibodies to blockers of signaling pathways molecules. *Ukrainskiy revmatologicheskiy zhurnal* 2012; 49(3): 5–14 (in Russian).
31. Tarhini AA, Iqbal F. CTLA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments. *Oncotargets Ther*. 2010; 3: 15–25.
32. Demidov LV, Kharkevich GYu, Mikhaylova IN, Petenko IN, Samoylenko IV, Utyashev IA. New trends in the treatment of patients with melanoma. *Vestnik moskovskogo onkologicheskogo obshchestva. Informatsionnyy byulleten* 2011; 9(580): 4–6 (in Russian).
33. Moiseenko VM. Options of monoclonal antibodies in the treatment of malignant tumors. *Practical oncology* 2002; 3(4): 253–61 (in Russian).
34. Protsenko GA. The prospects of rituximab usage in rheumatology. *Ukrainskiy revmatologicheskiy zhurnal* 2009; 1(35): 44–7.
35. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Eurie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(9): 2793–806.
36. Nasonov EL. Rituximab in the treatment of rheumatic diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya* 2008. Prilozhenie k № 1: 3–10 (in Russian).

37. Nasonov EL, ed. *Anti-B-cell therapy in rheumatology: a focus on rituximab*. Monograph. Moscow: IMA-PRESS; 2012 (in Russian).
38. Maddocks KJ, Lin TS. Update in the management of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2009; 2: 2–29.
39. Taylor RP, Lindorff MA. Drug insight: the mechanism of action of Rituximab in autoimmune disease—the immune complex decoy hypothesis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007; 3(2): 86–95.
40. Miroshnitskaya OA, ed. *Immunomodulators in Russia: Spravochnik*. Omsk: GP «Omskaya oblastnaya tipografiya»; 2014. V. 1 (in Russian).
41. Besova NS. Duration of therapy by Herceptin at a HER2 positive breast cancer. *Effektivnaya farmakoterapiya. Onkologiya, hematologiya i radiologiya* 2012; 1: 14–21 (in Russian).
42. Gan'shina IP, Zhukova LG, Tyurin IE. Pertuzumab — a new view on HER2-positive metastatic breast cancer. *Farmateka* 2014; (17): 52–9 (in Russian).
43. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, et al. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*. 2010; 28(7): 1138–44.
44. Jones K, Buzdar AU. Evolving novel anti-HER2 strategies. *Lancet Oncol*. 2009; 10(12): 1179–87.
45. Korman DB. Targets and mechanisms of action of antineoplastic preparations. Moscow: *Prakticheskaya meditsina* 2014. P. 150 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Alpatova NA. Chief expert of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Gaiderova LA. Head of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Yakovlev AK. Leading microbiologist of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Motuzova EV. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Allergens, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Biological Sciences.

Lysikova SL. 1st professional category expert of the Laboratory of Immunology of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Soldatov AA. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Allergens, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences.

Avdeeva ZhI. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Allergens, Cytokines and other Immunomodulators of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Проблемы оценки неопределенности методик испытаний и стандартных образцов иммунобиологических лекарственных средств

Р. А. Волкова, О. В. Фадейкина

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 23.11.2016 г. Принята к публикации 07.02.2017 г.

В статье представлены обобщенные материалы анализа нормативно-методических документов, опыта валидации аналитических методик и аттестации стандартных образцов (СО) биологических лекарственных средств, на основе которых предложен принцип оценки неопределенности методик испытания и неопределенности аттестованного значения СО для определения показателей качества биологических лекарственных средств по стандартному отклонению результатов испытаний в условиях промежуточной прецизионности/воспроизводимости. Расширенную неопределенность методики оценивали как 2 стандартных отклонения результатов испытаний образцов в условиях промежуточной прецизионности/воспроизводимости в установленном диапазоне значений определяемых величин, а неопределенность СО — как 2 стандартных отклонения результата испытаний СО в условиях промежуточной прецизионности/воспроизводимости. Поскольку в настоящее время для большинства биологических лекарственных средств СО используется в той же методике, с помощью которой он был аттестован, средством передачи единицы измерения является аналитическая система: стандартный образец и используемая методика.

Ключевые слова: неопределенность; методика; стандартный образец; биологические лекарственные средства.

Библиографическое описание: Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы оценки неопределенности методик испытаний и стандартных образцов иммунобиологических лекарственных средств. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 27–31.

В конце 20 века были принятые международные документы, вводящие новое понятие в метрологию — неопределенность, они были обновлены в 2000–2002 гг., и тогда же приняты в Российской Федерации [1, 2].

Неопределенность — параметр, связанный с результатом измерения и характеризующий разброс значений, которые могли бы быть обоснованно приписаны измеряемой величине.

Объективно установленная неопределенность является очень полезным инструментом и предоставляет 2 типа информации:

- показывает потенциальные колебания, которые надо учитывать при интерпретации полученных в лаборатории результатов;
- предоставляет возможность оценки качества результатов испытаний, проводимых в лаборатории (стабильность аналитической работы), а также позволяет оценить, какое влияние оказывают изменения, вносимые в методику.

Для того, чтобы неопределенность была объективно оценена, необходимо определить все источники неопределенности методики, которыми могут быть различные факторы [1, 2], включая:

- несовершенное описание и неполное выявление измеряемой величины;
- аппроксимации и гипотезы, используемые в методе измерения и измерительной процедуре;
- нерепрезентативность выборки, если образец неадекватно представляет измеряемую величину;
- эффекты матрицы исследуемого образца;
- субъективную погрешность оператора, например, при снятии показаний приборов;
- недостаточную чувствительность прибора;

- неопределенности значений стандартных образцов и материалов;
- неполное знание факторов окружающей среды, влияющих на измерение;
- колебания результатов повторных измерений/испытаний.

Эти источники необязательно являются независимыми. В большинстве случаев измеряемая величина не является прямо измеряемой, а зависит от других измеряемых (входных) величин, т.е. от их неопределенностей.

Целью работы является обоснование принципа оценки неопределенности методик испытаний биологических лекарственных средств и неопределенности стандартных образцов для этих испытаний.

Задача работы — анализ нормативно-методических документов по оценке неопределенности, обобщение экспериментальных материалов по оценке качества биологических лекарственных средств и аттестации соответствующих стандартных образцов.

Оценивание неопределенности методов испытаний биологических объектов не является рутинной задачей, корректность ее оценки зависит от знания природы измеряемой величины и самого процесса измерения. Информативность и польза сведений о неопределенности, которую приводят для результата измерения, в конечном счете, зависят от глубины понимания, критического анализа и полноты знаний тех, кто осуществляет оценивание ее значения.

Рекомендации и подходы для установления перечня (бюджета) конкретных источников неопределенности, а также способы их оценки [1–3] позволяют, в случае выполнения этой работы во всех лабораториях, значительно уменьшить общую неопределенность аналитических ра-

бот в конкретной сфере и тем самым улучшить согласованность результатов различных лабораторий.

При нормальном распределении результатов неопределенность выражают в форме стандартного отклонения, которое называют стандартной неопределенностью ($U_{(x)}$), и расширенной неопределенности — стандартной неопределенности, умноженной на коэффициент охвата 2, т.е. $2U_{(x)}$, при доверительной вероятности 0,95 [1, 2].

Методики испытаний биологических лекарственных средств характеризуются сложной пробоподготовкой, их следует рассматривать как эмпирические [1, 2], оценка неопределенности которых требует особого подхода, отличающегося от принципов оценки погрешности методов измерения, принятых в отечественной метрологической практике и предусматривающих суммирование систематической и случайной составляющих [4].

Опыт контроля качества биологических лекарственных средств показывает, что даже унифицированные методики, использующиеся на разных предприятиях, если используется не идентичное оборудование, реактивы, могут давать несогласованные результаты. Так, например, в свое время ретроспективный анализ результатов оценки белкового азота в межлабораторных испытаниях с участием 7 лабораторий показал недостаточную согласованность результатов [4]. Таким образом, различие в оборудовании, реактивах может обуславливать различие в результатах, сведение к минимуму этих различий позволит получать максимально согласованные результаты на межлабораторном уровне, что в свою очередь, необходимо для объективной оценки сопоставимости результатов разных лабораторий.

На практике редко оказывается возможным оценить неопределенность от всех факторов, влияющих на результат измерений, из-за ограниченности времени и трудовых ресурсов.

Поскольку большая часть источников неопределенности может проявиться при оценке воспроизводимости метода, максимально объективным способом является оценка стандартного отклонения в условиях промежуточной прецизионности/воспроизводимости [3, 4], что минимизирует потери из-за невозможности оценить систематическую составляющую неопределенности. Для получения надежных оценок неопределенности необходимо варьировать в максимально допустимой на практике степени все величины (факторы), имеющие отношение к данному измерению (результату измерения), так, чтобы оценки неопределенности были основаны на максимально возможном массиве данных.

Показатели точности (правильность и прецизионность) устанавливаются при валидации методик, для их объективной оценки важно использование терминов и подхода в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725 [7], документов трехсторонней конференции по гармонизации (ICH) [8, 9] и ГФ РФ ХШ [10]. Данный подход отличается от алгоритма, предусмотренного документами системы ГСИ [11, 12], представляющей собой систему расчетов, основанной на определении погрешности (неопределенности u_{char}) измерений по сумме систематической и случайной составляющих, а также алгоритма, предложенного в ГОСТ Р ИСО 21748 [13], в котором систематическая составляющая скрыта под терминами «смещение метода» и «смещение лаборатории».

Для биологических методов испытаний относительное стандартное отклонение при оценке прецизионности методики может превышать 20 % [14–16], для аналитических методов испытаний биологических объектов (физи-

ко-химических, иммунохимических методов) данная характеристика, как правило, находится в пределах 5–15 % [4]. В связи с этим неопределенность от способа установления аттестованного значения биологических стандартных образцов является определяющей величиной. В соответствии с рекомендациями IUPAC [3] по валидации аналитических методик и опытом аттестации стандартных образцов биологических препаратов [4, 14–17] для характеристики неопределенности методики целесообразно использовать стандартное отклонение воспроизводимости/промежуточной прецизионности.

Предложенный нами алгоритм оценки прецизионности методики: получение независимых результатов с использованием не менее 3 зашифрованных образцов в необходимом диапазоне концентраций и не менее, чем трехкратное повторение анализа (оптимально — пятикратное), — позволяет обеспечить достаточно объективную оценку показателя [4–6, 18] и использовать расширенную неопределенность для оценки стабильности аналитической работы.

Хорошо спланированный эксперимент в значительной степени способен содействовать надежному оцениванию неопределенности и является важной частью искусства измерения.

Учитывая вышеизложенное в настоящее время основной проблемой и соответственно задачей объективной оценки показателей точности, а, следовательно, и неопределенности методики является построение математической модели испытания, максимально полно учитывающей все влияющие факторы. Правильное планирование эксперимента по оценке прецизионности позволяет оценить достаточно всесторонние факторы, влияющие на результаты анализа. Математическое моделирование испытаний требует привлечения к этой работе специалиста, владеющего знаниями в области метрологии, математики и статистики [6]. Испытания можно и нужно моделировать математически до такой степени, которую допускает требуемая точность испытания. Особенно это касается методик определения критических показателей качества — показателей, связанных с эффективностью и безопасностью лекарственных средств.

Для оценки качества биологических лекарственных препаратов, в том числе иммунобиологических (например, вакцины, анатоксины), биотехнологических (например, цитокины, интерфероны) и препаратов крови применяют стандартные образцы (далее — биологические СО) различных категорий [19]. Основными аттестуемыми характеристиками биологических СО являются специфическая активность, содержание антител, титр или концентрация бактерий, вирусов, активного или иного компонента, которые выражают во внеклеточных единицах или условных Международных единицах (МЕ), а не в единицах системы СИ [20], а также их неопределенность — параметр, характеризующий рассеяние значений, которые могли бы быть обоснованно приписаны аттестуемой характеристике стандартного образца [11, 12].

В соответствии с нормативными документами [11, 12], источниками неопределенности аттестованного значения стандартного образца являются:

- способ установления (характеризации) (u_{char}) аттестованного значения СО (используемая методика измерений/испытаний, международный стандартный образец);
- неоднородность материала СО (u_h);
- нестабильность значений аттестуемой характеристики СО (u_{stab}).

Как показал анализ процедуры аттестации биологических СО, воспроизвести в полном объеме алгоритм расчета неопределенности результатов испытаний, рекомендуемый в документах системы ГСИ [11, 12], не представляется возможным по некоторым причинам.

1. Отсутствие эталонной базы (например, такой, как эталон длины) не позволяет установить систематическую составляющую погрешности методики в соответствии с РМГ 93-2009 [12]. Данный документ предписывает оценку неопределенности от способа характеристизации (т.е. методики определения, включая сумму систематической и случайной составляющей). Показатели прецизионности методик испытаний для биологических лекарственных средств могут быть установлены, но оценка правильности является принципиальной проблемой из-за отсутствия эталонной базы [4, 5, 17, 18, 21–24].

2. Оценивание неопределенности, связанной с использованием стандартных образцов, как требует РМГ 93-2009 [12], также невозможно, поскольку указанные стандартные образцы (прежде всего международные стандартные или референс-образцы ВОЗ) в настоящее время выпускают без указания неопределенности [24].

Дополнительными проблемами являются следующие факторы:

- ограниченное количество лабораторий (например, две), владеющих методом и способных принять участие в процедуре аттестации;

- отсутствие нормального распределения результатов, что характерно для отдельных методик контроля биологических лекарственных средств, и требует использования непараметрических статистических критериев для оценки результатов.

В то же время анализ процедуры аттестации биологических СО показал, что при оценивании неопределенности биологических СО двумя из трех ее составляющих можно пренебречь [24]:

- неопределенностью от нестабильности, поскольку в большинстве случаев в качестве кандидата в СО используется коммерческий препарат, стабильность которого в течение определенного срока (срока годности) доказана, в связи с чем, составляющую от нестабильности можно принять равной нулю;

- неопределенностью от неоднородности u_h , поскольку она, как правило, значительно меньше, чем значение неопределенности методики u_{char} , что позволяет ее не учитывать: для жидких препаратов неопределенность от неоднородности практически равна 0, а в случае лиофилизованных препаратов неоднородность косвенно характеризуется точностью розлива, коэффициент вариации на стадии розлива не должен превышать 1 %, а при оценке средней массы СО в емкости после лиофилизации и запайки, как правило, не должен превышать 2 %, что значительно меньше u_{char} .

Для расчета неопределенности при доверительной вероятности $P \geq 0,95$ значение коэффициента охвата k следует принять равным 2 (при условии нормальности закона распределения результатов измерений) [1, 2]. Учитывая вышеизложенное, общая формула расчета расширенной неопределенности $U_p = k\sqrt{u_{char}^2 + u_h^2 + u_{stab}^2}$ [11] для биологического СО принимает вид: $U_p = 2\sqrt{u_{char}^2}$, а поскольку u_{char} мы предлагаем оценивать не по сумме систематической и случайной составляющей, а по стандартному отклонению (S) результатов испытаний в условиях воспроизводимости или промежуточной прецизионности [4, 21, 23] формула приобретает вид $U_p = 2\sqrt{S^2} = 2S$. Таким образом, неопре-

деленность биологического СО соответствует неопределенности методики, которая используется для установления его аттестованного значения. При отсутствии сведений о неопределенности методики, неопределенность СО оценивают по стандартному отклонению (S_{co}) результатов испытаний СО в условиях воспроизводимости или промежуточной прецизионности [24], т.е. при одной конкретной концентрации образца. Формула приобретает вид $U_p = 2\sqrt{S_{co}^2} = 2S_{co}$. Значение неопределенности СО со-поставимо со значением неопределенности методики, если прецизионность методики не зависит от концентрации определяемого вещества. В связи с этим при анализе лекарственных средств, и прежде всего биологических, средством передачи единицы измерения становится не только стандартный образец, но и сама аналитическая методика, в которой он используется [4–6, 17].

В случае несоответствия вида распределения результатов испытаний нормальному в каждом конкретном случае необходим индивидуальный подход.

Приведенный выше общий принцип расчета расширенной неопределенности использован при аттестации ряда отраслевых стандартных образцов, предназначенных для оценки биологической активности [14–16]. Неопределенность аттестованного значения для стандартных образцов активности, рассчитанная вышеуказанным способом, превышает 20 %. Высокое значение неопределенности характерно для методов испытаний биологических объектов и объясняется, прежде всего, вариабельностью основных биологических компонентов методики: культуры клеток, питательных сред, вируса-индикатора и др. и ставит задачу дальнейшей стандартизации условий испытаний.

Таким образом, разработанный методический подход на основе отечественной метрологической базы и международных рекомендаций с учетом особенности биологических СО показал, что оценка неопределенности методики испытаний биологических лекарственных средств и неопределенности соответствующих стандартных образцов возможна по стандартному отклонению результатов испытаний в условиях промежуточной прецизионности/воспроизводимости.

Средством передачи единицы измерения для биологических лекарственных средств является аналитическая система: стандартный образец и методика, в которой он используется, неопределенность стандартного образца представляет собой неопределенность результатов испытаний стандартного образца в условиях промежуточной прецизионности/воспроизводимости.

Литература

1. EURACHEM/CITAC Guide, 2000. Quantifying uncertainty in analytical measurement. EURACHEM 2000 second edition.
2. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК. Количествоное описание неопределенности в аналитических измерениях. СПб.: ВНИИМ им. Д. И. Менделеева; 2002.
3. IUPAC 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of analysis methods. Pure Appl Chem. 2000; 74(5): 835–55.
4. Волкова РА. Система контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов химическими и иммунохимическими методами: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: 2009.
5. Волкова РА. Методики контроля или методики испытаний — к вопросу о метрологическом обеспечении аналитических методик. Справочник заведующего КДЛ 2013; (4): 4–9.
6. Гринэ ММ, Конакова ТМ, Волкова РА, Фролова ГЕ. Валидация количественных аналитических методик. Опыт применения концепции международного стандарта ИСО 4259 в ис-

- следовании метрологических возможностей методики определения химических показателей иммунобиологических препаратов. В кн.: Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней. Сборник тезисов науч.-практ. конф. М.: 2006. С. 36–37.
7. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. М.: Госстандарт России; 2002.
 8. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures. ICH-Q2A. 1994.
 9. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: Methodology. ICH-Q2B. 1996.
 10. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд., Т. 1, 2: М. Available from: <http://193.232.7.107/feml>.
 11. ГОСТ Р 8.694-2010 (ISO Guide 35:2006, MOD) ГСИ. Стандартные образцы материалов (веществ). Общие и статистические принципы определения метрологических характеристик стандартных образцов. М.: Стандартинформ; 2012.
 12. РМГ 93-2009 ГСИ. Оценивание метрологических характеристик стандартных образцов. М.: Стандартинформ; 2009.
 13. ГОСТ Р ИСО 21748-2012. Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений. М.: Стандартинформ; 2014.
 14. Гайдерова ЛА, Никитина ТН, Фадейкина ОВ, Байкова МЛ, Устинникова ОБ, Климов ВИ, Шведов ДВ. Аттестация отраслевого стандартного образца активности лейкоцитарного интерферона альфа типа. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2014; (2): 31–6.
 15. Юнасова ТН, Шитикова ЮЮ, Фадейкина ОВ, Ильясова ТН, Устинникова ОБ, Волкова РА, Мовсесянц АА и др. Аттестация новой серии отраслевого стандартного образца активности живой коревой вакцины. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2014; (3): 40–5.
 16. Сагина ЛВ, Комратов АВ, Храмов МВ, Торопчин МИ, Фадейкина ОВ, Волкова РА и др. Аттестация отраслевого стандартного образца сыворотки бруцеллезной диагностиче-
 - ской поливалентной для реакции агглютинации. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2014; (4): 42–7.
 17. Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013; (2): 28–32.
 18. Волкова РА, Бектимиров ТА. Валидация методов контроля микробиологических препаратов. Фармация 2008; (5): 12–5.
 19. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Мовсесянц АА, Борисевич ИВ. Опыт Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича по разработке и аттестации медицинских иммунобиологических препаратов. Стандартные образцы 2011; (4): 17–21.
 20. Борисевич ИВ, Петухов ВГ, Волкова РА, Устинникова ОБ, Фадейкина ОВ, Малкова ВИ. Стандартные образцы как средство метрологического обеспечения аналитических методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2010; (4): 8–10.
 21. Волкова РА. Проблемы метрологического обеспечения методик оценки качества иммунобиологических препаратов. В кн.: I Международная конференция «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». Сборник трудов. Ч. 1. Екатеринбург; 2013. С. 88–90.
 22. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Борисевич ИВ, Мовсесянц АА, Бондарев ВП. Оценка состояния проблемы аттестации и применения отраслевых стандартных образцов медицинских иммунобиологических препаратов. Стандартные образцы 2013; (3): 58–61.
 23. Фадейкина ОВ, Волкова РА, Борисевич ИВ. Проблемы оценки неопределенности аттестованных характеристик стандартных образцов для оценки качества биологических лекарственных препаратов. В кн.: II Международная научная конференция «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». Сборник трудов. Екатеринбург; 2015. С. 80–2.
 24. Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы оценки неопределенности методик испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов. В кн.: II Международная научная конференция «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». Сборник трудов. Екатеринбург; 2015. С. 106–7.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук.

Фадейкина Ольга Васильевна. Главный технолог Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Волкова Рауза Асхатовна; volkova@expmed.ru

Estimation of uncertainty of test methods and reference standards used for immunobiological medicines

R. A. Volkova, O. V. Fadeikina

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The article summarises the results of analysis of guidelines and regulations as well as experience in validation of analytical methods and certification of reference standards (RS) of biological medicinal products. Based on the results of the analysis the authors propose an approach to estimation of test methods and reference standards uncertainty to determine biological quality parameters in the context of intermediate precision/reproducibility. Expanded uncertainty of the test method was estimated as 2 standard deviations of the test results in the context of intermediate precision/reproducibility for the predetermined range of the tested parameters, and the uncertainty of the reference standards — as 2 standard deviations of the test results for the reference standards in the context of intermediate precision/reproducibility. Since reference standards for most biologicals are currently tested by the same method by which they were certified, an analytical system (a reference standard and a test method) is used as a means of measurement units representation.

Key words: uncertainty; test method; reference standard; biological medicinal products.

For citation: Volkova RA, Fadeikina OV. Estimation of uncertainty of test methods and reference standards used for immunobiological medicines. BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2017; 17(1): 27–31.

References

1. EURACHEM/CITAC Guide, 2000. Quantifying uncertainty in analytical measurement. EURACHEM 2000 second edition.
2. Guideline of Eurachem/CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. St. Petersburg: D. I. Mendeleev VNIIM; 2002 (in Russian).
3. IUPAC 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of analysis methods. Pure Appl Chem. 2000; 74(74): 835–55.
4. Volkova RA. Quality control of medical immunobiological preparations of chemical and immunochemical methods. Dr. Biol. Sci [thesis]. Moscow; 2009 (in Russian).
5. Volkova RA. Methods of control or testing procedures — the issue of metrological support of analytical methods. The Guide of a chief of Clinical Diagnostic Laboratory 2013; (4): 4–9 (in Russian).
6. Greneae MM, Konakova TM, Volkova RA, Frolova GE. Validation of quantitative analytical methods. The experience of using the concept of ISO international standard 4259 in the study of metrology features methods for determining chemical parameters of immunobiological preparations. In: Vaccinology 2006. Improving immunobiological preparations for prophylaxis, diagnostics and treatment of infectious diseases: collection of abstracts of research and practice conference. Proceedings. Moscow; 2006. P. 36–37. (in Russian).
7. State Standard R ISO 5725-1–2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1. General principles and definition. Moscow: Gosstandart Rossii; 2002 (in Russian).
8. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures. ICH-Q2A. 1994.
9. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: Methodology. ICH-Q2B. 1996.
10. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1, 2. Moscow; 2015. Available from: <http://193.232.7.107/feml> (in Russian).
11. State Standard R 8.694–2010 (ISO Guide 35:2006, MOD) GSI. Standard samples of materials (substances). General and statistical principles for determining the metrological characteristics of reference materials. Moscow: Standartinform; 2012 (in Russian).
12. State Standard RMG 93–2009 GSI. Estimation of metrological characteristics of reference materials. Moscow: Standartinform; 2009 (in Russian).
13. State Standard R ISO 21748–2012. Statistical methods. Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation (IDT). Moscow: Standartinform; 2014 (in Russian).
14. Gaiderova LA, Nikitina TN, Fadeikina OV, Baikova ML, Ustinnikova OB, Klimov VI, Shvedov DV. Evaluation of branch reference standard of leucocyte interferon alpha activity. Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2014; (2): 31–36 (in Russian).
15. Yunasova TN, Shitikova OYu, Fadeykina OV, Sidorenko ES, Sukhanova LL, Ilyasova TN, et al. Evaluation of a new series of branch reference standard of live measles vaccine activity. Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2014; (3): 40–5 (in Russian).
16. Sayapina LV, Komratov AV, Hramov MV, Toropchin MI, Fadeykina OV, Volkova RA, et al. Certification of branch reference material serum sample for brucellosis diagnostic polyvalent agglutination. Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2014; (4): 42–7 (in Russian).
17. Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeykina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2013; (2): 28–32 (in Russian).
18. Volkova RA, Bektimirov TA. Validation of methods controlling microbiologicals. Farmatsiya 2008; (5): 12–15 (in Russian).
19. Volkova RA, Fadeykina OV, Movsesyants AA, Borisevich IV. The experience of L. A. Tarasevich State Scientific Research Institute for Standardization and Control of Medical and Biological Products in the development and certification of certified reference materials of medical immunobiological products. Reference Materials 2011; (4): 17–21 (in Russian).
20. Borisevich IV, Petukhov VG, Volkova RA, Ustinnikova OB, Fadeykina OV, Malkova VI. Standard samples as a tool to provide metrology of analytical methods of immunobiological medicines (IM) monitoring. Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2010; (4): 8–10. (in Russian).
21. Volkova RA. Problems of metrological support of quality assessment methods of immunobiological drugs. In: I International Conference «Reference materials and measurement technology». Proceedings. Part 1. Ekaterinburg; 2013. P. 88–90 (in Russian).
22. Volkova RA, Fadeykina OV, Borisevich IV, Movsesyants AA, Bondarev VP. Assessment of the current state of certification and use of branch reference materials of medical immunobiological preparations. Reference Materials 2013; (3): 58–61 (in Russian).
23. Fadeykina OV, Volkova RA, Borisevich IV. Evaluation of uncertainty of certified characteristics of reference standards for biologicals quality assessment. In: II International Conference «Reference materials and measurement technology». Proceedings. Ekaterinburg; 2015. P. 80–82 (in Russian).
24. Volkova RA, Fadeykina OV. The issues of estimating the uncertainty of testing methods for immunobiological preparations. In: II International Conference «Reference materials and measurement technology». Proceedings. Ekaterinburg; 2015. P. 106–107 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.
Volkova RA. Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Biological Sciences.
Fadeikina OV. Chief technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Сравнительный анализ требований к качеству гетерологичных сывороточных препаратов в фармакопеях ведущих стран — производителей лекарственных средств

О. В. Перельгина, Е. И. Комаровская

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 21.12.2016 г. Принята к публикации 07.02.2017 г.

Проведен сравнительный анализ требований к гетерологичным сывороточным препаратам ведущих фармакопей мира: США, Великобритании, Европейской, Японской и Российской. Установлено, что номенклатура противобактериальных и противовирусных гетерологичных сывороточных препаратов, выпускаемых в США, Европейском регионе и Японии, отличается от российской. В зарубежных странах для профилактики и лечения некоторых инфекционных заболеваний в основном используют иммуноглобулины человека, для профилактики других инфекций, например, сибирской язвы, применяется только вакцинопрофилактика. Тем не менее, гетерологичные антитоксические сывороточные препараты до сих пор применяются в клинической практике во всем мире. Номенклатура данных лекарственных средств аналогична во всех странах. Некоторые из данных лекарственных средств внесены ВОЗ в Перечень основных лекарственных средств. На основании проведенного анализа установлено, что отечественные антитоксические сывороточные препараты по безопасности и эффективности не уступают зарубежным аналогам. Более полная характеристика качества отечественных препаратов будет полезна для гармонизации требований, предъявляемых к таким препаратам отечественной и зарубежными фармакопеями, а также даст возможность вывести препараты на зарубежный рынок.

Ключевые слова: гипериммунные сыворотки; гетерологичные иммуноглобулины; антитоксические сыворотки; антигеном; фармакопея; гармонизация; специфическая активность.

Библиографическое описание: Перельгина ОВ, Комаровская ЕИ. Сравнительный анализ требований к качеству гетерологичных сывороточных препаратов в фармакопеях ведущих стран – производителей лекарственных средств. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 32–40.

В настоящее время во всем мире к любому лекарственному препарату (ЛП) предъявляются требования эффективности, безопасности и гарантии качества на протяжении всего срока годности препарата.

Показатели качества иммунобиологических ЛП (ИЛП) и методики определения каждого показателя содержатся в нормативной документации, являющейся государственным стандартом качества ЛП, и представлены в виде фармакопейной статьи (ФС). Фармакопейные требования установлены таким образом, что их соблюдение обеспечивает качество ЛП, его эффективность и безопасность. Требования фармакопеи обязательны для всех организаций стандартизующих, изготавливающих и контролирующих ЛП на соответствующей территории.

С началом и развитием процесса глобализации встал вопрос о гармонизации требований, предъявляемых к лекарственным средствам (ЛС), поскольку субстанции, произведенные в одной стране, могут использоваться в других странах для изготовления ЛС, которое, в свою очередь, экспортируется в другие регионы. Поэтому очевидно, что для обеспечения качества, эффективности и безопасности ЛС необходимо следовать единым стандартам.

С целью гармонизации созданы международные объединения, одним из которых является Фармакопейная дискуссионная группа (PDG), осуществляющая гармонизацию требований European Pharmacopoeia (EP), United States Pharmacopeia (USP), British Pharmacopoeia (BP) и Japanese Pharmacopoeia (JP) [1, 2]. Следовательно, существует необходимость изучения современного зарубежного опыта регистрации ИЛП с целью гармонизации научных

подходов к подтверждению качества, безопасности и эффективности российских препаратов с аналогичными зарубежными. В нашей стране разработана Концепция гармонизации фармакопей государств-членов Евразийского экономического союза [3]. Ведущая роль в процессе гармонизации отведена Федеральному государственному бюджетному учреждению «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России). В настоящее время Центр фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России активно взаимодействует с ведущими зарубежными фармакопеями (Международной, Европейской, Британской, Японской фармакопеями, Фармакопеей США).

С 1 января 2016 г. в Российской Федерации введена в действие Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания (ГФ РФ XIII) [4], в которой охвачен весь спектр ЛП и современных методов оценки их качественных характеристик. В России производится значительное количество гетерологичных сывороточных препаратов, гармонизация требований к их качеству является необходимой [5]. Проблема является актуальной также и потому, что возникает вопрос о необходимости выпускать антитоксические сыворотки животного происхождения, в то время как в мире необходимость производства данных препаратов не только не ставится под сомнение, но и совершенствуются технологии производства и проводятся клинические исследования препаратов, созданных по новой технологии [6, 7]. Гетерологичные сыворотки и имму-

ноглобулины до сих пор находят клиническое применение, особенно в качестве метода экстренной терапии и также применяются в комплексе с другими методами лечения некоторых инфекционных болезней и укусов ядовитых животных. Особое внимание в мире уделяется препаратам, включенным ВОЗ в Список медикаментов первой необходимости (WHO Essential Medicines List). В Список включены такие гетерологические сыворотки, как дифтерийный антитоксин и антивеномы (препараты против ядов змей, пауков, скорпионов) [8]. По мнению ВОЗ, необходимо создавать поливалентные препараты (антивеномы), учитывая региональные особенности каждой страны, а также изучая перекрестный иммунитет не только на животных, но также включая в исследования людей, укушенных змеями.

ВОЗ отмечает, что медикаменты, включенные в Перечень основных лекарственных средств, должны быть доступны работающей системе здравоохранения во все время в достаточном количестве, в подходящих лекарственных формах, в надлежащем качестве и с ценой, приемлемой для физических лиц и общественных организаций [9].

Несмотря на то, что необходимость производства данных препаратов не ставится под сомнение, в мире отмечается дефицит антитоксических сывороток в связи с прекращением производства в нескольких странах, низкой экономической рентабельностью и высокими требованиями регуляторных органов по безопасному производству медицинских препаратов из крови [10].

В настоящее время в России зарегистрировано 15 наименований гетерологических препаратов крови (специфичных антитоксических сывороток, антибактериальных и противовирусных иммуноглобулинов и антитимоцитарных иммуноглобулинов) [11].

Восемь из них представлены специфичными антитоксическими сыворотками лошадиными жидкими российского производства: дифтерийная, столбнячная, гангризная поливалентная, ботулические типов А, В и Е, сыворотка против яда гадюки (антивеном) и сыворотка разведенная 1:100. Два наименования являются антибактериальными иммуноглобулинами: противолептоспирозный и противосибиреязвенный [12, 13], и противовирусные: антирабический (российского и украинского производства), против клещевого энцефалита.

Разработаны видоспецифичные гетерологические (из сыворотки крови лошадей) иммуноглобулины против вирусных инфекций: иммуноглобулин против Боливийской геморрагической лихорадки [14], иммуноглобулин против лихорадки Марбург [15], иммуноглобулин против лихорадки Эбола [16, 17], иммуноглобулин против лихорадки Ласса [17–19], иммуноглобулин противооспенный, иммуноглобулин против венесуэльского энцефаломиелита лошадей [20].

Наряду с отечественными сывороточными препаратами против указанных инфекций, в России зарегистрированы препараты, содержащие антитела к тимоцитам человека. Часть данных препаратов представляет собой иммуноглобулин из крови кроликов: Тимоглобулин («Genzym Europe», Нидерланды), АТГ-Фрезениус С («Fresenius Biotech», Германия), Антилимфолин (также может производиться из крови козы, Российский НИИ геронтологии, Россия). Антитимоцитарный иммуноглобулин Аттам («Pharmacia&UpJohn», США) производят из крови лошади [11].

В зарубежных странах гетерологические сывороточные препараты, представленные, в основном, антитоксинами, аналогичны некоторым препаратам российского произ-

водства (табл. 1). В качестве животных-продуцентов чаще всего используются лошади. Наряду с гетерологическими сывороточными препаратами производятся препараты из крови человека сходной специфичности.

В Европейской и Британской фармакопеях [2, 21] представлены требования к антитоксическим гетерологическим сывороткам, номенклатура которых аналогична российской. Противоботулическая и противогангризная сыворотки, выпускаемые европейскими производителями, могут быть как моновалентными, так и поливалентными. В России противоботулические сыворотки выпускают только в виде моновалентных препаратов. Противогангризная сыворотка, выпускаемая и в странах еврозоны, и в России, содержит антитела к трем видам возбудителя инфекции (*Clostridium perfringens*, *C. septicum*, *C. oedematiens (novyi)*).

Номенклатура японских антитоксических гетерологических сывороток аналогична российской и европейской [22]. Японская противоботулическая сыворотка выпускается как моно-, би-, трех- и поливалентный препарат, и наряду с антителами к трем серотипам *C. botulinum* A, B, E, может также содержать антитоксин ботулический типа F, в отличие от европейских и российских антитоксических гетерологических сывороток. Противогангризная сыворотка выпускается только поливалентной, содержит антитоксины септикум, перфингенс, эдематиенс, но может содержать антитоксин гистолитикум. В российских и европейских противогангризных препаратах антитоксин гистолитикум не содержится.

В отличие от вышеприведенных фармакопей, в США номенклатура сывороточных препаратов представлена двумя наименованиями сывороток противоботулических (бивалентной и семивалентной) и четырьмя видами антивеномов (поливалентной сывороткой против яда кроталид, сыворотками против ядов восточной коралловой змеи, скорпиона и паука черная вдова) [23]. Противоботулическая бивалентная сыворотка (содержит серотипы А и В) применяется у младенцев, в состав семивалентной сыворотки входят все известные серотипы *Clostridium botulinum*: A, B, C, D, E, F, G (к серотипам С и D человек не чувствителен) [24–29]. Оба вида сывороток выпускаются в Канаде.

Антивеномы, зарегистрированные и применяемые в США, выпускаются Bioclon Institute, Мексика. Bioclon Institute производит антивеномы с 1990 г. и в настоящее время является ведущим мировым производителем этих препаратов [30], экспортируя свою продукцию в Австралию, страны Южной Америки, Ближнего Востока, Африки и некоторые регионы Европы. Bioclon Institute разработал антивеномы «третьего поколения» [31–33], которые отличаются от других антивеномов низкой реактогенностью, что подтверждено клинические исследования [34]. Достигнуто это путем изменения процесса очистки F(ab')₂-фрагмента. В связи с этим Bioclon Institute ввел новый термин, вместо «серотерапия» (serotherapy) — «фаботерапия» («fabotherapy») и, соответственно, свои препараты называют не «антивеномы», а «fabotherapic».

До 1996 г. на территории США компанией «Connaught Laboratories» производилась сыворотка противодифтерийная. В 1997 году компания вошла в состав «Pasteur Méruieux», ее производство было переведено во Францию и другие европейские страны. В 2002 году «Pasteur Méruieux» закрыл производство противодифтерийной сыворотки. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) в США не нашел лицензированного производителя на тер-

ритории США, поэтому, при необходимости, противодифтерийная сыворотка изыскивается из альтернативных международных источников. Дифтерийный антитоксин производится в Сан Пауло (Бразилия) и доступен в США в рамках IND program (программа по исследованию новых медикаментов).

К обязательным требованиям, предъявляемым к иммунным гетерологичным сывороткам, относятся: безопасность для человека, специфическая (иммунобиологическая) активность, стерильность [35]. Сывороточные препараты не должны обладать неспецифической токсичностью (связанной с наличием в них консервантов, различных стабилизаторов, сорбентов, «наполнителей» и других компонентов), должны быть апирогенные. Отсутствие или допустимое содержание неспецифических токсических веществ в препаратах определяют химическими методами или биологической пробой на животных, особо чувствительных к определенным токсическим компонентам [36, 37].

Для получения антитоксических сывороток плазму или сыворотку иммунизированных животных подвергают очистке и концентрированию с использованием различных методов с целью получения фракции иммуноглобулинов и удаления балластных белков. Готовый продукт мо-

жет содержать стабилизаторы, консерванты, наполнители, а также вещества, использовавшиеся в процессе производства в незначительных концентрациях. В разных странах перечень этих веществ и их максимально допустимое количество варьируется. В зарубежных препаратах в качестве наполнителей и стабилизаторов применяют альбумин, глицерин, сахарозу, мальтозу, полисорбат 80. В качестве консервантов используют фенол, крезол, тиомерсал. Содержание этих веществ в конечном продукте должно соответствовать спецификации на данную сыворотку. Зарегистрированные в США антивеномы не должны содержать альбумин. По требованиям ЕФ концентрация стабилизаторов в конечном продукте должна быть в пределах 80–120 % от указанной на этикетке, консервантов — не менее минимально эффективной и не более 115 % от указанной на этикетке, содержание фенола не должно превышать 2,5 г/л. Российские требования допускают в конечном продукте наличие сульфатов (не более 0,025 %), хлоридов (от 0,85 до 0,95 %) и следовые количества хлороформа (не более 0,1 %).

В таблице 2 представлены требования к качеству гетерологичных антитоксических сывороточных препаратов Российской (ГФ РФ XIII) и ведущих мировых фармакопей.

Таблица 1. Сравнение номенклатуры российских гетерологичных антитоксических препаратов крови с зарубежными

Наименование сыворотки в фармакопеях				
Российской (ГФ РФ XIII)	Европейской	Британской	Японии	США
Противостолбнячная сыворотка (лошадиная жидккая) Tetanus antitoxin, equine	Лошадиная жидккая или лиофилизированная		Лошадиная лиофилизат	Не выпускается (вакцинопрофилактика); иммуноглобулин человеческий
Противодифтерийная сыворотка (лошадиная жидккая) Diphtheria antitoxin, equine	Лошадиная жидккая или лиофилизированная		Лошадиная лиофилизат	Не выпускается (вакцинопрофилактика)
Противогангренозная сыворотка поливалентная (противосептикум, противоперфингенс, противовэдематиенс) (лошадиная жидккая) Gas-Gangrene Antitoxin, equine	Лошадиная жидккая или лиофилизированная		Лошадиная жидккая или лиофилизированная (также может содержать противо-гистолитикум)	Не выпускается
Противоботулиническая сыворотка типа А (лошадиная жидккая)	Лошадиная жидккая или лиофилизированная		Лошадиная; также выпускается сыворотка типа F (может быть моно-, би-, три-, тетра-валентная)	Лошадиная жидккая – сыворотка бивалентная типов А, В – сыворотка семивалентная типов А, В, С, D, E, F, G
Противоботулиническая сыворотка типа В (лошадиная жидккая)	Лошадиная жидккая или лиофилизированная			
Противоботулиническая сыворотка типа Е (лошадиная жидккая) Botulinum Antitoxin, equine	Лошадиная жидккая или лиофилизированная (может быть моно-, би-, три-валентная)			
Сыворотка против яда змей (лошадиная жидккая) Viper Venom Antiserum, equine	Антivenом Лошадиная жидккая или лиофилизированная (против яда гадюк 3 видов). Может быть моно- и поливалентной		Антivenом Лошадиная лиофилизат против одного вида гадюковой змеи	Антivenом Лошадиная жидкая и лиофилизат. Против яда коралловой змеи; яда кроталид; скорпиона; паука черная вдова
Сыворотка разведенная 1:100 (лошадиная жидккая)	Не выпускается		Не выпускается	Лошадиная жидкая 1:10
Иммуноглобулин противосибиреязвенный (лошадиный жидкий)	Не выпускается (вакцинопрофилактика)		Не выпускается	Не выпускается (вакцинопрофилактика)
Иммуноглобулин антирабический (лошадиный жидкий)	Только человеческий		Не выпускается	Только человеческий

Сравнительный анализ требований к качеству гетерологических сывороточных препаратов

Таблица 2. Сравнительные требования к показателям качества антитоксических сывороточных препаратов ведущих фармакопей

Показатель	Требование фармакопеи			
	Российской Федерации (ГФ РФ XIII)	Европейской и Британской	Японской	США
Описание	Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или с желтоватым оттенком жидкость, без осадка	Жидкие — прозрачная или опалесцирующая бесцветная или желтоватая жидкости. Лioфилизат — белый или слегка желтый порошок или твердая, легко рассыпающаяся в порошок масса. После восстановления должна обладать характеристиками жидкого препарата	Лioфилизат. После восстановления бесцветная или желто-коричневая прозрачная или слегка мутно-белая жидкость	Жидкие или лиофилизированные. Должны соответствовать заявленным характеристикам для частного препарата
Прозрачность	Не выше 0,05 при E = 540 нм	Требования отсутствуют	Требования отсутствуют	Требования отсутствуют
Цветность	Не выше 0,15 при E = 400 нм	Требования отсутствуют	Требования отсутствуют	Требования отсутствуют
Механические включения	Механические включения должны отсутствовать	Требования отсутствуют	Требования отсутствуют	Требования отсутствуют
Подлинность (видоспецифичность, специфичность антител)*	Должна нейтрализовать действие токсина соответствующего типа	Подлинность определяется иммунобиологическими тестами нейтрализации и, при необходимости, по биологической активности	Тест должен сопровождаться адекватным методом для каждого антитоксина	Должна присутствовать полоса гамма-глобулина (определение методом электрофореза)
pH	От 6,8 до 7,2	Должна соответствовать заявленным характеристикам для частного препарата	6,8–7,4	Должна соответствовать заявленным характеристикам для частного препарата
Белок	От 8 до 12 %	90–110 % от заявленного или не более 100 г/л	Должен соответствовать заявленным характеристикам для частного препарата	Должен соответствовать заявленным характеристикам для частного препарата
Стерильность	Препарат должен быть стерileн	Препарат должен быть стерileн	Препарат должен быть стерileн	Препарат должен быть стерileн
Пирогенность	Должна быть апирогенной. Биологический тест на кроликах (1 мл/кг массы кролика)	Если не указано иначе, препарат должен выдерживать испытание на пирогенность. Если не указано иначе, вводят внутривенно 1 мл/кг массы кролика	Должна быть апирогенной	Должна быть апирогенной
Токсичность	Должна быть нетоксичной	Требования отсутствуют	Должна быть нетоксичной	Должна быть нетоксичной
Специфическая активность	Должна соответствовать заявленным характеристикам для частного препарата	Должна соответствовать заявленным характеристикам для частного препарата	Должна соответствовать заявленным характеристикам для частного препарата	Должна соответствовать заявленным характеристикам для частного препарата
Удельная активность	Должна соответствовать заявленным характеристикам для частного препарата	Требования отсутствуют	Требования отсутствуют	Требования отсутствуют
Чистота (полоса гамма-глобулина, метод электрофореза)	Требования отсутствуют	Должна содержать полосу гамма-глобулина (метод электрофореза в полиакриламидном геле)	Полоса иммуноглобулина не менее 95 %	В соответствии со спецификацией на данный продукт
Оsmоляльность	Требования отсутствуют	Минимум 240 мOsmоль/кг	Требования отсутствуют	В соответствии со спецификацией на данный продукт
Молекулярный состав	Требования отсутствуют	В соответствии со спецификацией на данный продукт (метод ВЭЖХ)	Требования отсутствуют	F(ab') ₂ — не менее 85 % F(ab) — не менее 7 % Посторонние иммуноглобулины — менее 5 %
Вода (для лиофилизованных препаратов)	Требования отсутствуют	Не более 3 %	Не более 3 %	В соответствии со спецификацией на данный продукт
Извлекаемый объем	В соответствии со спецификацией на данный продукт	В соответствии со спецификацией на данный продукт	В соответствии со спецификацией на данный продукт	В соответствии со спецификацией на данный продукт
Растворители и реагенты, выпускаемые в комплексте с препаратом	Сыворотка лошадиная очищенная разведенная 1:100	Не выпускаются	Не выпускаются	Сыворотка лошадиная разведенная 1:10

Требования по показателям «Извлекаемый объем», «Подлинность», «рН», «Стерильность», «Апирогенность», «Токсичность», «Специфическая активность» и «Содержа-

ние белка» предъявляются к антитоксическим сывороточным препаратам всеми производителями. Отличия существуют лишь в методике определения. Например,

Таблица 3. Сравнение требований к специфической активности гетерологичных сывороток

Наименование сыворотки	Требование по показателю «Специфическая активность»			
	ГФ РФ XIII	ЕФ/БФ	ЯФ	ФСША
Противостолбнячная	Не менее 3000 МЕ/мл**	Не менее 1000 МЕ/мл для профилактических целей; не менее 3000 для лечебных целей	Нет данных об активности	—
Противодифтерийная	Не менее 1500 МЕ/мл или 10000 МЕ/ампула	Не менее 1000 МЕ/мл, если сыворотка получена из крови лошади; не менее 500 МЕ/мл, если получена от других животных или 10000 МЕ/ампула; 20000 МЕ/ампула	Не менее 1500 ЕД/ампула	—
Противоботулиническая Типа А	Не менее 2500 МЕ/мл или 10000 МЕ/ампула	Не менее 500 МЕ/мл	Не менее 10000 ЕД/ампула	Для 7-валентной: не менее 4500 МЕ/ампула Для бивалентной: 7500 МЕ/ампула
Типа В	Не менее 600 МЕ/мл или 5000 МЕ/ампула	Не менее 500 МЕ/мл	Не менее 10000 ЕД/ампула	Для 7-валентной: не менее 3300 МЕ/ампула Для бивалентной: 5500 МЕ/ампула
Типа Е	Не менее 1200 МЕ/мл или 10000 МЕ/ампула	Не менее 500 МЕ/мл	Не менее 10000 ЕД/ампула	Не менее 5100 МЕ/ампула
Типа С	—	—	—	Не менее 3000 МЕ/ампула
Типа F	—	—	Не менее 4000 ЕД/ампула	Не менее 3000 МЕ/ампула
Типа G	—	—	—	Не менее 600 МЕ/ампула
Типа D	—	—	—	Не менее 600 МЕ/ампула
Противогангренозная	Поливалентная: Не менее 700 МЕ/мл каждого типа гангренозных антитоксинов	Поливалентная: эдематиенс — не менее 1000 МЕ/мл; перфингенс — не менее 1000 МЕ/мл; септикум — не менее 500 МЕ/мл	Для жидкого препарата: Не менее 500 ЕД каждого антитоксина (до сушки)	—
Перфингенс	—	Моновалентная: α -токсин — не менее 1500 МЕ/мл	—	—
Септикум	—	α -токсин — не менее 1500 МЕ/мл	—	—
Эдематиенс	—	α -токсин — не менее 3750 МЕ/мл	—	—
Гистолитикум	—	—	—	—
Против яда змей*	Vipera berus Не менее 150 АЕ/доза	Vipera ammodytes, Vipera aspis, Vipera ursinii. Может быть как моновалентная, так и поливалентная. Должна нейтрализовать не менее 100 LD ₅₀ (на мышах) V. ammodytes, V. aspis и не менее 50 LD ₅₀ (на мышах) других видов гадюк	Trimeresurus flavoviridis (гадюковые). Не менее 6000 ЕД для каждого летального фактора	North American rattlesnake, одна ампула содержит антитоксина: Bothrops asper не менее 780 LD ₅₀ на мышах, Crotalus durissus 790 LD ₅₀ . North American Coral Snake не менее 250 LD ₅₀ . Black Widow Spider не менее 6000 LD ₅₀ . Centruroides (Scorpion) не менее 150 LD ₅₀

* Каждая страна устанавливает свой уровень антитоксических единиц, в зависимости от вида змей, обитающих в регионе.

** Противостолбнячная сыворотка выпускается в лечебных и профилактических дозировках: 3000, 10000, 20000, 50000 МЕ/мл.

стерильность зарубежных сывороток определяют методом мембранный фильтрации, в то время как в нашей стране возможность применения этого метода изучена недостаточно.

Показатель «Подлинность», который служит для подтверждения того, что сыворотка изготовлена из крови животного, указанного на этикетке и обладает строго определенной специфичностью в отношении возбудителя инфекции. Подлинность антитоксических сывороток российского производства определяется по их способности нейтрализовывать соответствующий токсин (метод предусматривает использование животных), определение видовой специфичности этих сывороток не предусмотрено. Для большинства зарубежных антитоксиков определяют видовую принадлежность сыворотки методом электрофореза или методом двойной иммунодиффузии, иногда в комплексе с определением биологической активности.

Показатели «Прозрачность» и «Цветность», характеризующие физические свойства сывороток и позволяющие судить о качестве очистки препарата. Требования к российским сывороткам, в отличие от зарубежных, предусматривают определение степени прозрачности и цветности количественно колориметрическим методом.

Сравнительный анализ требований фармакопей демонстрирует различия в оценке чистоты и молекулярного состава препаратов. В Российской фармакопее общие требования к молекулярному составу антитоксических сывороточных препаратов не предусмотрены, тем не менее для отдельных противовирусных иммуноглобулинов данные требования разработаны. В Японской фармакопее определение этого параметра качества также не предусмотрено. Согласно ЕФ, молекулярный состав определяют методом высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), препарат должен отвечать требованиям соответствующей монографии. В Фармакопее США представлены нормы содержания $F(ab')_2$ не менее 85 %, $F(ab)$ — не менее 7 %, фрагменты — менее 5 %. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Зарубежные фармакопеи содержат требования по проведению испытаний по показателю «Чистота», который характеризуется наличием полосы гамма-глобулина при определении методом электрофореза [2]. В антитоксических сыворотках российского производства этот показатель не определяются.

В России степень очистки сывороток характеризуется величиной удельной активности, которая выражается в количестве единиц активности антитоксина на 0,1 г белка. Это расчетная величина. Для характеристики зарубежных препаратов данный показатель не предусмотрен.

Показатель «Осмоляльность» имеет существенное значение для препаратов, которые могут быть введены в организм человека в большом объеме и повлиять на изотоничность жидкостей организма. Определение осмоляльности является косвенным определением содержания солей и эксципиентов, добавленных в препарат в процессе производства. Осмоляльность плазмы крови — одна из основных констант организма человека. Снижение осмоляльности приводит к осмотическому отеку органов и тканей организма человека, в частности, к отеку мозга с развитием синдрома внутрисерпной гипертензии. Повышение осмоляльности плазмы может приводить к дегидратации головного мозга. Единицей осмоляльности является осмоль на килограмм раствора (Оsmоль/кг). В требованиях к российским и японским сывороточным препаратам величина осмоляльности не установлена.

В ЕФ и Фармакопее США требования к данному показателю определены — не ниже 240 мОсмоль/кг.

Сывороточные препараты зарубежных производителей могут выпускаться как в жидком, так и в лиофилизированном виде. Для лиофилизированных препаратов разработаны требования к показателю остаточной влажности («Вода»). Для российских антитоксических сывороток, выпускаемых только в жидком виде, предусмотрены требования к извлекаемому объему.

Принципы оценки биологической активности иммунобиологических препаратов основаны на оценке специфического эффекта, присущего данному виду препарата (табл. 3). Так, оценка активности сывороточных препаратов, содержащих готовые антитела против возбудителей инфекционных болезней или их токсинов, основана на определении концентрации специфических антител в тестах нейтрализации действия соответствующих инфекционных агентов или их токсинов.

Биологическую активность жидких препаратов характеризует содержание специфических антител в единице объема. Количество содержание антител выражают в Международных единицах (МЕ). Антивеномы являются единственными сывороточными препаратами, специфическая активность которых не нормируется международными требованиями. Это связано с различиями в антигенной структуре ядов, получаемых от одного вида ядовитых животных, обитающих в разных географических регионах. Погодные условия, тип питания и сезонность также влияют на токсичность яда.

В России выпускают сыворотку против яда гадюки обыкновенной, активность которой выражают в условных антитоксических единицах (АЕ). За 1 АЕ принято такое количество сыворотки, которое нейтрализует 3 LD₅₀ (летальных доз) яда для мышей весом 16–18 г. Одна ампула препарата содержит 150 АЕ (1 лечебная доза).

Специфическая активность сыворотки рассчитана таким образом, что одна лечебная доза способна нейтрализовать в 1,8 раза больше яда, чем может ввести змея при укусе.

В соответствии с требованиями других стран, активность антивеномов выражают количеством LD₅₀ яда для мышей, нейтрализуемых 1 мл сыворотки.

Введение гетерологичной иммунной сыворотки может сопровождаться аллергическими реакциями [38]. Для определения гиперчувствительности человека к чужеродному белку перед введением сыворотки проводят внутрикожную пробу. В России в комплекте с любой сывороткой (кроме противоядной) выпускается сыворотка разведенная 1:100. В США сыворотка разведенная (1:10) для определения сенсибилизации к лошадиному белку выпускается в комплекте с некоторыми антивеномами. В остальных случаях разведения готовят из гипериммунной сыворотки согласно инструкции на частный препарат. В Европе и Японии производство разведенной сыворотки не предусмотрено, тест на гиперчувствительность проводят согласно инструкции на частный препарат.

Поскольку в России не зарегистрированы зарубежные антитоксические сыворотки, мы не располагаем возможностью экспериментально сравнить качество гетерологичных антитоксических сывороточных препаратов различных мировых производителей. Тем не менее, сравнительный анализ требований позволяет сделать вывод, что отечественные антитоксические сывороточные препараты по безопасности и эффективности не уступают зарубежным аналогам. Вместе с тем полная харак-

теристика их качественных свойств будет полезна с целью дальнейшего повышения качества и снижения реактогенности. Только путем обеспечения соответствия отечественных ЛС требованиям мировых стандартов можно обеспечить их выход на международный фармацевтический рынок.

Таким образом, гармонизация требований Российской фармакопеи с международными требованиями может идти по пути унификации перечня показателей и методов их оценки.

Литература

1. Васильев АН, Гавришина ЕВ, Нязов РР, Снегирева АА, Адоин ВК. Введение в европейское законодательство о лекарственных средствах. Биологические лекарственные средства. Ремедиум 2013; (9): 49–54.
2. European Pharmacopoeia 9.0; 2017. Available from: <http://onlinelibrary.edqm.eu/ep900>.
3. Евразийская экономическая комиссия [официальный сайт]. Available from: <https://goo.gl/XRVXN5>.
4. Государственная фармакопея РФ. XIII изд. Т. 1–3. М.; 2015. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
5. Супотницкий МВ, Елатов АА, Борисевич ИВ, Кудашева ЭЮ, Климов ВИ, Лебединская ЕВ и др. Препараты крови человека и животных в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015; (3): 33–48.
6. Clinical Trials. A service of the U. S. National Institutes of Health [официальный сайт]. Available from: <https://goo.gl/UHcqNz>.
7. Dart RC, Seifert SA, Boyer LV, Clark RF, Hall E, McKinney P, et al. A randomized multicenter trial of crotalinae polyvalent immune Fab (ovine) antivenom for the treatment for crotaline snakebite in the United States. Arch Intern Med. 2001; 161(16): 2030–6.
8. WHO Model Lists of Essential Medicines. Geneva: WHO. [cited 2016 Oct 25] Available from: <https://goo.gl/JyoKi4>.
9. Essential medicines. WHO. Available from: <https://goo.gl/lMj0jq>.
10. Both L, White J, Mandal S, Efstratiou A. Access to diphtheria antitoxin for therapy and diagnostics. Euro Surveill. 2014; 19(24) pii: 20830. Available from: <https://goo.gl/ZsDVUy>.
11. Государственный реестр лекарственных средств. Министерство здравоохранения Российской Федерации [официальный сайт]. Available from: <http://grls.rosminzdrav.ru>.
12. Комиссаров АВ, Комоско ГВ, Лещенко АА, Луб МЮ, Пименов ЕВ, Дармов ИВ и др. Изучение процесса стерилизующей фильтрации ящерицкого противосибиреязвенного лошадиного гло-булина. Биотехнология 2002; (2): 66–74.
13. Шевцов АН, Борисевич ИВ, Дармов ИВ, Коужухов ВВ, Луб МЮ, Козлова ТН и др. Сывороточный иммунобиологический препарат для профилактики и лечения сибирской язвы. Биотехнология 2011; (1): 42.
14. Хмелев АЛ, Борисевич ИВ, Пантиюхов ВБ, Пирожков АП, Сыро-мятникова СИ, Шатохина ИВ и др. Использование морских свинок для оценки эффективности гетерологичного имму-ноглобулина против боливийской геморрагической лихорадки. Вопросы вирусологии 2009; 54(4): 42–4.
15. Борисевич ИВ, Потрысаева НВ, Мельников СА, Евсеев АА, Краснянский ВП, Максимов ВА. Получение иммуноглобулина к вирусу Марбург на основе сыворотки крови лошадей. Вопросы вирусологии 2008; 53(1): 39–41.
16. Михайлов ВВ, Борисевич ИВ, Тиманькова ГД, Краснянский ВП, Потрысаева НВ, Лебединская ЕВ, Черникова НК. Препарат, содержащий иммуноглобулин против лихорадки Эбола, из сыворотки крови лошадей, ящерицкий (иммуноглобулин Эбола). Патент Российской Федерации № 2130318 С1; 1996.
17. Борисевич ИВ, Михайлов ВВ, Хамитов РА, Краснянский ВП, Черникова НК, Евсеев АА, Миронов АН. Использование обезъян для доклинической оценки специфических средств профилактики и лечения геморрагических лихорадок Эбола и Ласса. В кн.: Организм и окружающая среда: жизнеобеспечение и за-щита человека в экстремальных условиях. Мат. российской конференции. 2000. С. 210.
18. Краснянский ВП, Градобоеев ВН, Борисевич ИВ, Потрысаева НВ, Лебединская ЕВ, Черникова НК, Тиманькова ГД. Разра-ботка и изучение свойств иммуноглобулина против лихорадки Ласса. Вопросы вирусологии 1997; 42(4): 168–71.
19. Хмелев АЛ, Борисевич ИВ, Черникова НК, Махлай АА, Михайлов ВВ, Яковлев АК и др. Оценка безопасности профилактического использования иммуноглобулинов против вирусных геморрагических лихорадок из сывороток крови лошадей. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2012; (6): 103–6.
20. Краснянский ВП, Михайлов ВВ, Лукин ЕП, Борисевич ИВ, Потрысаева НВ, Мельников СА и др. Препарат, содержащий иммуноглобулин против венесуэльского энцефаломиелита лошадей из сыворотки крови лошадей ящерицкий (иммуноглобулин лошадиный ВЭЛ). Патент Российской Федерации № 2261113 С1; 2003.
21. British Pharmacopoeia 2009. Medicines and Healthcare Product Regulatory Agency (MHRA) [GB] [официальный сайт]. Available from: <https://www.pharmacopoeia.com/>.
22. The Japanese Pharmacopoeia, 15th ed. Available from: <http://gmpua.com/Pharmacopoeia/index.html>.
23. U. S. Pharmacopeial Convention [официальный сайт]. Available from: <http://www.usp.org>.
24. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [официальный сайт]. Available from: <https://goo.gl/OSQjAP>.
25. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [официальный сайт]. Available from: <https://goo.gl/6Fd7S4>.
26. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [официальный сайт]. Available from: <https://goo.gl/ePGHji>.
27. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [официальный сайт]. Available from: <https://goo.gl/oiR4Hk>.
28. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [официальный сайт]. Available from: <https://goo.gl/RtCfS2>.
29. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [официальный сайт]. Available from: <https://goo.gl/NbKl6m>.
30. The Bioclon Institute S. A. de C. V., Maxico [официальный сайт]. Available from: <http://www.bioclon.com.mx>.
31. Paniagua-Solis JF, Mancilla R, Gonzalez C, Alagon A. From Serotherapy to Fabotherapy. J Venom Anim Toxins 2001; 7(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-79302001000200036>.
32. Sotelo N. Review of treatment and complications in 79 children with rattlesnake bite. Clin Pediatr (Phila) 2008; 47(5): 483–9.
33. Darracq MA, Cantrell FL, Klauck B, Thornton SL. A chance to cut is not always a chance to cure- fasciotomy in the treatment of rattlesnake envenomation: A retrospective poison center study. Toxicon. 2015; 101: 23–6.
34. Vazquez H, Chavez-Haro A, Garcia-Ubbelohde W, Mancilla-Nava R, Paniagua-Solis J, Alagon A, Sevcik C. Pharmacokinetics of a F(ab')2 scorpion antivenom in healthy human volunteers. Toxicon. 2005; 46(7): 797–805.
35. Борисевич ИВ, Кудашева ЭЮ, Перелыгина ОВ, Миронов АН, Меркулов ВА, Бондарев ВП и др. Состояние проблемы стандартизации специфических иммуноглобулинов и антитоксических сывороток. Медицинская иммунология 2015; 17(5): 379.
36. Бондарев ВП, Каргина ТМ, Сакянян ЕИ. К вопросу оценки качества консервантов, используемых в современной практике производства иммунобиологических лекарственных препаратов. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2015; (1): 53–8.
37. Алексеева ИА, Чупрынина РП, Перелыгина ОВ, Миронов АН. Гармонизация требований к АКДС-вакцине в проекте ФС Вакцина ноклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2013; 13(1): 36–9.
38. Колбин АС. К вопросу о нежелательных реакциях при применении биологических лекарственных средств. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2013; (3): 29–32.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российской Федерации, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Перельгина Ольга Викторовна. Начальник лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Комаровская Елена Игоревна. Эксперт 1-й категории лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Адрес для переписки: Перельгина Ольга Викторовна; Perelgina@expmed.ru

Комаровская Елена Игоревна; Komarovskaya@expmed.ru

Comparative analysis of leading pharmacopoeias requirements for the quality of heterologous serum products

O. V. Perelygina, E. I. Komarovskaya

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia.

The article is devoted to a comparative analysis of requirements to the heterologous serum products stipulated in the world leading Pharmacopoeias: the US Pharmacopoeia, the European Pharmacopoeia, the British Pharmacopoeia, the Japanese Pharmacopoeia and the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. It was revealed that the range of anti-bacterial and antiviral heterologous serum products manufactured in the USA, Europe and Japan differs from that manufactured in Russia. Prevention and treatment of some infectious diseases abroad is mainly achieved with the help of human immunoglobulins, while the prevention of other infections, such as anthrax, is only achieved by vaccination. Nevertheless, heterologous serum products are still used in clinical practice all over the world. The range of such products is the same in all countries. Some of these products are included into the WHO Essential Medicines List. The results of the analysis demonstrate that Russian antitoxic serum products are not inferior to foreign analogues in terms of safety and efficacy. A more detailed characterization of Russian products could help harmonize requirements of Russian and foreign pharmacopoeias to these products and help Russian products enter the foreign market.

Key words: hyperimmune serum; heterologous immunoglobulins; antitoxic serum; antisera; antivenom; pharmacopoeia; harmonization; specific activity.

For citation: Perelygina OV, Komarovskaya EI. Comparative analysis of leading pharmacopoeias requirements for the quality of heterologous serum products. BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2017; 17(1): 32–40.

References

1. Vasil'ev AN, Gavrilina EV, Nizajev RR, Snegireva AA, Adonin VK. Introduction to European Law. Remedium 2013; September: 49–54 (in Russian).
2. European Pharmacopoeia 9.0; 2017. Available from: <http://onlinelibrary.edqm.eu/ep900>.
3. The Eurasian Economic Commission [official site]. Available from: <https://goo.gl/XRVXN5>.
4. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition. V. 1, 2, 3. Moscow; 2015. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
5. Supotnitsky MV, Elapov AA, Borisevich IV, Kudasheva EYu, Klimov VI, Lebedinskaya EV, et al. Blood preparations of humans and animals in terms of their quality, efficacy and safety. Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2015; (3): 33–48 (in Russian).
6. Clinical Trials. A service of the U. S. National Institutes of Health [официальный сайт]. Available from: <https://goo.gl/UHcqNz>.
7. Dart RC, Seifert SA, Boyer LV, Clark RF, Hall E, McKinney P, et al. A randomized multicenter trial of crotalinae polyvalent immune Fab (ovine) antivenom for the treatment for crotaline snakebite in the United States. Arch Intern Med. 2001; 161(16): 2030–6.
8. Model Lists of Essential Medicines. WHO. Available from: <https://goo.gl/JyoKi4>.
9. Essential medicines. WHO. Available from: <https://goo.gl/IMj0jq>.
10. Both L, White J, Mandal S, Efstratiou A. Access to diphtheria antitoxin for therapy and diagnostics. Euro Surveill. 2014; 19(24) pii: 20830. Available from: <https://goo.gl/ZsDVuY>.
11. State Register of Medicines. Russian Federation Ministry of Health [official site]. Available from: <http://grls.rosminzdrav.ru> (in Russian).
12. Komissarov AV, Kosmosko GV, Leshchenko AA, Lub MYu, Pimenov EV, Darmov IV, et al. The sterilizing filtration of horse anti-anthrax liquid globulin preparation. Biotechnologiya 2002; (2): 66–74 (in Russian).
13. Shevtsov AN, Borisevich IV, Darmov IV, Kozhukhov VV, Lub MYu, Kozlova TN, et al. Serum immunobiological preparation for prophylaxis and therapy of anthrax. Biotechnologiya 2011; (1): 42–6 (in Russian).
14. Khmelev AL, Borisevich IV, Pantyukhov VB, Pirozhkov AP, Syromyatnikova SI, Shatokhina IV, et al. Use of guinea pigs to evaluate the efficacy of a heterological immunoglobulin against Bolivian hemorrhagic fever. Voprosy virusologii 2009; 54(4): 42–4 (in Russian).
15. Borisevich IV, Potryayeva NV, Melnikov SA, Yevseyev AA, Krasnyansky VP, Maksimov VA. Design of equine serum-based Marburg virus immunoglobulin. Voprosy virusologii 2008; 53(1): 39–41 (in Russian).
16. Mikhaylov VV, Borisevich IV, Timankova GD, Krasnyansky VP, Potryayeva NV, Lebedinskaya EV, Chernikova NK. The preparation containing immunoglobulin against Ebola fever from horse blood serum liquid (immunoglobulin Ebola). Patent RUS 2130318 C1; 1996 (in Russian).
17. Borisevich IV, Mikhaylov VV, Khamitov RA, Krasnyansky VP, Chernikova NK, Evseev AA, Mironov AN. Use of monkeys for the preclinical evaluation of specific means of prevention and treatment of hemorrhagic fevers Ebola and Lassa. In: Organisms and environment: Human livelihoods protection in extreme conditions. Mater. Ross. Konf. 2000. P. 210 (in Russian).
18. Krasnyansky VP, Gradoboev VN, Borisevich IV, Potryayeva NV, Lebedinskaya EV, Chernikova NK, Timankova GD. Development and study of the properties of immunoglobulin against Lassa fever. Voprosy virusologii 1997; 42(4): 168–71 (in Russian).
19. Khmelev AL, Borisevich IV, Chernikova NK, Makhlay AA, Mikhaylov VV, Yakovlev AK, et al. Evaluation of safety of prophylactic use of im-

- munoglobulins against viral hemorrhagic fevers from horse blood sera.* Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii 2012; (6): 103–6 (in Russian).
20. Krasnyansky VP, Mikhaylov VV, Lukin EP, Borisevich IV, Potryvaeva NV, Melnikov SA, et al. *The preparation containing immunoglobulin against VEE from horse blood serum liquid (immunoglobulin against VEE from horse blood serum).* Patent RUS 2261113 C1 2003 (in Russian).
 21. British Pharmacopoeia 2009. Medicines and Healthcare product Regulatory Agency (MHRA) [GB] [official site]. Available from: <https://www.pharmacopoeia.com>.
 22. The Japanese Pharmacopoeia, 15th ed. Available from: <http://gmpua.com/Pharmacopeia/index.html>.
 23. U. S. Pharmacopeial Convention [official site]. Available from: <http://www.usp.org>.
 24. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [official site]. Available from: <https://goo.gl/OSQjAP>.
 25. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [official site]. Available from: <https://goo.gl/6Fd7S4>.
 26. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [official site]. Available from: <https://goo.gl/ePGHji>.
 27. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [official site]. Available from: <https://goo.gl/oIR4Hk>.
 28. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [official site]. Available from: <https://goo.gl/RtCfS2>.
 29. U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [official site]. Available from: <https://goo.gl/NbKl6m>.
 30. The Bioclon Institute S. A. de C. V., Maxico [официальный сайт]. Available from: <http://www.bioclon.com.mx>.
 31. Paniagua-Solis JF, Mancilla R, Gonzalez C, Alagón A. From serotherapy to fabotherapy. *J Venom Anim Toxins.* 2001; 7(2) Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-79302001000200036>.
 32. Sotelo N. Review of treatment and complications in 79 children with rattlesnake bite. *Clin Pediatr (Phila).* 2008; 47(5): 483–9.
 33. Darracq MA, Cantrell FL, Klauk B, Thornton SL. A chance to cut is not always a chance to cure-fasciotomy in the treatment of rattlesnake envenomation: A retrospective poison center study. *Toxicon.* 2015; 101: 23–6.
 34. Vazquez H, Chavez-Haro A, Garcia-Ubbelohde W, Mancilla-Nava R, Paniagua-Solis J, Alagon A, Sevcik C. Pharmacokinetics of a F(ab)2 scorpion antivenom in healthy human volunteers. *Toxicon* 2005; 46: 797–805.
 35. Borisevich IV, Kudasheva EYu, Pereleygina OV, Mironov AN, Merkulov VA, Bondarev VP et al. State of the problem of standardization of specific immunoglobulins and antitoxic sera. *Meditinskaya imunologiya* 2015; 17(5): 379 (in Russian).
 36. Bondarev VP, Kargin TM, Sakanjan El. On assessment of the quality of preservatives used in modern practice production of immunobiological drugs. *Vedomosti Scientific Centre of Expertise of Medical application.* 2015; (1): 53–8 (in Russian).
 37. Alekseeva IA, Chuprynska RP, Pereleygina OV, Mironov AN. Harmonisation of requirements for the DPT vaccine in the project FA Vaccine Pertussis-DiphtheriaTetanus Toxoids Adsorbed. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2013; (1): 36–9 (in Russian).
 38. Kolbin AS. On the question of adverse reactions to administrating biological medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra eksperitisty sredstv meditsinskogo primeneniya* 2013; (3): 29–32 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.
Pereleygina OV. Head of the Laboratory of Toxoids and Antitoxic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.
Komarovskaya El. 1st professional category expert of the Laboratory of Toxoids and Antitoxic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Гетерологичные сывороточные препараты в практике современной медицины

О. В. Перелыгина, Е. И. Комаровская, А. В. Мухачева, Л. В. Саяпина,
Ю. И. Обухов, В. П. Бондарев

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*

Поступила 21.12.2016 г. Принята к публикации 07.02.2017 г.

Представлены сведения о применении гетерологичных антитоксических сывороток для лечения некоторых инфекционных заболеваний и укусов змей. Несмотря на успехи вакцинопрофилактики, в мире ежегодно регистрируются случаи дифтерии и столбняка. Нередки случаи ботулизма и газовой гангрены. Остается актуальным вопрос о лечении при укусах змей. Гетерологичные гипериммунные сыворотки преимущественно получают из крови лошадей, иммунизированных бактериальными анатоксинами или токсинами, ядами змей. Антивеномы — единственные антидоты против укусов ядовитых змей, пауков и скорпионов. Гетерологичные сыворотки и антивеномы входят в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств в России и Перечень основных лекарственных средств ВОЗ. Необходимо совершенствовать работу в области стандартизации единых подходов к обоснованию требований к качеству вновь регистрируемых и находящихся в обращении на территории Российской Федерации препаратов специфических иммуноглобулинов и антитоксических сывороток для обеспечения учреждений здравоохранения эффективными и безопасными средствами экстренной специфической профилактики и лечения инфекционных заболеваний и поражений токсинами.

Ключевые слова: гипериммунные сыворотки; гетерологичные иммуноглобулины; антитоксические сыворотки; антивеном; антитоксин; токсикоинфекция; дифтерия; ботулизм; столбняк; газовая гангрена; укус змеи.

Библиографическое описание: Перелыгина ОВ, Комаровская ЕИ, Мухачева АВ, Саяпина ЛВ, Обухов ЮИ, Бондарев ВП. Гетерологичные сывороточные препараты в практике современной медицины. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 41–47.

Гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины (далее — сыворотки) представляют собой лекарственные средства, содержащие очищенные иммуноглобулины и/или их фрагменты, полученные из сыворотки или плазмы животных различных видов, иммунизированных соответствующими антигенами. История применения гетерологичных сывороток в России насчитывает уже более 100 лет, начиная с применения препаратов, представляющих собой малоочищенный цельный иммуноглобулин лошади до создания современного продукта, содержащего очищенный комплекс биологически активных фрагментов иммуноглобулина. Препараты гетерологичных иммуноглобулинов и сывороток на протяжении многих лет используются в комплексной терапии ряда инфекционных заболеваний, а также в качестве средства экстренной профилактики.

По направленности действия относительно возбудителей заболеваний сыворотки могут быть антибактериальными, противовирусными или антитоксическими. Особое место занимают сыворотки против Т-лимфоцитов человека, которые применяют для профилактики оттор-

жения трансплантата при пересадке органов и лечения апластической анемии (табл. 1).

В Российской Федерации зарегистрировано более 10 наименований гетерологичных иммуноглобулинов и сывороток против различных бактериальных и вирусных инфекций [1].

Наиболее часто используемым из противовирусных препаратов является иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Современные данные о распространении бешенства в мире и Российской Федерации за последнее десятилетие свидетельствуют о неблагоприятной эпидемиологической ситуации [2, 3]. В России помочь при укусе бешеными или подозрительными на бешенство животными получают с применением антирабического иммуноглобулина в комбинации с антирабической вакциной для профилактики заболевания людей бешенством. В США и ЕС применяют иммуноглобулин антирабический человеческий.

Из гетерологичных противовирусных препаратов из сыворотки крови лошадей ранее в СССР и в России были разработаны: иммуноглобулин противооспенный, имму-

Таблица 1. Антитимоцитарные сыворотки, зарегистрированные в России

Название препарата (видовая принадлежность)	Производитель
Тимоглобулин® (кроличий иммуноглобулин)	«Джензайм Европа Б. В.», Нидерланды
Антилимфолин (коэзий или кроличий)	ФГУ «Российский геронтологический научно-клинический центр» Минздрава России
Атгам (лошадиный иммуноглобулин)	«Фармация и Апджон Кампани», США
АТГ-Фрезениус С (кроличий иммуноглобулин)	«Фрезениус Биотех ГмбХ», Германия

ноглобулин против Боливийской геморрагической лихорадки, иммуноглобулин против лихорадки Марбург, иммуноглобулин против лихорадки Эбола, иммуноглобулин против лихорадки Ласса, иммуноглобулин против японского энцефалита, иммуноглобулин против Венесуэльского энцефаломиелита лошадей (табл. 2), предназначенные для использования в особых ситуациях [4–11].

Несмотря на то, что в терапии инфекционных заболеваний достигнуты значительные успехи, гетерологичные сывороточные препараты в ряде случаев не потеряли своей актуальности. Антибактериальные сыворотки наиболее активно использовали до эры антибиотиков, гетерологичные сыворотки и иммуноглобулины в настоящее время применяют в комплексе мер экстренной профилактики и терапии при ряде инфекционных заболеваний и укусах змей и насекомых. Особое внимание в мире уделяется препаратам, включенным ВОЗ в Перечень основных лекарственных средств (WHO Model List of Essential Medicines) [12]. Из гетерологичных препаратов крови в Перечень включен дифтерийный антитоксин и антивеномы (препараты против ядов змей, пауков, скорпионов). ВОЗ отмечает, что медикаменты, включенные в национальные Перечни, предназначены для того, чтобы быть доступными учреждениям здравоохранения постоянно в достаточном количестве, в подходящих лекарственных формах, в надлежащем качестве и с ценой, приемлемой и физическим лицам, и общественным организациям [13]. В Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения в России, ежегодно утверждаемый распоряжением Правительства Российской Федерации, включены все специфичные антитоксические гетерологичные сыворотки российского производства: противодифтерийная, противостолбнячная, противогангренозная поливалентная, противоботулинические типов А, В и Е, сыворотка против яда гадюки (антivenом) [14].

В России зарегистрированы антибактериальные иммуноглобулины — иммуноглобулин противолептоспирозный из сыворотки крови волов и иммуноглобулин противосибиреязвенный из сыворотки крови лошади [15–18].

На основании анализа данных о препаратах, регулярно проходящих сертификационные испытания, можно сделать вывод, что препараты антитоксических сывороток применяются и в настоящее время, несмотря на успехи антибактериальной терапии с использованием новейших фармацевтических противобактериальных лекарственных средств и стандартов лечения.

Тем не менее, выпуск таких антитоксических сывороток, как противоботулинические типов А, В, Е, противоган-

гренозная поливалентная и противодифтерийная в настоящее время снизился.

Наибольшее применение в настоящее время в России находит сыворотка противостолбнячная, которая широко применяется при экстренной специфической профилактике и лечении столбняка. По официальным данным Росздравнадзора в России ежегодно регистрируются несколько случаев столбняка. В литературе описаны случаи заболевания детей в возрасте до 3 лет. Дети не были вакцинированы по причине медицинского отвода. Для специфической терапии применяют человеческий противостолбнячный иммуноглобулин и противостолбнячную сыворотку лошадиную.

Заболеваемость столбняком в европейском регионе за последние 5 лет составила менее 0,03 на 100000 населения. Некоторые случаи имели летальный исход. Основная группа заболевших — люди пенсионного возраста (65 лет и старше), а также наркоманы, употребляющие наркотики путем внутривенной или внутримышечной инъекции. Для лечения столбняка в ЕС применяют человеческий противостолбнячный иммуноглобулин. Но данный препарат не проникает через гематоэнцефалический барьер, доказана его неэффективность при интрапекальном введении [19, 20].

Одной из наиболее тяжелых бактериальных токсико-инфекций является ботулизм, который даже при использовании современных методов терапии нередко является причиной смерти пациентов. В России ежегодно регистрируются 400–500 случаев заболевания людей, употреблявших продукты, содержащие ботулотоксин. По данным Роспотребнадзора летальность среди больных в настоящее время составляет 15–30 % [21, 22]. Следует отметить, что наряду с патогенетическим и симптоматическим лечением, важная роль принадлежит противоботулинической сыворотке (лошадиной), способной нейтрализовать ботулинические токсины. В ЕС уровень заболеваемости ботулизмом составляет около 200 случаев в год (0,03 случая на 100000 населения). В некоторых европейских странах и Великобритании встречаются случаи раневого ботулизма среди наркоманов, употребляющих наркотики путем внутривенной или внутримышечной инъекции. Случаи детского ботулизма крайне редки. Для лечения ботулизма в комплексе с другими методами лечения применяется ботулинический антитоксин (лошадиный), который, несмотря на возможные побочные эффекты, сокращает длительность заболевания и снижает летальность [23].

В руководствах FDA США и EMA для лечения и профилактики ботулизма рекомендовано применение нескольких гетерологичных сывороток (бивалентный антитоксин BAT-AB и моновалентный антитоксин BAT-E, «Sanofi

Таблица 2. Разработанные отечественные противовирусные иммуноглобулины из сыворотки крови лошадей

Название препарата	Разработчик
Иммуноглобулин против лихорадки Эбола	ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
Иммуноглобулин противооспенный	ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
Иммуноглобулин против лихорадки Ласса	ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
Иммуноглобулин против Боливийской геморрагической лихорадки	ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
Иммуноглобулин против лихорадки Марбург	ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России
Иммуноглобулин антирабический	Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»; Харьковское предприятие по производству иммунобиологических и лекарственных препаратов «Биолек»

Pasteur Ltd.»; гептавалентный антитоксин НВАТ, «Сан-гене», США) [24, 25].

Серьезную проблему представляет проведение профилактических и лечебных мероприятий при развитии раневых инфекций, в том числе газовой гангрены. Поскольку частота развития таких осложнений, как раневая инфекция зависит, прежде всего, от характера ранения, сроков и качества оказания хирургической помощи, заболеваемость газовой гангреной регистрируется в основном в военное время. Вместе с тем известно, что и в мирное время причинами заболевания газовой гангреной могут быть травмы различного характера, осложнения после хирургических вмешательств, в частности трансплантационных операций, а иногда и внутримышечные инъекции [26]. В США ежегодно регистрируется приблизительно 3000 случаев в год. В эпидемиологических отчетах приведены случаи газовой гангрены по всему миру. В ЕС случаи этого заболевания зафиксированы среди инъекционных наркоманов. Среди пострадавших в результате стихийных бедствий также наблюдаются случаи инфицирования ран с дальнейшим развитием газовой гангрены. Современные методы лечения этого заболевания в США и ЕС включают антибиотикотерапию, хирургическую обработку очага инфекции, гипербарическую оксигенацию [27, 28].

Тем не менее, развитие современной хирургии, в том числе военно-полевой, ее высокая мобильность и наличие современных материалов и средств интенсивной терапии не исключает использования гетерологичной сыворотки для предотвращения развития гангрены. В связи с этим сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная, которая в свое время в комплексе с хирургическими мероприятиями помогла спасти многих пациентов от ампутации, в настоящее время может рассматриваться не только с исторической точки зрения.

Особое место в ряду гетерологичных сывороточных препаратов занимает антivenом — сыворотка против яда гадюки обыкновенной лошадиная, выпускаемая в России (ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России). Сыворотка против яда гадюки имеет ограниченное применение, связанное с сезонной активацией этого вида змей. В отличие от вышеупомянутых антитоксических сывороток, активность которых выражается в Международных единицах, активность данной сыворотки, не имеющей аналогов в мире, выражается в антитоксических единицах, определенных на основании способности сыворотки нейтрализовать дозу змеиного яда, значительно превосходящую ту, которая может попасть в организм человека при укусе гадюкой, обитающей на территории России. Антivenомы включены в Перечень лекарственных средств первой необходимости практически во всех странах. Эксперты ВОЗ делают особый акцент на недоступность эффективных антivenомов для лечения укусов ядовитых змей, встречающихся в различных регионах мира. Наиболее страдает от отсутствия антivenомов население в Сахарском регионе в Африке, юго-восточной Азии. Следует отметить, что существует незначительное количество современных научных публикаций, посвященных лечению отравлений ядом гадюки. В настоящее время в России случаи укусов ядовитыми змеями и их исходы не фиксируются в сводках Росздравнадзора. Имеются лишь отрывочные сообщения в научных публикациях и Интернете, из которых следует, что при поступлении укушенного змеей человека проводится симптоматическое лечение, так как стационары и травмпункты не обеспечены сывороткой против яда гадюки.

Массовая вакцинация населения способствовала, в частности, снижению заболеваемости дифтерией и, соответственно, потребности в противодифтерийной сыворотке. Несмотря на то, что уровень заболеваемости дифтерией в ЕС и России достаточно низкий (<0,01 на 100000 населения), в разных странах региона ежегодно регистрируются лабораторно подтвержденные случаи заболевания дифтерией как среди детей, так и среди взрослого населения. Однако специфика заболевания и тяжесть осложнений таковы, что некоторые стандарты лечения предполагают введение противодифтерийной сыворотки лошадиной до подтверждения диагноза токсической формы и утяжеления состояния пациента. На практике противодифтерийную сыворотку вводят на начальной стадии, согласно клиническому диагнозу, настолько быстро, насколько возможно, даже до того, как получен подтвержденный бактериологический результат из лаборатории. Это связано с тем, что она может нейтрализовать свободный токсин, который еще не проник внутрь клеток-мишеней [29, 30]. Исследования в Латвии показали, что дифтерийный антитоксин лошадиный неэффективен при введении после второго дня проявляющихся симптомов [31]. Случаи последних трех лет выявили возможные задержки в клиническом и лабораторном подтверждении заболевания. Самой насущной проблемой, как отмечают многие клиницисты и эксперты ВОЗ, является отсутствие или ограниченный доступ к дифтерийному антитоксину, необходимому для лечения токсической формы дифтерии в самые короткие сроки. Поэтому наличие адекватного количества противодифтерийной сыворотки в медицинских учреждениях национального и регионального уровня необходимо для своевременного лечения пациентов при лабораторно-подтвержденных подозреваемых случаях заболевания [32, 33].

ВОЗ настоятельно рекомендует каждой стране иметь собственный постоянно возобновляемый запас противодифтерийной сыворотки. В настоящее время среди производителей этого препарата можно назвать Россию, Бразилию, Хорватию и Индию [34, 35]. Но также существуют серьезные опасения экспертов, что Хорватия и Бразилия остановят производство в связи с высокими требованиями регуляторных органов к безопасному производству медицинских препаратов из крови. Необходимо отметить, что в иностранных публикациях и в сообщениях ВОЗ Россия не фигурирует как производитель и потенциальный поставщик антитоксических сывороток, в том числе и дифтерийного антитоксина.

Для того, чтобы найти свидетельства применения септортерапии был выполнен поиск публикаций клинических случаев диагностики и лечения ботулизма, газовой гангрены, столбняка и дифтерии. Анализ нескольких описанных клинических случаев заболеваний в Российской Федерации ботулизмом, дифтерией и столбняком подтвердил первостепенную роль раннего начала специфической терапии. Авторы публикаций особое внимание уделяют недостаточной доступности антитоксических сывороток [36–39].

Чужеродный белок, являющийся главным компонентом гетерологичных сывороточных препаратов, при поступлении в организм человека при парентеральном введении сывороток может вызвать различные неблагоприятные явления в виде аллергических реакций немедленного типа, включая анафилактический шок, или развития сывороточной болезни [40, 41].

Для предотвращения подобных явлений обязательно перед введением сыворотки с лечебной или профилактической целью проверяют чувствительность человека к белку лошади в соответствии со схемами, приведенными в инструкциях по применению гетерологичных сывороток. В России все сыворотки, за исключением противозмеиной, выпускают в комплекте с сывороткой, разведенной 1:100. Пренебрежение этим правилом в сочетании с недостаточностью противошоковой терапии при возникновении аллергического шока может приводить к летальному исходу [42].

С 1 января 2016 г. в России введена в действие Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания [43], в которую взамен фармакопейных статей ГФ СССР X включены статьи на гетерологичные сывороточные препараты и современные методы их оценки.

Это позволит продолжить работу в области стандартизации единых подходов к обоснованию требований к качеству вновь регистрируемых и находящихся в обращении на территории Российской Федерации препаратов специфических иммуноглобулинов и антитоксических сывороток, а также обеспечит учреждения здравоохранения эффективными и безопасными средствами экстренной специфической профилактики и лечения инфекционных заболеваний и поражений токсинами [44].

Литература

- Государственный реестр лекарственных средств. Министерство здравоохранения Российской Федерации [официальный сайт]. Available from: <http://grls.rosminzdrav.ru>.
- International travel and health. Vaccines: rabies. WHO [официальный сайт]. Available from: <http://www.who.int/topics/rabies/ru>.
- Rabies. Fact Sheet № 99. WHO; 2016. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en>.
- 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.
- Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Мельников СА, Евсеев АА, Краснянский ВП, Максимов ВА. Получение иммуноглобулина к вирусу Марбург на основе сыворотки крови лошадей. Вопросы вирусологии 2008; 53(1): 39–41.
- Краснянский ВП, Градобоев ВН, Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Лебединская ЕВ, Черникова НК, Тиманькова ГД. Разработка и изучение свойств иммуноглобулина против лихорадки Ласса. Вопросы вирусологии 1997; 42(4): 168–71.
- 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 С1; 1996.
- Краснянский ВП, Михайлов ВВ, Лукин ЕП, Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Мельников СА и др. Препарат, содержащий иммуноглобулин против венесуэльского энцефаломиелита лошадей из сыворотки крови лошадей жидкий (иммуноглобулин лошадиный ВЭЛ). Патент Российской Федерации № 2261113 С1; 2003.
- Хмелев Ал, Борисевич ИВ, Черникова НК, Махлай АА, Михайлов ВВ, Яковлев АК и др. Оценка безопасности профилактического использования иммуноглобулинов против вирусных геморрагических лихорадок из сывороток крови лошадей. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2012; (6): 103–6.
- Хмелев Ал, Борисевич ИВ, Пантиюхов ВБ, Пирожков АП, Сыромятникова СИ, Шатохина ИВ и др. Использование морских свинок для оценки эффективности гетерологичного иммуноглобулина против боливийской геморрагической лихорадки. Вопросы вирусологии 2009; 54(4): 42–4.
- Борисевич ИВ, Михайлов ВВ, Хамитов РА, Краснянский ВП, Черникова НК, Евсеев АА, Миронов АН. Использование обезьян для доклинической оценки специфических средств профилактики и лечения геморрагических лихорадок Эбола и Ласса. В кн.: Организм и окружающая среда: жизнеобеспечение и защита человека в экстремальных условиях. Мат. российской конференции. 2000. С. 210.
- WHO Model Lists of Essential Medicines. Geneva: WHO; 2015. Available from: <https://goo.gl/PhV1iv>.
- Essential medicines and health products: Essential medicines. WHO. Available from: <https://goo.gl/mnOZB0>.
- Распоряжение от 26 декабря 2015 г. № 2724-р. Правительство России [официальный сайт]. Available from: <https://goo.gl/3soXwg>.
- Комисаров АВ, Жучихин ЮС, Васильев ПГ, Климов ВИ, Луб МЮ, Нестеров ЮЕ и др. Сравнительное изучение качества препаратов противосибиреязвенного глобулина, полученных при создании производства в НИИ микробиологии МО РФ и выпускавшихся ранее в Тбилисском НИИ вакцин и сывороток. В кн.: Диагностика, лечение и профилактика инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария. Мат. юбилейной научной конференции, посвященной 50-летию Центра военно-технических проблем биологической защиты НИИ микробиологии МО РФ. 1999. С. 95–6.
- Пименов ЕВ, Комисаров АВ, Луб МЮ, Васильев ПГ, Жучихин ЮС, Комоско ГВ и др. Освоение и усовершенствование технологии производства глобулина противосибиреязвенного лошадиного жидкого для медицинских целей. В кн.: Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария. Материалы юбилейной научной конференции, посвященной 70-летию НИИ микробиологии МО РФ. 1998. С. 326–7.
- Комисаров АВ, Комоско ГВ, Лещенко АА, Луб МЮ, Пименов ЕВ, Дармов ИВ и др. Изучение процесса стерилизующей фильтрации жидкого противосибиреязвенного лошадиного глобулина. Биотехнология 2002. (2): 66–74.
- Шевцов АН, Борисевич ИВ, Дармов ИВ, Кожухов ВВ, Луб МЮ, Козлова ТН и др. Сывороточный иммунобиологический препарат для профилактики и лечения сибирской язвы. Биотехнология 2011; (1): 42.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). [официальный сайт]. Available from: <https:// goo.gl/yh6aMt>.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). [официальный сайт]. Available from: <https:// goo.gl/ngzNRm>.
- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [официальный сайт]. Available from: <http://www.rospotrebnadzor.ru/>.
- Федеральная служба государственной статистики [официальный сайт]. Available from: <https:// goo.gl/VM1lC0>.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) [официальный сайт]. Available from: <https:// goo.gl/o7ZTSA>.
- U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [официальный сайт]. Available from: <https:// goo.gl/FLZTwP>.
- U. S. Food & Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [официальный сайт]. Available from: <https:// goo.gl/Zqwvut>.
- Гординская НМ, Дука АМ, Акмайкина НЗ. Опыт работы и особенности организации и проведения противоэпидемических мероприятий при подозрении на анаэробную инфекцию в стационарах. Дальневосточный журнал инфекционной патологии 2008; (12): 153–5.
- Prevention and management of wound infection. Technical and Guidelines. WHO. Available from: <https:// goo.gl/ljYVmX>.
- Centers of Disease Control and Prevention. US Department of Health and Human Services [официальный сайт]. Available from: <https:// goo.gl/FC1DeP>.
- Begg N. Manual for the management and control of diphtheria in the European Region. Expanded programme on immunization. Copenhagen: WHO; 1994.
- Centers for Disease Control and Prevention. Corynebacterium diphtheriae. In: Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. 13th ed. 2015. Available from: <https:// goo.gl/v2EE5U>.

31. Logina I, Donaghy M. Diphtheritic polyneuropathy: a clinical study and comparison with Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67(4): 433–8.
32. Both L, White J, Mandal S, Efstratiou A. Access to diphtheria antitoxin for therapy and diagnostics. *Euro Surveill.* 2014; 19(24): pii: 20830.
33. ECDC Epidemic Intelligence Information System for Vaccine Preventable Diseases (EPIIS-VPD) [официальный сайт]. Available from: <https://goo.gl/a4Uylb>.
34. Immunization, Vaccines and Biologicals. *Diphtheria*. WHO. Available from: <https://goo.gl/GCkhB6>.
35. Корженкова МТ, Малышев НА, Берко АИ, Арсеньев ВА. Дифтерия (клиника, диагностика, лечение). Методические рекомендации. М.: 2008.
36. Трихлеб ВИ, Палатная ЛО, Выговская ОВ, Трохимович ЛП, Арсентьева НВ. Ботулизм: особенности современного течения. Случаи из практики. Актуальная инфектология 2015; 4(9): 88–93.
37. Иванова ЛА, Гарас МН, Болтенков ВЛ, Гук ЛИ. Случай пищевого ботулизма у подростков. Актуальная инфектология 2015; 3(8): 56–63.
38. Богадельников ИВ, Прокудина ЛИ, Бобрышева АВ, Безольная ТН, Хамид Фазель, Крюгер ЕА и др. Столбняк забыт, но не исчез. Здоровье ребенка 2012; 2(37): 42–9.
39. Гординская НМ, Дука АМ, Акмайкина НЗ. Опыт работы и особенности организации и проведения противоэпидемических мероприятий при подозрении на анаэробную инфекцию в стационарах. Дальневосточный журнал инфекционной патологии 2008; 12: 153–5.
40. Борисевич ИВ, Авдеева ЖИ, Аллатова НА, Давыдов ДС, Гайдерова ЛА, Горбунов МА и др. Медицинские иммунобиологические препараты. Справочник. Т. 2. Иммуноглобулины человека, сыворотки и иммуноглобулины гетерологичные, monoclonalные антитела, пробиотики, бактериофаги, аллергены, цитокины (вводимые людям). М. 2011. С. 81–103.
41. Супотницкий МВ, Елапов АА, Борисевич ИВ, Кудашева ЭЮ, Климов ВИ, Лебединская ЕВ и др. Препараты крови человека и животных в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015; (3): 33–48.
42. Снегирева ИИ, Романов БК, Озерецковский НА. Безопасность применения препаратов крови по данным постстрегистрационного мониторинга. Успехи современного естествознания 2015; (5): 146–51.
43. Государственная фармакопея РФ. 13-е изд. Т. 3. М.; 2015. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
44. Борисевич ИВ, Кудашева ЭЮ, Перельгина ОВ, Миронов АН, Меркулов ВА, Бондарев ВП и др. Состояние проблемы стандартизации специфических иммуноглобулинов и антитоксических сывороток. Медицинская иммунология 2015; 17(5): 379.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Перельгина Ольга Викторовна. Начальник лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Комаровская Елена Игоревна. Эксперт 1-й категории лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Мухачева Анастасия Вячеславовна. Ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Саяпина Лидия Васильевна. Главный эксперт управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Обухов Юрий Иванович. Начальник управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Перельгина Ольга Викторовна; Perelgina@expmed.ru

Комаровская Елена Игоревна; Komarovskaya@expmed.ru

Clinical experience with heterologous serum products

O. V. Perelygina, E. I. Komarovskaya, A. V. Mukhacheva, L. V. Sayapina, Yu. I. Obukhov, V. P. Bondarev

Federal State Budgetary Institution

«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia.

The article contains data on the use of heterologous serum products in the treatment of some infectious diseases and snake bites. Despite achievements of preventive vaccination there are still cases of diphtheria and tetanus registered annually all over the world. Cases of botulism and gas gangrene are not uncommon either. There is also an important problem of snake bites treatment. Heterologous serum is mainly derived from the blood of horses immunized with bacterial anatoxins or toxins (snake venoms). They are included into the Russian List of Vital and Essential Medicines and in the WHO Essential Medicines List. Antivenoms are the only effective antidotes for the bites of venomous snakes, spiders, and scorpions. However, despite a self-evident demand in such products, there is a lack of antitoxic serum caused by the phasing out of its production in some countries, its low economic efficiency and stringent regulatory requirements for the safe production of blood products.

Key words: hyperimmune serum; heterologous immunoglobulins; antitoxic serum; antivenom; antitoxin; toxic infection; diphtheria; tetanus; gas gangrene; snake bite.

For citation: Perelygina OV, Komarovskaya EI, Muchacheva AV, Sayapina LV, Obukhov Yul, Bondarev VP. Clinical experience with heterologous serum products. BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2017; 17(1); 41–47.

References

1. State Register of Medicines. Russian Federation Ministry of Health [official site]. Available from: <http://grls.rosmiinzdrav.ru> (in Russian).
2. International travel and health. Vaccines: rabies. WHO [official site]. Available from: <http://www.who.int/topics/rabies/ru>.
3. Rabies. Fact Sheet № 99. WHO; 2016. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en>.
4. Borisevich IV, Chernikova NK, Markov VI, Krasnyanskiy VP, Borisevich SV, Rozhestvenskiy EV. An experience in the clinical use of specific immunoglobulin from horse blood serum for prophylaxis of Ebola haemorrhagic fever. Voprosy virusologii 2017; 62(1): 25–9 (in Russian).
5. Borisevich IV, Potryayeva NV, Melnikov SA, Yevseyev AA, Krasnyansky VP, Maksimov VA. Design of equine serum-based Marburg virus immunoglobulin. Voprosy virusologii 2008; 53(1): 39–41 (in Russian).
6. Krasnyansky VP, Gradoboev VN, Borisevich IV, Potryayeva NV, Lebedinskaya EV, Chernikova NK, Timankova GD. Development and study of the properties of immunoglobulin against Lassa fever. Voprosy virusologii 1997; 42(4): 168–71 (in Russian).
7. Mikhaylov VV, Borisevich IV, Timankova GD, Krasnyansky VP, Potryayeva NV, Lebedinskaya EV, Chernikova NK. The preparation containing immunoglobulin against Ebola fever from horse blood serum liquid (immunoglobulin Ebola). Patent RUS 2130318 C1; 1996 (in Russian).
8. Krasnyansky VP, Mikhaylov VV, Lukin EP, Borisevich IV, Potryayeva NV, Melnikov SA, et al. The preparation containing immunoglobulin against VEE from horse blood serum liquid (immunoglobulin against VEE from horse blood serum). Patent RUS 2261113 C1; 2003 (in Russian).
9. Khmelev AL, Borisevich IV, Chernikova NK, Makhlay AA, Mikhaylov VV, Yakovlev AK, et al. Evaluation of safety of prophylactic use of immunoglobulins against viral hemorrhagic fevers from horse blood sera. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii 2012; (6): 103–6 (in Russian).
10. Khmelev AL, Borisevich IV, Pantyukhov VB, Pirozhkov AP, Syromyatnikova SI, Shatokhina IV, et al. Use of guinea pigs to evaluate the efficacy of a heterologous immunoglobulin against Bolivian hemorrhagic fever. Voprosy virusologii 2009; 54(4): 42–4 (in Russian).
11. Borisevich IV, Mikhaylov VV, Khamitov RA, Krasnyansky VP, Chernikova NK, Evseev AA, Mironov AN. Use of monkeys for the preclinical evaluation of specific means of prevention and treatment of hemorrhagic fevers Ebola and Lassa. In: Organisms and environment: Human livelihoods protection in extreme conditions. Mater. Ross. Konf. 2000. P. 210 (in Russian).
12. WHO Model Lists of Essential Medicines. Geneva: WHO, 2015. Available from: <https://goo.gl/Phv1iv>.
13. Essential medicines and health products: Essential medicines. WHO. Available from: <https://goo.gl/mnOZB0>.
14. Government Decree of 26 December 2015, № 2724-p. Available from: <https://goo.gl/3soXwG> (in Russian).
15. Komissarov AV, Zhuchikhin YuS, Vasilyev PG, Klimov VI, Lub MYu, Nesterov YuE, et al. Comparative study of quality of anthrax immune globulin preparations obtained by the establishment of production at the Institute of Microbiology of the Russian Defense Ministry and released earlier in the Tbilisi Institute of Vaccines and Serum. In: Diagnosis, treatment and prevention of infectious diseases. Veterinary. Biotechnology. Mat. Yubil nauch konf, posvyashchennoy 50-letiyu Tsentra voenno-tehnicheskikh problem bolezni zashchity NII mikrobiologii MO RF. 1999. P. 95–6 (in Russian).
16. Pimenov EV, Komissarov AV, Lub MYu, Vasilyev PG, Zhuchikhin YuS, Komosko GV, et al. The development and improvement of production technology against anthrax globulin equine liquid for medical purposes. In: Diagnosis, treatment and prevention of infectious diseases. Biotechnology. Veterinary. Mat. Yubil nauch konf, posvyashchennoy 70-letiyu NII mikrobiologii MO RF. 1998. P. 326–7 (in Russian).
17. Komissarov AV, Komosko GV, Leshchenko AA, Lub MYu, Pimenov EV, Darmov IV, et al. The sterilizing filtration of horse anti-anthrax liquid globulin preparation. Biotechnologiya 2002; (2): 66–74 (in Russian).
18. Shevtsov AN, Borisevich IV, Darmov IV, Kozhukhov VV, Lub MYu, Kozlova TN, et al. Serum immunobiological preparation for prophylaxis and therapy of anthrax. Biotechnologiya 2011; (1): 42–6 (in Russian).
19. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). [official site]. Available from: <https://goo.gl/yh6aMt>.
20. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). [official site]. Available from: <https://goo.gl/ngzNRm>.
21. Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing [official site]. Available from: <http://www.rosprerabnadzor.ru> (in Russian).
22. Federal State Statistics Service. Russiin Federation [official site]. Available from: <https://goo.gl/VMl1C0> (in Russian).
23. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). [official site]. Available from: <https://goo.gl/o7ZTSA>.
24. U. S. Food&Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [official site]. Available from: <https://goo.gl/FLZTwP>.
25. U. S. Food &Drug Administration. U. S. Department of Health and Human Services [official site]. Available from: <https://goo.gl/Zqwuvt>.
26. Gordinskaya NM, Duka AM, Akmajkina NZ. Experience and features of the organization and conduct of anti-epidemic measures in cases of suspected anaerobic infection in hospitals. Far-Eastern J Infect Dis. 2008; (12): 153–5 (in Russian).
27. Prevention and management of wound infection. Technical and Guidelines. WHO. Available from: <https://goo.gl/jYVmX>.
28. Centers of Disease Control and Prevention. US Department of Health and Human Services [official site]. Available from: <https://goo.gl/goo/gC1DeP>.
29. Begg N. Manual for the Management and Control of Diphtheria in the European Region. Expanded Programme on Immunization. Copenhagen: WHO; 1994.
30. Centers for Disease Control and Prevention. Corynebacterium diphtheriae. In: Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. 13th ed. 2015. Available from: <https://goo.gl/v2EE5U>.
31. Loginina I, Donaghy M. Diphtheritic polyneuropathy: a clinical study and comparison with Guillain-Barré syndrome. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1999; 67(4): 433–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.67.4.433>.
32. Both L, White J, Mandal S, Efstratiou A. Access to diphtheria antitoxin for therapy and diagnostics. Euro Surveill. 2014; 19(24): pii: 20830. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20830>.
33. ECDC Epidemic Intelligence Information System for Vaccine Preventable Diseases (EPIS-VPD) [official site]. Available from: <https://goo.gl/a4Ulyb>.
34. Immunization, Vaccines and Biologicals. Diphtheria. WHO. Available from: <https://goo.gl/GCkhB6>.
35. Korzhenkova MP, Malyshev NA, Berko AI, Arsen'ev VA. Diphtheria (clinic, diagnostics, treatment). Guidelines. Moscow. 2008 (in Russian).
36. Tribleb VI, Palatnaja LO, Vygovskaja OV, Trohimovich LP, Arsent'eva NV. Botulism: features of the modern trend. Cases from practice. Curr Infectology 2015; 4(9): 88–93 (in Russian).
37. Ivanova LA, Garas MN, Boltenkov VL, Guk LI. The case of foodborne botulism in adolescents. Curr Infectology 2015; 3(8): 56–63 (in Russian).
38. Bogad'el'nikov IV, Prokudina LI, Bobrysheva AV, Bezadol'naja TN, Hamid Fazel', Krjuger EA, et al. Tetanus is forgotten, but not gone. Child Health 2012; 2(37): 42–9 (in Russian).
39. Gordinskaja NM, Duka AM, Akmajkina NZ. Experience and features of the organization and conduct of anti-epidemic measures in cases of suspected anaerobic infection in hospitals. Far-Eastern J Infect Dis. 2008; 12: 153–5 (in Russian).

40. Borisevich IV, Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Davydov DS, Gayderova LA, Gorbunov MA, et al. *Medical immunobiological preparations. Directory. V. 2. Human immunoglobulins, sera and heterologous immunoglobulins, monoclonal antibodies, probiotics, bacteriophages, allergens, cytokines (administered to humans)*. Moscow. 2011. P. 81–103 (in Russian).
41. Supotnitsky MV, Elapov AA, Borisevich IV, Kudasheva EYu, Klimov VI, Lebedinskaya EV, et al. *Blood preparations of humans and animals in terms of their quality, efficacy and safety. Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015; (3): 33–48 (in Russian).
42. Snegireva II, Romanov BK, Ozereckovskij NA. *The safety of blood products according to the post-marketing monitoring*. *Uspekhi sovrestvoznanija* 2015; (5): 146–51 (in Russian).
43. *The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition. V. 3. Moscow; 2015. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian)*.
44. Borisevich IV, Kudasheva EYu, Pereleygina OV, Mironov AN, Merkulov VA, Bondarev VP, et al. *State of the problem of standardization of specific immunoglobulins and antitoxic sera*. *Meditinskaya imunologiya* 2015; 17(5): 379 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Pereleygina OV. Head of the Laboratory of Toxoids and Antitoxic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Komarovskaya El. 1st professional category expert of the Laboratory of Toxoids and Antitoxic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Muhacheva AV. Leading expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Sayapina LV. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Obukhov Yul. Head of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products.

Bondarev VP. Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 615.371:615.011

Исследование остаточной вирулентности и иммунизирующей способности посевных серий *Mycobacterium bovis* BCG-1

Д. Т. Леви, Н. В. Александрова, Ю. И. Обухов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 15.09.2016 г. Принята к публикации 07.02.2017 г.

Статья посвящена актуальной на сегодняшний день проблеме стабильности системы посевных серий, используемой в стране при производстве вакцин БЦЖ с 1947 г. Данная проблема недостаточно изучена и требует дальнейшего исследования. В ранее проведенной авторами работе использование инновационных (молекулярно-генетических) методов позволило подтвердить соответствие посевных серий БЦЖ-1, применявшихся в стране с 1947 г., международному референс-реагенту (BCG Vaccine of Russian BCG-I sub-strain-International Reference Reagent) по показателю «Подлинность». Настоящая статья включает результаты дальнейшего сравнительного испытания посевных серий БЦЖ-1 367 «Щ» (1982) и 368 «Щ» (2006). В рамках исследовательской задачи авторы уделили особое внимание таким характеристикам качества, как специфическая активность, остаточная вирулентность (приживаемость), специфическая безопасность (отсутствие вирулентных микобактерий туберкулеза), сенсибилизирующее действие (по индукции иммуноопосредованной гиперчувствительности замедленного типа к туберкулину) и профилактические свойства. Полученные результаты оценки этих серий были близки по своим значениям и не отличались от результатов, полученных при аттестации, проведенной непосредственно после изготовления каждого посевного материала. Эти результаты свидетельствуют о высокой стабильности биологических свойств посевных серий. В статье также представлены данные литературы по исследуемой теме.

Ключевые слова: вакцина БЦЖ; субштаммы БЦЖ; система посевных серий; остаточная вирулентность; приживаемость.

Библиографическое описание: Леви ДТ, Александрова НВ, Обухов ЮИ. Исследование остаточной вирулентности и иммунизирующей способности посевных серий *Mycobacterium bovis* BCG-1. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 48–53.

Несмотря на значительные усилия мирового сообщества, туберкулез продолжает оставаться глобальной проблемой здравоохранения, ведущим инфекционным заболеванием. По данным ВОЗ в 2015 году зарегистрировано 9,6 млн новых заболеваний туберкулезом и 1,5 млн случаев смерти от туберкулеза в мире. Для профилактики туберкулеза используется адгептуированная живая вакцина БЦЖ, созданная французскими учеными А. Кальметтом и К. Гереном в 1921 г. Этой вакциной прививают новорожденных и детей раннего возраста в рамках универсальной программы иммунизации во всем мире, кроме США. Ежегодно ее получают около 100 миллионов детей [1]. При всем существующем в настоящее время разнообразии действующих вакцин против туберкулеза все они имеют один первоисточник — родительский штамм БЦЖ. По настоящее время вакцина БЦЖ является единственным препаратом для профилактики туберкулеза, наиболее широко применяемым и наиболее спорным профилактическим средством. Ряд факторов, включая заболеваемость, иммунный статус, генетические вариации хозяина и штамма БЦЖ, воздействие нетуберкулезных микобактерий, характеристику вакцины, технику прививки и др., влияют на эффективность вакцинации. Известно, что препарат не защищает взрослых от легочного туберкулеза, вызывает значительное число постvakцинальных осложнений [2–4]. С начала нынешнего столетия предприняты широкомасштабные исследования по созданию новых вакцин против туберкулеза взамен вакцины БЦЖ. Около двух десятков вакцин-кандидатов в настоящее время находится на разных стадиях клинических испытаний. Большинство из

них — буст-вакцины, состоящие из фьюжен-антител и микобактерий и современных адьювантов. Эти вакцины предназначены в основном для применения после вакцинации БЦЖ. Однако ни одна из вакцин-кандидатов пока не продемонстрировала приемлемых результатов.

В 2013 г. ВОЗ переработала и дополнила современными требованиями текст документа «Рекомендации, гарантирующие качество, безопасность и эффективность вакцины БЦЖ» [5], подтвердив необходимость соблюдения системы посевной серии (seed lot system) в производстве препарата. В этом документе рекомендовано использовать для оценки подлинности посевной серии современные молекулярно-генетические методы. Представлены основные требования к посевной серии в seed lot system: колебания остаточной вирулентности БЦЖ (способность приживаться в организме хозяина) не должны выходить за определенные пределы; штамм должен продуцировать относительно высокий уровень иммунологических ответов к антигенам микобактерий туберкулеза и обладать установленными профилактическими свойствами при заражении вакцинированных животных вирулентным штаммом *Mycobacterium tuberculosis*. С 2009 г. в России для производства туберкулезных вакцин БЦЖ и БЦЖ-М и вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря используется очередная посевная серия субштамма *M. bovis* BCG-1 — серия 368 «Щ» (2006)¹. Стабильность этой посевной серии в числе других, сохранившихся в музее ГИСК им. Л. А. Тарасевича, авторы исследовали в ПЦР (полимеразной цепной

¹ В скобках принято указывать год изготовления серии.

реакции) с праймерами, рекомендованными ВОЗ [6]. В рамках этого испытания показана идентичность всех посевных серий БЦЖ-1, лиофилизированных с 1947 г., подтверждена их генетическая стабильность.

Цель работы: в рамках переаттестации серии 368 «щ» субштамма БЦЖ-1 оценить стабильность отечественной системы посевной серии. С этой целью провести сравнительную оценку посевных серий субштамма *M. bovis* BCG-1 по остаточной вирулентности (приживаемости в организме животного), специфической безопасности, сенсибилизирующей способности (по реакции гиперчувствительности замедленного типа к туберкулину) и протективным свойствам (защитному действию при заражении вирулентным штаммом *M. tuberculosis*).

Материалы и методы

Материалы

1. *Mycobacterium bovis* BCG субштамм BCG-1 (Russia)
- Посевная серия № 367 «щ» — лиофилизат (1982 г.) 12-дневной культуры 7 генерации посевной серии 359 «щ» в 1,5 %-ном растворе натрия глутамата моногидрате. Использовалась для изготовления вакцин БЦЖ с 1982 по 2009 гг.
- Посевная серия № 368 «щ» штамма *M. bovis* BCG-1 — лиофилизат (2006 г.) 12-дневной культуры 7 генерации посевной серии 359 «щ» в 1,5 %-ном растворе натрия глутамата моногидрате. Используется для изготовления вакцин БЦЖ с 2009 г.
2. ОСО вакцины туберкулезной (БЦЖ) сухой (ОСО 42-28-420-П).
3. ОСО очищенного туберкулина (ОСО ППД-Л-2 42-28-49А-2016).
4. Вакцина БЦЖ-М серия № 679, производства филиала «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, показатель жизнеспособности 24 млн/мг.
5. Вирулентный тест-штамм *M. tuberculosis* Erdman TMC#107.
6. Питательные среды:
 - яичная среда Левенштейна-Йенсена,
 - картофельная среда Павловского.
7. Животные: белые беспородные мыши массой 16–18 г, морские свинки массой 250–350 г, получены из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Андреевка».

Методы

1. Приживаемость

А) Для определения остаточной вирулентности проводили исследования по интенсивности вегетирования БЦЖ в селезенке мышей, вводя им в хвостовую вену по 0,001 мг исследуемых образцов БЦЖ в 0,2 мл раствора натрия хлорида 0,9 %. Через 24 часа, 1, 3, 6, 9, 15 и 21 неделю подвергали эвтаназии по 5 животных в каждой группе. Асептически извлекали селезенки, каждую из которых гомогенизировали, ресуспендировали в 5–6 мл 5 %-ного раствора серной кислоты, центрифугировали при 3000г, надосадочную жидкость удаляли. Осадок отмывали средой Сотона и разводили этой средой в зависимости от срока наблюдения в 100 раз (24 ч, 1 и 3 нед.) или в 1000 раз (6, 9, 15 и 21 нед.). По 0,2 мл взвеси селезенки сеяли на 10 пробирок со средой Левенштейна-Йенсена. Посевы инкубировали при температуре (37±1) °C в течение 28 суток, затем подсчитывали число выросших колоний и определяли среднее количество жизнеспособных клеток БЦЖ в селезенке в каждый срок наблюдения. Для харак-

теристики динамики размножения БЦЖ *in vivo* применяли так называемый показатель вегетирования: отношение количества клеток БЦЖ в селезенке в каждый срок наблюдения (выраженное в логарифмах) к количеству микробактерий, высеванных из органов через 24 часа после иммунизации (выраженное в логарифмах).

Б) Тест Йенсена. Основан на сопоставлении размеров местных реакций на внутрикожное (в/к) введение сравниваемых препаратов БЦЖ. Лиофилизаты посевных серий разводили раствором натрия хлорида 0,9 % до концентрации 0,5 мг/мл и вводили по 0,1 мл внутрикожно (в/к) в три точки каждой из 4 морских свинок одного пола весом от 350 до 400 г. Еженедельно, в течение 5 недель, определяли размер кожных реакций на месте введения испытуемых препаратов путем измерения двух взаимоперпендикулярных диаметров кожных инфильтратов. Тест проводили в данной интерпретации в связи с необходимостью статистической обработки результатов. Следует отметить, что результат теста зависит, помимо остаточной вирулентности штамма или ее реверсии, от количества жизнеспособных единиц БЦЖ во вводимой дозе. Поэтому при выполнении теста принято разводить вакцины БЦЖ по количеству жизнеспособных клеток в дозе. Сравниваемые посевные серии имели практически одинаковое количество жизнеспособных клеток БЦЖ в 1 мг.

2. Сенсибилизирующие и защитные (протективные) свойства испытуемых посевных серий изучали на морских свинках массой 250–300 г Группам животных, по 25 морских свинок в каждой, вводили одну из посевных серий (по 0,01 мг/0,2 мл раствора натрия хлорида 0,9 %) подкожно (п/к) в правую паховую область. Вакцину БЦЖ-М вводили в дозе 0,005 мг/0,2 мл растворителя. Контрольную группу составили 18 морских свинок из той же партии. Животных разбивали на группы по методу случайной выборки:

А) Кожную реакцию гиперчувствительности замедленного типа к туберкулину (ГЗТ к туберкулину) исследовали через 1 и 2,5 месяца после вакцинации путем в/к введения 5 и 25 ТЕ ОСО очищенного туберкулина ППД-Л-2. Ответную реакцию учитывали через 24 часа, измеряя два взаимно перпендикулярных диаметра эритемы, определяли среднюю величину.

Б) После учета реакций на туберкулиновые пробы, поставленные спустя 2,5 месяца после вакцинации, всех животных заражали п/к в левую паховую область 14-дневной культурой 3-й генерации *M. tuberculosis* Erdman на среде Левенштейна-Йенсена (по 0,0001 мг в 0,2 мл раствора натрия хлорида 0,9 %). Животные всех групп были подвергнуты эвтаназии после гибели от генерализованного туберкулеза 2 морских свинок контрольной группы (через 75 сут. после заражения). Поражение внутренних органов и лимфатических узлов оценивали визуально по методу Нахимсон, принимая тотальное поражение за 100. Метод подкожного заражения использован в связи с отсутствием установки для аэрогенного заражения. Метод рутинный, валидированный, обеспечивает стандартные результаты.

Статистическую обработку и оценку полученных в исследованиях данных проводили с использованием параметрических и непараметрических методов статистики [7].

Результаты

Как и при аттестации посевной серии 368 «щ» в 2006–2008 гг., при проведении переаттестации этой серии в качестве препарата сравнения использовали посевную серию 367 «щ» (1982) субштамма БЦЖ-1.

В таблице 1 представлена сравнительная характеристика серий 367 «щ» и 368 «щ» по показателям, предусмотренным спецификацией на вакцину БЦЖ. Анализ результатов показал, что эти посевные серии незначительно различались друг от друга по дисперсности и общему содержанию бактериальных клеток в ампуле, что было продемонстрировано как при оценке фотометрическим методом (0,30–0,37 для серии 367 «щ» и 0,315–0,350 для серии 368 «щ»), так и в пересчете на весовую характеристику — по 2 мг клеток БЦЖ в ампулах. Показатели термостабильности обеих серий были высокими, превышая более чем в 2 раза нижний допустимый лимит, который составляет 25 % от исходного числа жизнеспособных клеток БЦЖ. Половина и более микобактерий БЦЖ оставались жизнеспособными после месяца хранения образцов при температуре 37 °C. Различия показателей жизнеспособности серий также были статистически недоказанными ($P < 0,95$). Кроме того, мониторинг жизнеспособности посевных серий за годы их применения позволяет сделать заключение о высокой стабильности материала в процессе многолетнего хранения (от 30 до 40 млн жизнеспособных клеток в 1 мг БЦЖ).

Остаточную вирулентность серий в опыте по вегетированию БЦЖ в селезенке исследовали на 2 группах белых беспородных мышей, иммунизированных испытуемыми сериями посевного материала. С учетом отсутствия различий в показателях жизнеспособности серий, дозу введения рассчитывали по весовому содержанию клеток БЦЖ — по 0,001 мг на мышь. Первый высеив БЦЖ из селезенки мышей проводили через 24 часа, затем периодически в течение 21 недели. Результаты представлены в таблице 2. Анализ этих результатов показал, что при посеве селезенки мышей через 24 часа после вакцинации на сре-де Левенштейна-Йенсена вырастает практически одинаковое количество колоний для каждой серии. Логарифм числа колоний снизился вдвое при посеве органа через неделю с последующим нарастанием, достигая пика через 9 недель после вакцинации и постепенно снижаясь к 21 неделе. Спустя этот срок уровень высеваемости клеток БЦЖ из селезенки остается высоким, что свидетельствует

о длительности внутриклеточного размножения микобактерий БЦЖ в этом органе. Статистический анализ представленных результатов показал, что остаточная вирулентность (по показателю вегетирования) серий 367 «щ» и 368 «щ» практически одинакова ($p > 0,05$).

Вторым методом, подтверждающим уровень вегетирования клеток БЦЖ в организме хозяина, является тест Йенсена — внутривенное введение БЦЖ морским свинкам с длительным наблюдением за развитием местных реакций. Результаты представлены в таблице 3. Дисперсионный анализ полученных результатов показал отсутствие статистически значимых различий между реакциями на введение одинаковых разведений сравниваемых посевных серий. Местные реакции развивались к 6-м суткам и начинали угасать после 5-й недели. Этот тест позволяет оценить способность БЦЖ размножаться в месте введения препарата. При статистической обработке результатов этого теста не было выявлено достоверных различий в размерах реакций на одинаковые дозы двух посевных серий в различные сроки после введения БЦЖ. Тест позволяет оценить не только способность БЦЖ размножаться в месте введения препарата, но и, как полагают, определить возможность реверсии вирулентности. Результат теста зависит также от количества жизнеспособных единиц БЦЖ во вводимой дозе. Однако в нашем случае число жизнеспособных клеток БЦЖ в дозе двух испытуемых серий не имело статистически значимых различий и, таким образом, не могло повлиять на результат исследования.

Специфическую безопасность посевных серий субштамма БЦЖ-1 исследовали, вводя по 100 человеческих доз наиболее чувствительным к туберкулезу животным — морским свинкам. При визуальном исследовании через 7 недель у животных, подвергнутых эвтаназии, не было отмечено специфических туберкулезных поражений внутренних органов. В основном патологический процесс отмечался в регионарных лимфатических узлах (казеозный лимфаденит) с развитием всех признаков специфического воспаления: творожистого некроза, эпителиоидно-клеточной реакции, гигантоклеточной трансформации с развитием фиброза и перифокального воспаления. У двух

Таблица 1. Результаты сравнительной оценки посевных серий 367 «щ» и 368 «щ»

Серия	Содержание бактерий		Дисперсность	Жизнеспособность, млн/мг	Термостабильность, %	Растворимость, гомогенность
	мг	ОП*				
367 «щ»	2	0,30–0,37	1,7–1,9	32–44	48	Соответствует НД
368 «щ»	2	0,315–0,350	1,6–1,7	35–45	65	Соответствует НД

* ОП — показатель оптической плотности.

Таблица 2. Интенсивность вегетирования БЦЖ в селезенке мышей, иммунизированных испытуемыми сериями посевного материала

Серия	Интенсивность вегетирования БЦЖ в селезенке мышей в различные сроки после вакцинации						
	24 часа	1 нед.	3 нед.	6 нед.	9 нед.	15 нед.	21 нед.
367 «щ»	1,2±0,1	0,5±0,2	0,9±0,2	2,5±0,2	2,8±0,3	2,1±0,4	2,2±0,2
368 «щ»	1,5±0,1	0,5±0,2	1,0±0,2	2,1±0,1	2,3±0,3	1,8±0,4	1,7±0,2
Достоверность различий (p)	=0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Таблица 3. Результаты теста Йенсена у морских свинок при введении дозы 0,05 мг/0,1 мл посевных серий

Посевной материал	368 «щ»					367 «щ»				
	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.	5 нед.	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.	5 нед.
Срок после введения, нед.	1,5±1,1	5,9±0,6	5,7±0,8	5,8±0,6	5,1±0,6	6,1±1,0	6,6±0,7	6,6±0,6	6,7±0,4	6,0±0,4
Размер, мм										

морских свинок 1 и 2 группы отмечены признаки специфической реакции в легких с образованием единичных мелких узелков, очагов эпителиоидно-клеточной трансформации и единичных гигантских многоядерных клеток. В дальнейшем со временем такая реакция на БЦЖ, свидетельствующая об остаточной вирулентности, имеет обратное развитие. Проведенные исследования не выявили существенных различий в органах и лимфатических узлах морских свинок в ответ на введение испытуемой посевной серии и серии сравнения.

Иммуногенность посевного материала 368 «щ» исследовали на морских свинках, проводя сравнение с серией 367 «щ» и с коммерческой серией вакцины БЦЖ-М, приготовленной из посевной серии 368 «щ». Вводимая животным весовая доза была в 2 раза меньше, а количество жизнеспособных клеток БЦЖ серии вакцины туберкулезной для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М) в 3 раза меньше, чем при вакцинации посевными сериями.

Сенсибилизирующие свойства препаратов оценивали по развитию ГЗТ к очищенному туберкулину (ОСО ППД-Л-2) у вакцинированных морских свинок через 1 и 2,5 месяца после вакцинации. Результаты этого испытания представлены в таблице 4. Анализ представленных результатов показал, что через месяц после вакцинации животные всех групп реагировали как на 25 ТЕ, так и на 5 ТЕ ОСО ППД-Л-2. Ответные реакции ГЗТ на туберкулину у животных в сравниваемых группах были близки по своим значениям. На 5 ТЕ ППД-Л-2 через 1 месяц после вакцинации посевными сериями ответные реакции были наибольшими у животных, вакцинированных серией 367 «щ» (9,48 мм), и наименьшими — у вакцинированных БЦЖ-М (8,10 мм). У вакцинированных посевной серией 368 «щ» значение ответной реакции составило 8,57 мм. Однако статистической значимости различий в уровне ГЗТ доказать не удалось. Через 2,5 месяца средние реакции ГЗТ на 5 ТЕ туберкулина в каждой группе увеличивались и составляли 10,80; 11,54 и 11,50 мм соответственно ($p < 0,05$). Размеры ответных реакций на 25 ТЕ были статистически значимо большими как через 1 мес. (11,5; 11,8 и 11,5 мм), так и через 2,5 мес. (14,5, 14,0 и 14,3 мм), чем на 5 ТЕ ($p < 0,05$).

Таблица 4. Интенсивность ГЗТ к туберкулину у морских свинок, вакцинированных различными посевными сериями

Серия	Размер туберкулиновых реакций (мм) после вакцинации через			
	1 месяц		2,5 месяца	
	на 5 ТЕ	на 25 ТЕ	на 5 ТЕ	на 25 ТЕ
367 «щ»	9,48±0,6	11,8±0,7	11,54±0,7	14,56±0,8
368 «щ»	8,67±0,6	11,6±0,5	10,8±0,7	14,0±0,6
679 БЦЖ-М	8,1±0,7	11,5±0,7	10,8±0,5	14,3±0,6
Достоверность различий (p)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Таблица 5. Результат определения протективных свойств испытуемых препаратов на морских свинках

Серия препарата	Доза БЦЖ мг/жк*	Количество животных с индексом поражения				Число животных в группе	Средний индекс поражения
		0–10	20–30	40–60	80–100		
367 «щ»	0,1/3500000	4	13	6	0	24	27,0
368 «щ»	0,1/3500000	8	11	5	0	24	24,7
679 «БЦЖ-М»	0,05/1200000	6	11	4	1	23	25,6
Контроль	0	0	1	4	12	17	72,6

* жк — жизнеспособные клетки БЦЖ.

Дисперсионный анализ полученных материалов показал отсутствие статистически значимых различий между ГЗТ к туберкулину в ответ на введение исследуемых препаратов, сенсибилизирующую способность которых следует признать одинаковой.

Протективные свойства исследуемых посевных серий БЦЖ серии 679 вакцины БЦЖ-М оценивали по способности задерживать развитие туберкулеза у морских свинок через 2,5 месяца после вакцинации. Животных вакцинированных и контрольных групп заражали тест-штаммом *M. tuberculosis* Erdman. Вскрытие животных всех групп проводили после гибели от генерализованного туберкулеза 2 морских свинок контрольной группы. Результаты испытания представлены в таблице 5.

В группах животных, вакцинированных двумя сериями посевного материала БЦЖ и коммерческой серией вакцины БЦЖ-М средние индексы поражения находились на одинаковом уровне ($p > 0,05$), различаясь незначительно (27,0; 24,7 и 25,6 соответственно). У вакцинированных животных туберкулезные поражения были ограничены лимфатическими узлами и единичными мелкими специфическими узелками в отдельных органах (индексы поражения от 0 до 30). Все животные контрольной группы имели значительные туберкулезные поражения не только в лимфатических узлах, но и в селезенке, печени и легких. Эти поражения были множественными, туберкулезные узелки, как правило, средними или крупными (индексы поражения от 30 до 90). Средний индекс поражения морских свинок контрольной группы составлял 72,6, что статистически значимо выше, чем у вакцинированных животных. Половинная вакцинирующая доза (вакцина БЦЖ-М) задерживала развитие туберкулеза у животных на уровне посевных серий — индекс поражения 25,6. Эти данные еще раз подтвердили правомерность проведенного ранее снижения верхнего лимита жизнеспособности коммерческих серий вакцины БЦЖ и БЦЖ-М с целью снижения постvakцинальных осложнений [8].

Обсуждение

Исследуя историю происхождения и полигенность 13 субштаммов БЦЖ, M. A. Behr и P. M. Small [9, 10] показали, что субштаммы БЦЖ значительно отличаются от исходного

штамма *M. bovis* BCG по антигенному составу. Они разделили их на три группы по количеству копий IS6110 и наличию или отсутствию mpt64 при анализе в ПЦР. Субштаммы BCG-Russia, BCG-Japan, BCG-Moreau, так же как и оригинальный штамм BCG, имели mpt64 и 2 копии IS6110. Эта группа штаммов была получена от французских исследователей в 1924–1925 гг. Другая группа, с делецией 1 копии IS6110, была получена в 1925–1926 гг. В нее вошли BCG-Sweden и BCG-Birkhaug. Третья группа, включившая наибольшее количество субштаммов, потеряла mpt64 и по одной копии IS6110. Эти штаммы были получены в 1926–1931 гг. В нее включены субштаммы BCG-Denmark BCG и производные от него (BCG-Prague, BCG-Glaxo), BCG-Phipps, BCG-Tice, BCG-Flappier и производный от него (BCG-Connaught), BCG-Pasteur.

Эти данные затем были подтверждены и другими авторами [11, 12]. Показано также, что существует несколько вариантов некоторых субштаммов, например, 4 варианта французского, 2–3 варианта датского и японского субштаммов БЦЖ. Эти варианты субштаммов также различаются между собой по генетической и филогенетической характеристики. Все это разнообразие субштаммов привело к тому, что с 2010 по 2013 г. в результате коллаборативных исследований ВОЗ зарегистрировала 3 наиболее широко используемых субштамма БЦЖ в качестве международных референс-реагентов для производства вакцин БЦЖ:

- BCG Vaccine of Danish 1331 sub-strain (1st WHO Reference Reagent) International Reference Reagent;
- BCG Vaccine of Tokyo 172 sub-strain (1st WHO Reference Reagent) International Reference Reagent;
- BCG Vaccine of Russian BCG-I sub-strain (1st WHO Reference Reagent) International Reference Reagent;

В последующем к регистрации ВОЗ также был принят субштамм BCG-Moreau.

Ранее, на 1 этапе данных исследований, нами были использованы молекулярно-генетические методы для сравнительной оценки отечественных посевных серий (с 1947 по 2006 г.) с международным референс-реагентом BCG Vaccine of Russian BCG-I sub-strain (1st WHO Reference Reagent) International Reference Reagent. Установлена полная идентичность лиофилизатов посевных серий как между собой, так и с международным референс-реагентом [6].

В данном испытании серия 368 «щ» субштамма БЦЖ-1 исследована по дополнительным тестам, рекомендованным ВОЗ. При изучении остаточной вирулентности (вегетирование в организме мышей и морских свинок) и при оценке иммуногенности субштамма БЦЖ-1 (по способности вызывать иммуноопосредованную ГЗТ к туберкулину и по протективному действию) в качестве препарата сравнения использовали предыдущую серию посевного материала 367 «щ». Результаты показали отсутствие каких-либо значимых различий в указанных показателях между сравниваемыми посевными сериями. Серия 367 «щ», так же как и серия 368 «щ», приготовлена из посевной серии 359 «щ», лиофилизированной в 1966 г. На основании полученных результатов продемонстрирована стабильность свойств субштамма БЦЖ-1 и подтверждена адекватность алгоритма изготовления посевных серий.

Следует особо отметить результаты исследования протективных свойств посевных серий БЦЖ-1 с использованием дополнительной группы морских свинок, вакцинированных производственной (коммерческой) серией вакцины БЦЖ-М, изготовленной из посевного материала 368 «щ». Весовая доза вакцинации этим препаратом была равна половине дозы вакцинации посевными сериями, а число жизнеспособных клеток БЦЖ в ней составило толь-

ко 1/3 дозы посевных серий. Индексы поражения животных, вакцинированных посевными сериями и вакциной БЦЖ-М, были практически одинаковыми: 27,0; 24,7 и 25,6 соответственно при тяжелом тотальном поражении 70 % животных контрольной группы (средний индекс поражения животных туберкулезом в группе — 72,0). Полученные данные в очередной раз подтвердили правомерность и своевременность снижения верхних границ показателя жизнеспособных клеток в туберкулезных вакцинах, которое было внедрено с 2012 года в производство этих препаратов с целью снижения числа постvakцинальных осложнений.

Заключение

Результаты переаттестации посевной серии 368 «щ» субштамма БЦЖ-1 показали, что эта серия практически не отличается по качеству от серии 367 «щ», использовавшейся в течение 20–25 лет для производства вакцины туберкулезной (БЦЖ и БЦЖ-М). Образцы этих серий имели одинаковое содержание бакмассы в ампуле как по показателю оптической плотности, так и расчетное по весу. Показано, что посевные серии незначительно различались по дисперсности и содержанию жизнеспособных клеток в 1 мг препарата, термостабильности, вегетированию в органах животных, специфической безопасности при введении 100-кратной человеческой дозы морским свинкам, способности индуцировать ГЗТ к туберкулину и по защитной (протективной) способности. Таким образом, полученные в результате исследования данные показали, что как посевная серия 368 «щ» (2006), так и посевная серия 367 «щ» (1982), приготовленная около 35 лет назад, до настоящего времени стабильно сохраняют свои свойства. Это подтверждает адекватность и стабильность установленного в стране порядка изготовления, аттестации и хранения посевных серий субштамма *M. bovis* BCG-1 (Russia).

Литература

1. Аксенова ВА, Леви ДТ. Туберкулезные вакцины / Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. Зверев ВВ, Семенов БФ, Хаитов РМ, ред. М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2011. С. 371–411.
2. Roy A, Eisenhut M, Harris RJ, Rodrigues LC, Sridhar S, Habermann S, et al. Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014; 349: g4643.
3. Black GF, Weir RE, Floyd S, Bliss L, Warndorff DK, Crampin AC, et al. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet* 2002; 359(9315): 1393–401.
4. Мушкин АЮ. БЦЖ-оститы. Диагностика, критерии постановки и лечение. Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2004; (1): 21–3.
5. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines (Annex 3). WHO Technical Report Series No. 979, 2013.
6. Леви ДТ, Обухов ЮИ, Александрова НВ, Волкова РА, Эльберт ЕВ, Альварес Фигероа МВ и др. Оценка подлинности и стабильности вакцины БЦЖ методом мультиplexной ПЦР. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16(1): 49–54.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.
8. ФС. 3.3.1.0018.15. Вакцина туберкулезная БЦЖ живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 3. М.: 2015. С. 917–22. Available from: <http://femb.ru/feml>.
9. Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999; 17(7–8): 915–22.
10. Behr MA. Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Scand J Infect Dis*. 2001; 33(4): 249–52.
11. Corbel MJ, Fruth U, Griffiths E, Knezevic I. Report on a WHO consultation on the characterisation of BCG strains, Imperial College, London 15–16 December 2003. *Vaccine* 2004; 22(21–22): 2675–80.

12. Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine* 2009; 27(11): 1710–6.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Леви Диана Тимофеевна. Главный эксперт управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Александрова Наталья Владимировна. Главный эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Обухов Юрий Иванович. Начальник управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП.

Адрес для переписки: Леви Диана Тимофеевна; Levi@expmed.ru

Determination of residual virulence and immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG-1 seed lots

D. T. Levi, N. V. Aleksandrova, Yu. I. Obukhov

Federal State Budgetary Institution

«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The article is devoted to a challenging issue of stability of seed lot systems that have been used in Russia since 1947 to produce BCG vaccines. This problem is underexplored and needs further investigation. In an earlier study the authors of the article used innovative (molecular genetic) methods to demonstrate the conformity of BCG-1 seed lots used in Russia to the international reference reagent (*BCG Vaccine of Russian BCG-1 sub-strain-International Reference Reagent*) in terms of «Identification». This article lays out the results of new comparative studies of BCG-1 367 «Щ» (1982) and 368 «Щ» (2006). During the study special emphasis was put on such quality parameters as residual virulence (survival), specific safety (absence of virulent mycobacteria tuberculosis), sensitization effect (by induction of immune-mediated delayed hypersensitivity to tuberculin), and protective effects. The values obtained in the batches evaluation were very close and did not differ from the results obtained during certification performed just after the production of each seed lot. These results testify to the high degree of stability of the seed lots biological properties. The article also cites literary sources that address the issue in question.

Key words: BCG vaccine; BCG substrains; seed lot system; residual virulence; survival.

For citation: Levi DT, Aleksandrova NV, Obukhov Yul. Determination of residual virulence and immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG-1 seed lots. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(1): 48–53.

References

1. Aksanova VA, Levi DT. TB vaccines/Vaccines and vaccination. National manual. Zverev VV, Semenov BF, Haitov RM, eds. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. P. 371–411 (in Russian).
2. Roy A, Eisenhut M, Harris RJ, Rodrigues LC, Sridhar S, Habermann S, et al. Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014; 349: g4643.
3. Black GF, Weir RE, Floyd S, Bliss L, Warndorff DK, Crampin AC, et al. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet* 2002; 359(9315): 1393–401.
4. Mushkin AYu. BCG osteitis: diagnosis and treatment. *Problems of Tuberculosis and Lung Diseases* 2004; (1): 21–3 (in Russian).
5. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines (Annex 3). WHO Technical Report Series No. 979, 2013.
6. Levi DT, Obukhov Yul, Aleksandrova NV, Volkova RA, Elbert EV, Alvarez Figeroa MV, et al. Identity and stability assessment of BCG vaccine by multiplex PCR. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(1): 49–54 (in Russian).
7. Glantz SA. Primer of Biostatistics. Moscow: Praktika; 1999 (in Russian).
8. ФС. 3.3.1.0018.15. *Mycobacterium bovis* BCG vaccine (monograph). The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition. V. 3. Moscow; 2015. P. 917–22. Available from: <http://femr.ru/feml> (in Russian).
9. Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999; 17(7–8): 915–22.
10. Behr MA. Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Scand J Infect Dis*. 2001; 33(4): 249–52.
11. Corbel MJ, Fruth U, Griffiths E, Knezevic I. Report on a WHO consultation on the characterisation of BCG strains, Imperial College, London 15–16 December 2003. *Vaccine* 2004; 22(21–22): 2675–80.
12. Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine* 2009; 27(11): 1710–6.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Levi DT. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Aleksandrova NV. Chief expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Obukhov Yul. Head of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 615.37+615.27

Влияние рекомбинантного интерферона альфа-2b на относительное содержание CD56^{bright}-популяции натуральных киллеров в периферической крови беременных женщин с урогенитальными инфекциями

Е. Н. Выжлова¹, В. В. Малиновская¹, Е. В. Дмитриева¹, С. В. Новикова²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н. Ф. Гамалея»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области
«Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» Москва, Россия

Поступила 14.11.2016 г. Принята к публикации 07.02.2017 г.

Ослабление неспецифической резистентности организма во время беременности сопровождается активацией хронических урогенитальных инфекций, которые являются частой причиной внутриутробного инфицирования плода. В российской акушерско-гинекологической практике в комплексе дородовой подготовки беременных с урогенитальными инфекциями применяется препарат на основе рекомбинантного интерферона альфа-2b ВИФЕРОН® в лекарственной форме «суппозитории ректальные». Благоприятный клинический эффект препарата на течение беременности и перинатальный исход сопровождается снижением относительного содержания CD56^{bright}-популяции натуральных киллеров в периферической крови исследованных беременных женщин.

Ключевые слова: беременность; урогенитальные инфекции; внутриутробные инфекции; рекомбинантный интерферон альфа-2b; CD56^{bright}-популяция натуральных киллеров.

Библиографическое описание: Выжлова ЕН, Малиновская ВВ, Дмитриева ЕВ, Новикова СВ. Влияние рекомбинантного интерферона альфа-2b на относительное содержание CD56^{bright}-популяции натуральных киллеров в периферической крови беременных женщин с урогенитальными инфекциями. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 54–58.

Широкая распространенность среди населения урогенитальных инфекций (УГИ) представляет особую опасность для беременных женщин, поскольку УГИ у беременных являются основной причиной внутриутробного инфицирования плода (ВУИ). При этом случаи острых первичных УГИ беременных относительно редки, чаще имеет место активация хронических или латентных инфекций, что связано с ослаблением в период беременности как специфического [1–3], так и неспецифического иммунного ответа [4, 5]. В последние годы большое внимание исследователей уделяется определению роли эффекторных клеток врожденного иммунитета, в частности натуральных киллеров (НК), в патогенезе вирусных заболеваний [6, 7]. НК представлены в организме двумя основными субпопуляциями, которые отличаются по фенотипу (степени экспрессии молекулы CD56) и функциям [8]. Обладающая высокой цитотоксичностью CD56^{dim} субпопуляция составляет как минимум 90 % всех циркулирующих НК и имеет значительное содержание перфорина, гранзима и цитолитических гранул. CD56^{bright}-популяция составляет около 10 % от общего пула циркулирующих НК, однако эти клетки обнаруживаются как резиденты во вторичных лимфоидных органах и в нелимфоидных органах, таких как печень и матка [9]. CD56^{bright}-НК интенсивно секретируют цитокины (интерферон гамма, фактор некроза опухоли альфа, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и др.). Ряд исследований показывает изменение общего содержания НК и изменение соотношения CD56^{bright}/CD56^{dim}-популяции НК в периферической крови при вирусных заболеваниях, в частности при гриппе [10], в

том числе изучалось их содержание до и после вакцинации [11]; при вирусном гепатите С обнаружена прямая корреляция содержания CD56^{bright}-популяции НК с уровнем виремии [12]. В российской акушерско-гинекологической практике в комплексе дородовой подготовки беременных с урогенитальными инфекциями применяется препарат на основе рекомбинантного интерферона альфа-2b ВИФЕРОН®.

Целью настоящего исследования явилось изучение относительного содержания CD56^{bright}-популяции натуральных киллеров в периферической крови беременных женщин с урогенитальными инфекциями при лечении препаратом ВИФЕРОН®.

Материалы и методы

Основную группу исследования составили беременные группы риска по развитию внутриутробной инфекции (лабораторно-клинические признаки УГИ, рецидивы вульвовагинальной инфекции, воспалительные заболевания органов малого таза в анамнезе, синдром потери плода в анамнезе, осложнения настоящей беременности — перманентная угроза прерывания беременности) со сроком гестации 14–25 недель (группа 1, n = 30). После подписания информированного согласия на участие в исследовании группа 1 была рандомизирована на 2 группы, в одной из которых беременным проводилась стандартная терапия УГИ с целью профилактики ВУИ (группа 2, n = 15), а вторая группа в дополнении к стандартной терапии получала препарат интерферона альфа-2b ВИФЕРОН®, суп-

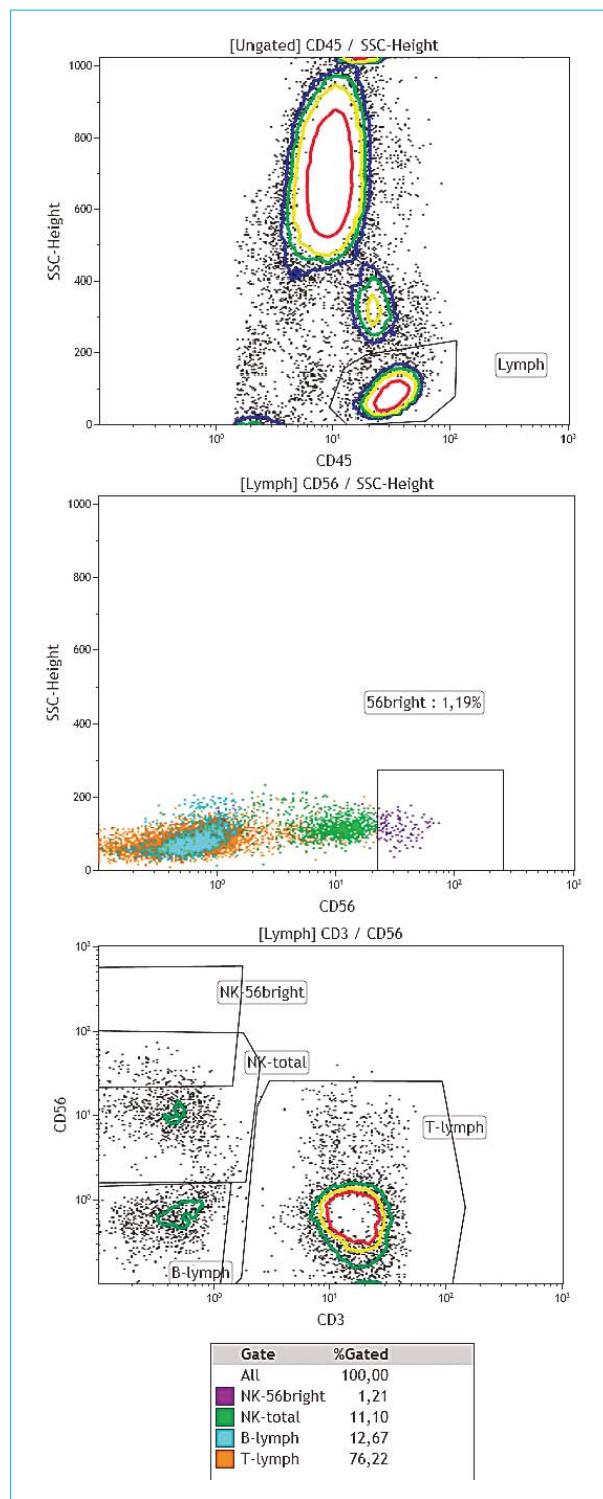


Рис. 1. Беременная В., 30 лет, уреаплазмоз, бактериальный вагиноз, кандидозный колыбель. Срок гестации 24 недели, до начала терапии. Относительное содержание натуральных киллеров (NK-total) — 11,10 % от общего числа лимфоцитов. Содержание CD56^{bright}-популяции НК (NK-56bright) — 1,21 % от общего числа лимфоцитов.

позитории ректальные, согласно схеме: ВИФЕРОН® 500000 МЕ по 1 суппозиторию через 12 ч (2 раза в день) в течение 10 дней; затем по 1 свече через 12 ч (2 раза в день) дважды в неделю — 10 суппозиторий; затем каж-

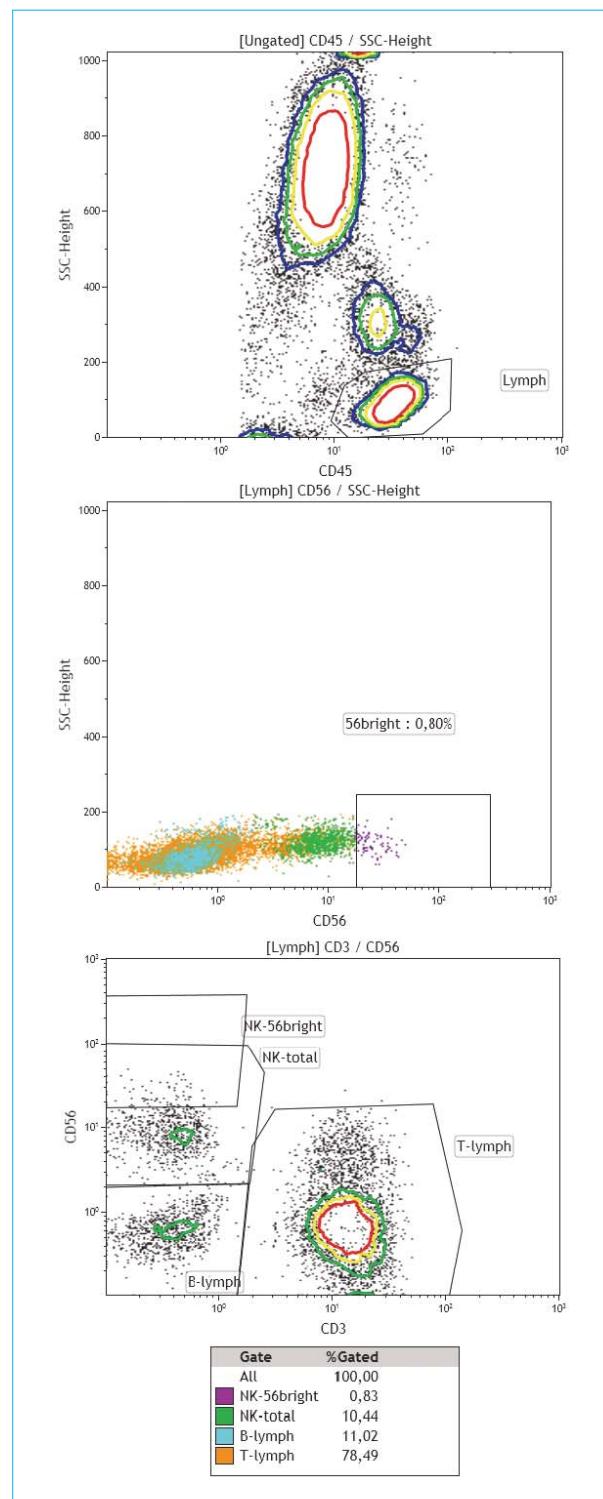


Рис. 2. Беременная В., срок гестации 39 недель, по окончании терапии. Самостоятельное родоразрешение на 40 неделе. Относительное содержание натуральных киллеров (NK-total) — 10,44 % от общего числа лимфоцитов, содержание CD56^{bright}-популяции НК (NK-56bright) — 0,83 % от общего числа лимфоцитов.

дые 4 недели повторяли профилактический стабилизирующий курс препарата ВИФЕРОН® 150000 МЕ по 1 суппозиторию каждые 12 ч в течение 5 дней (группа 3, n = 15). Забор венозной крови с целью проведения имму-

Таблица 1. Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов периферической крови исследованных беременных женщин

Субпопуляция лимфоцитов	1 группа (n = 30)	2 группа (n = 15)	3 группа (n = 15)	4 группа (n = 15)
T-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻), %	78,32±3,65 ^a	80,19±7,09 ^c	79,72±5,84 ^e	73,56±5,83
T-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	46,18±6,28 ^a	46,84±7,21 ^c	43,07±3,69	41,62±4,04
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	29,27±6,25	31,66±10,44	33,58±5,16	30,04±5,27
В-лимфоциты (CD3 ⁻ CD19 ⁺), %	9,42±2,78 ^a	9,14±4,0 ^c	10,08±3,04	13,02±4,64
НК (CD3 ⁻ CD56 ⁺), %	11,18±3,51	9,02±4,0	9,46±2,82	10,86±3,41
CD56 ^{bright} -НК (CD3 ⁻ CD56 ^{bright}), %	1,08±0,19 ^{a, b}	1,3±0,18 ^{c, d}	0,74±0,15	0,79±0,13

Примечания: 1. Данные представлены в виде среднего ±SD.

2. Группа 1: беременные с УГИ, до начала терапии, n = 30;

Группа 2: беременные с УГИ, не получавшие ВИФЕРОН® в комплексе дородовой подготовки, n = 15;

Группа 3: беременные с УГИ, получавшие ВИФЕРОН® в комплексе дородовой подготовки, начиная со второго триместра, n = 15;

Группа 4: беременные без лабораторно-клинических признаков УГИ, n = 15.

^a Достоверные различия между группами 1 и 4 ($p < 0,05$).

^b Достоверные различия между группами 1 и 3 ($p < 0,05$).

^c Достоверные различия между группами 2 и 4 ($p < 0,05$).

^d Достоверные различия между группами 2 и 3 ($p < 0,05$).

^e Достоверные различия между группами 3 и 4 ($p < 0,05$).

нофенотипирования осуществляли в группе 1 до начала рандомизации, а в группах 2 и 3 — по окончании терапии (на сроке гестации 26–40 недель). Группу сравнения составили 15 беременных женщин без клинико-лабораторных признаков УГИ на разных сроках гестации (8–40 недель) (группа 4, n = 15). На двухлазерном проточном цитофлуориметре FACSCalibur (производства фирмы «Becton Dickinson», США) с использованием моноклональных антител («Becton Dickinson», США) в образцах периферической крови исследовали относительное содержание следующих основных субпопуляций лимфоцитов: В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК и CD56^{bright}-популяции НК. Полученные данные статистически обрабатывали на программном обеспечении SPSS для Windows. Значимость различий полученных средних значений иммунофенотипирования лейкоцитов между выборками оценивали с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа one-way ANOVA. Отличия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Относительное содержание отдельных субпопуляций лимфоцитов, выраженное в процентах от общего числа лимфоцитов периферической крови исследованных беременных женщин, представлено в таблице 1. Для беременных с УГИ характерны более высокие уровни содержания Т-лимфоцитов (в том числе Т-хелперов) и CD56^{bright}-популяции НК по сравнению со здоровыми беременными женщинами. После лечения препаратом интерферона альфа-2b уровень CD56^{bright}-популяции НК в периферической крови исследованных беременных достоверно снижался до уровней, характерных для здоровых беременных, тогда как по окончании стандартной терапии УГИ изменений в субпопуляционном составе лимфоцитов по сравнению с аналогичными показателями до начала лечения не наблюдалось.

На рисунках 1 и 2 представлены гистограммы иммунофенотипирования клеток периферической крови пациентки с УГИ до начала лечения препаратом интерферона альфа-2b во втором триместре беременности (рис. 1), и по окончании лечения перед родоразрешением (рис. 2).

В процессе лечения содержание CD56^{bright}-популяции НК снизилось с 1,2 до 0,8 % от общего числа лейкоцитов периферической крови, что клинически сопровождалось уменьшением частоты бактериального вагиноза и осложнений беременности. Терапия препаратом интерферона альфа-2b обеспечила благоприятный исход беременности данной пациентки: на 40 неделе путем самостоятельного родоразрешения у нее родился клинически здоровый мальчик (вес 3800 г, 52 см, 8/9 баллов по Апгар, посевы из зева — роста нет, общий анализ крови — норма).

Заключение

Препарат рекомбинантного интерферона альфа-2b ВИФЕРОН® в лекарственной форме суппозитории рекタルные успешно применяется в российской акушерско-гинекологической практике около 20 лет в комплексе дородовой подготовки беременных с УГИ для профилактики ВУИ [13, 14].

Данные, полученные в ходе настоящего лабораторного исследования, подтверждают ранее показанный благоприятный клинический эффект препарата, который заключается в 1,5–2-кратном снижении частоты осложнений беременности и родов, более чем двукратном увеличении частоты рождения здоровых детей [15, 16]. Обнаружено достоверное увеличение относительного содержания CD56^{bright}-популяции НК в периферической крови беременных с УГИ по сравнению со здоровыми беременными, а также снижение CD56^{bright}-популяции НК в периферической крови беременных с УГИ, получавших ВИФЕРОН® в составе комплексной дородовой подготовки.

Полученные результаты расширяют наши представления о роли НК в элиминации вирусной инфекции и подчеркивают важность дальнейшего исследования механизмов действия препаратов экзогенного интерферона альфа в лечении хронических вирусных заболеваний.

Литература

1. Birkeland SA, Kristoffersen K. Lymphocyte transformation with mitogens and antigens during normal human pregnancy: a longitudinal study. Scand J Immunol. 1980; 11(3): 321–5.
2. Gehrz RC, Christianson WR, Linner KM, Conroy MM, McCue SA, Balfour HH Jr. A longitudinal analysis of lymphocyte proliferative

- responses to mitogens and antigens during human pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1981; 140(6): 665–70.
3. Thong YH, Steele RW, Vincent MM, Hensen SA, Bellanti JA. Impaired in vitro cell-mediated immunity to rubella virus during pregnancy. N^o Eng J Med. 1973; 289(12): 604–6.
 4. Veenstra van Nie wenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. Hum Reprod Update. 2003; 9(4): 347–57.
 5. Gregory CD, Lee H, Rees GB, Scott IV, Shah LP, Golding PR. Natural killer cells in normal pregnancy: analysis using monoclonal antibodies and single-cell cytotoxicity assays. Clin Exp Immunol. 1985; 62(1): 121–7.
 6. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol. 2008; 9(5): 503–10.
 7. Biron CA. Expansion, maintenance, and memory in NK and T cells during viral infections: responding to pressures for defense and regulation. PLoS Pathog. 2010; 6(3): e1000816.
 8. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset. Blood. 2001; 97(10): 3146–51.
 9. Melsen JE, Lugthart G, Lankester AC, Schilham MW. Human circulating and tissue-resident CD56^{bright} natural killer cell populations. Front Immunol. 2016; 7: article 262.
 10. Jost S, Quilly H, Reardon J, Peterson E, Simmons RP, Parry BA, et al. Changes in cytokine levels and NK cell activation associated with influenza. PLoS One. 2011; 6(9): e25060.
 11. Long BR, Michaelsson J, Loo CP, Ballan WM, Vu BA, Hecht FM, et al. Elevated frequency of gamma interferon-producing NK cells in healthy adults vaccinated against influenza virus. Clin Vaccine Immunol. 2008; 15(1): 120–30.
 12. Bozzano F, Picciotto A, Costa P, Marras F, Fazio V, Hirsch I, et al. Activating NK cells receptor expression / function (NKp30, NKp46, DNAM-1) during chronic viraemic HCV infection is associated with the outcome of combined treatment. Eur J Immunol. 2011; 41(10): 2905–14.
 13. Краснопольский ВИ, Тареева ТГ, Малиновская ВВ, Шугин ИО, Микаелян АВ, Никольская ИГ и др. Мониторинг беременных с вирусными инфекциями семейства герпеса. Медицинская технология. Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации. Министерство здравоохранения Московской области. М.; 2006.
 14. Буданов ПВ, Асланов АГ. Внутриутробные вирусные инфекции. Вопросы практической педиатрии 2006; 1(4): 16–7.
 15. Абаева ЗР. Влияние виферона на иммунитет новорожденных от матерей, инфицированных цитомегаловирусом и вирусом простого герпеса: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2001.
 16. Бочарова ИИ. Клинико-иммунологические варианты патологических состояний у новорожденных, родившихся у матерей с урогенитальной инфекцией (диагностика, прогнозирование, технологии ведения): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2008.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

Выжлова Евгения Николаевна. Старший научный сотрудник лаборатории онтогенеза и коррекции системы интерферона, канд. биол. наук.

Малиновская Валентина Васильевна. Руководитель лаборатории онтогенеза и коррекции системы интерферона, д-р биол. наук, профессор.

Дмитриева Елена Владиславовна. Научный сотрудник лаборатории онтогенеза и коррекции системы, канд. биол. наук.

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии». Российская Федерация, 101000, Москва, ул. Покровка, 22а.

Новикова Светлана Викторовна. Заведующая 2-м акушерским отделением, д-р мед. наук.

Адрес для переписки: Дмитриева Елена Владиславовна; ladyguinevere@mail.ru

The effect of recombinant interferon alpha-2b on the relative content of CD56^{bright} NK cells in the peripheral blood of pregnant women with chronic urogenital infections

E. N. Vyzhlova¹, V. V. Malinovskaya¹, E. V. Dmitrieva¹, S. V. Novikova²

¹ Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N. F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² State Budgetary Healthcare Institution of the Moscow region «Scientific Research Institute of Obstetrics and Gynecology of the Moscow Region», Moscow, Russia

Physiological immunodeficiency during pregnancy contributes to activation of chronic urogenital pathology which often causes intrauterine infections. Recombinant interferon-alpha based rectal suppositories VIFERON® are often used in Russia for treatment of pregnant women with urogenital pathology. The treatment results in a marked decrease in the number of pregnancy complications and perinatal pathology accompanied by a decrease in peripheral blood CD56^{bright} natural killer cells.

Key words: pregnancy; urogenital pathology; intrauterine infections; recombinant interferon-alpha; CD56^{bright} natural killer cells.

For citation: Vyzhlova EN, Malinovskaya VV, Dmitrieva EV, Novikova SV. The effect of recombinant interferon alpha-2b on the relative content of CD56^{bright} NK cells in the peripheral blood of pregnant women with chronic urogenital infections. BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2017; 17(1): 54–58.

References

1. Birkeland SA, Kristoffersen K. Lymphocyte transformation with mitogens and antigens during normal human pregnancy: a longitudinal study. *Scand J Immunol.* 1980; 11(3): 321–5.
2. Gehrz RC, Christianson WR, Linner KM, Conroy MM, McCue SA, Balfour HH Jr. A longitudinal analysis of lymphocyte proliferative responses to mitogens and antigens during human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1981; 140(6): 665–70.
3. Thong YH, Steele RW, Vincent MM, Hensen SA, Bellanti JA. Impaired in vitro cell-mediated immunity to rubella virus during pregnancy. *Nø Eng J Med.* 1973; 289(12): 604–6.
4. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update.* 2003; 9(4): 347–57.
5. Gregory CD, Lee H, Rees GB, Scott IV, Shah LP, Golding PR. Natural killer cells in normal pregnancy: analysis using monoclonal antibodies and single-cell cytotoxicity assays. *Clin Exp Immunol.* 1985; 62(1): 121–7.
6. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008; 9(5): 503–10.
7. Biron CA. Expansion, maintenance, and memory in NK and T cells during viral infections: responding to pressures for defense and regulation. *PLoS Pathog.* 2010; 6(3), e1000816.
8. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset. *Blood* 2001; 97(10): 3146–51.
9. Melsen JE, Lugthart G, Lankester AC, Schilham MW. Human circulating and tissue-resident CD56^{bright} natural killer cell populations. *Front Immunol.* 2016; 7: article 262.
10. Jost S, Quillay H, Reardon J, Peterson E, Simmons RP, Parry BA, et al. Changes in cytokine levels and NK cell activation associated with influenza. *PLoS One* 2011; 6(9): e25060.
11. Long BR, Michaelsson J, Loo CP, Ballan WM, Vu BA, Hecht FM, et al. Elevated frequency of gamma interferon-producing NK cells in healthy adults vaccinated against influenza virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15(1): 120–30.
12. Bozzano F, Picciotto A, Costa P, Marras F, Fazio V, Hirsch I, et al. Activating NK cells receptor expression / function (NKp30, NKp46, DNAM-1) during chronic viraemic HCV infection is associated with the outcome of combined treatment. *Eur J Immunol.* 2011; 41(10): 2905–14.
13. Krasnopol'skiy VI, Tareeva TG, Malinovskaya VV, Shuginin IO, Mikalyan AV, Nikolskaya IG, et al. Monitoring of pregnant women with herpes-virus family's infections. Medical Technology. Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation. Ministry of Health of Moscow region. Moscow: Moscow scientific research regional Institute of obstetrics and gynecology; 2006 (in Russian).
14. Budanov PV, Aslanov AG. Intrauterine infections. Voprosy prakticheskoi pediatrii 2006; 1(4): 16–7 (in Russian).
15. Abaeva ZR. Effect of viferon on the immunity of newborns from mothers with herpes and cytomegalovirus infections. Cand. Med. Sci. [thesis] Moscow; 2001 (in Russian).
16. Bocharova II. Clinical-immunological variations of the pathological states of newborns from mothers with urogenital infections (diagnosis, prognosis, treatment technology). Dr. Med. Sci. [dissertation]. Moscow; 2008 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N. F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Gamalei st. 18, Moscow 123098, Russian Federation.

Vyzhlova EN. Senior researcher of the Laboratory of Ontogenesis and Interferon System Improvement. Candidate of Biological Sciences.

Malinovskaya VV. Head of the Laboratory of Ontogenesis and Interferon System Improvement. Doctor of Biological Sciences, professor.

Dmitrieva EV. Researcher of the Laboratory of Ontogenesis and Interferon System Improvement. Candidate of Biological Sciences.

State Budgetary Healthcare Institution of the Moscow region «Scientific Research Institute of Obstetrics and Gynecology of the Moscow Region». Pokrovka st. 22a, Moscow 101000, Russian Federation.

Novikova SV. Head of the 2nd Obstetrics Hospital Unit. Doctor of Medical Sciences.

Валидация метода определения содержания активатора прекалликреина в препарате Альбумин человека

М. В. Томилин¹, Е. В. Филатова¹, М. М. Кузнецова¹, В. В. Судакова¹, Н. В. Зубкова²

¹ Филиал Федерального государственного унитарного предприятия

«Научно-производственное объединение «Микроген»

Министерства здравоохранения Российской Федерации в г. Нижний Новгород

«Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио»,

Нижний Новгород, Россия

² Федеральное государственное унитарное предприятие

«Научно-производственное объединение «Микроген»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 09.02.2017 г. Принята к публикации 07.02.2017 г.

Активатор прекалликреина (ПКА) рассматривается как один из важнейших факторов, определяющих безопасность препаратов крови, таких как альбумин и иммуноглобулин для внутривенного введения. Примеси ПКА в высокой концентрации могут вызывать нежелательные побочные эффекты у пациентов при введении препаратов крови. В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи (ГФ) Российской Федерации (XIII издание) препараты альбумина человека должны выдерживать испытание на количественное содержание активатора прекалликреина, однако описание метода отсутствует. Цель настоящей работы заключалась в валидации метода количественного определения ПКА в препаратах «Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий» 10 % и 20 % с использованием коммерческого набора PreKallikrein Activator Assay Kit PW301EP («Pathway Diagnostics Ltd», Великобритания). В результате валидации было установлено, что методика является правильной, линейной, прецизионной и специфичной. Метод характеризуется простотой проведения эксперимента, высокой точностью и сходимостью результатов, что позволяет использовать его в условиях контрольно-аналитической лаборатории. Показано, что во всех исследованных сериях препарата «Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий» 10 % и 20 %, выпущенных Филиалом ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Нижний Новгород «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио», содержание ПКА было менее 1 МЕ/мл, что соответствует требованиям, предъявляемым ГФ РФ к данным препаратам.

Ключевые слова: альбумин; активатор прекалликреина; валидация; метрологические характеристики; препараты крови.

Библиографическое описание: Томилин МВ, Филатова ЕВ, Кузнецова ММ, Судакова ВВ, Зубкова НВ. Валидация метода определения содержания активатора прекалликреина в препарате «Альбумин человека». БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 59–64.

Активатор прекалликреина (ПКА) представляет собой активную форму в виде продуктов распада XII фактора свертывания крови [1]. Фактор XII или фактор Хагемана циркулирует в крови в виде неактивного зимогена и легко разрушается до фрагментов — факторов XIIa и XIIIf (последний образуется вследствие протеолиза тяжелых цепей фактора XIIa). Такое превращение фактора XII осуществляется в тесной связи с калликреин-кининовой сигнальной системой и другими каскадными протеолитическими реакциями плазмы крови [2, 3]. ПКА запускает трансформацию прекалликреина в калликреин, что, в свою очередь, через серию биохимических реакций приводит к синтезу вазоактивного пептида — брадикинина [4]. Брадикинин, обладая мощным сосудорасширяющим действием, может вызвать гипотензивный эффект у пациентов при введении препаратов крови с высоким содержанием примесей ПКА [4, 5]. Кроме того, ПКА в высоких концентрациях может приводить не только к гипотензии, но и к вазодилатации [6], в связи с этим ПКА рассматривается как один из важнейших факторов, определяющих безопасность препаратов крови, таких как альбумин и иммуноглобулин для внутривенного введения.

В соответствии с Европейской фармакопеей (ЕФ) концентрация ПКА в инфузионных препаратах не должна превышать 35 МЕ/мл [7]. Отечественные производители в на-

стоящее время не контролируют препараты крови на содержание ПКА. В связи с утверждением Государственной Фармакопеи (ГФ) РФ (XIII издание), регламентирующей нормы содержания ПКА в препаратах альбумина, такая задача возникла. Согласно фармакопейной статье (ФС) 3.3.2.006.15 «Альбумин человека» количественное определение ПКА рекомендуется проводить хромогенным методом, однако описание метода в ГФ РФ XIII отсутствует [8].

Способ оценки концентрации ПКА, изложенный в статье 2.6.15 ЕФ, включает в себя этап получения субстрата прекалликреина из крови или плазмы с применением ионообменной хроматографии [9]. Данная процедура является длительной, сложной и плохо воспроизводимой, что затрудняет ее использование в лабораторных условиях для рутинного тестирования препаратов альбумина. Альтернативой данному способу является метод количественного определения ПКА в препаратах крови с помощью коммерческих наборов реагентов, однако их применение для контроля качества лекарственных средств требует валидации [10].

Цель настоящей работы заключалась в валидации метода количественного определения ПКА в препаратах Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % и 20 % с использованием коммерческого набора

PreKallikrein Activator Assay Kit PW301EP («Pathway Diagnostics Ltd», Великобритания).

мощью анализатора микропланшетного Sunrise™ («Tecan», Австрия) при основной длине волны 405 нм и референсной — 620 нм.

Материалы и методы

Для валидации методики использовали

- референс-стандарт (Prekallikrein activator in Albumin BRP batch 3) с аттестованным содержанием ПКА 30 МЕ/мл;
- производственные серии препарата Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % ($n = 3$) и 20 % ($n = 3$), выпущенные Нижегородским филиалом ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России.

Определение количественного содержания ПКА в исследуемых пробах выполняли в соответствии с инструкцией по применению набора PreKallikrein Activator Assay Kit («Pathway Diagnostics Ltd», Великобритания; кат. № PW301EP). Оценку результатов проводили после остановки реакции («по конечной точке», End point) с по-

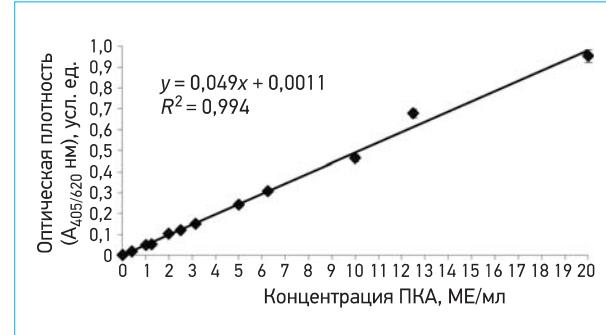


Рис. 1. График зависимости оптической плотности от концентрации ПКА.

Таблица 1. Метрологические характеристики результатов эксперимента по определению правильности

Значение концентрации ПКА в образце, принимаемое за истинное, МЕ/мл	№ исследования	Концентрация ПКА, МЕ/мл	\bar{x}	S^2	S	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	Доверительный интервал ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$)
0	1	0,1816	0,056	0,0039	0,0625	0,0255	0,066	0–0,122
	2	0,0184						
	3	0,0388						
	4	0,0184						
	5	0,0388						
	6	0,0388						
0,625	1	0,6714	0,641	0,0025	0,0496	0,0202	0,052	0,589–0,693
	2	0,651						
	3	0,6918						
	4	0,5898						
	5	0,6714						
	6	0,5694						
4,4	1	4,6306	4,413	0,1291	0,3593	0,1467	0,377	4,036–4,790
	2	3,9163						
	3	3,998						
	4	4,6102						
	5	4,5694						
	6	4,7531						
12,7	1	12,651	12,835	0,0731	0,2705	0,1104	0,284	12,551–13,115
	2	12,8959						
	3	13,1408						
	4	13,0592						
	5	12,8551						
	6	12,4061						
35	1	34,894	34,758	0,0750	0,2739	0,1118	0,287	34,471–35,045
	2	34,690						
	3	34,853						
	4	34,853						
	5	34,241						
	6	35,016						

При валидации методики определяли линейность, правильность, прецизионность и специфичность в соответствии с ОФС 1.1.0012.15 ГФ РФ XIII [11].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel в соответствии с ОФС 1.1.0013.15 ГФ РФ XIII [12].

Результаты и обсуждение

Проведена валидация методики определения количественного содержания ПКА в препаратах Альбумин (Альбу-

мин человека), раствор для инфузий 10 % и 20 % с применением коммерческого набора реагентов PreKallikrein Activator Assay Kit («Pathway Diagnostics Ltd», Великобритания). В основе конструкции тест-системы лежит метод, описанный в ЕФ. Принцип метода основан на способности ПКА превращать прекалликреин плазмы в калликреин, который, в свою очередь, расщепляет хромофор синтетического пептида L-пролин-фенилаланин-L-аргинин-P-нитроанилина (калликреиновый субстрат) с образованием окрашенных продуктов. Степень окраски оценивали спектрофотометрическим методом, при этом интенсив-

Таблица 2. Метрологические характеристики результатов, полученных при оценке сходимости и внутрилабораторной прецизионности

Препарат	<i>n</i>	Концентрация ПКА, МЕ/мл		\bar{x}	S^2		S	$S\bar{x}$	$S_r, \%$	$F_{\text{эксп}}$	$F_{\text{таб}}$
		1 день	2 день	1 день	1 день	2 день	1 день	1 день	1 день		
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 %	140315	1	0,427	0,252	0,417	0,000132	0,000132	0,0115	0,0047	1,126	1,00
		2	0,406	0,273							
		3	0,406	0,252							
		4	0,427	0,273							
		5	0,427	0,273							
		6	0,406	0,252							
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 20 %	160315	1	0,406	0,252	0,399	0,000107	0,000110	0,0103	0,0042	1,057	0,97
		2	0,406	0,231							
		3	0,386	0,231							
		4	0,406	0,252							
		5	0,386	0,231							
		6	0,406	0,252							
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 20 %	170315	1	0,835	0,648	0,798	0,000896	0,000513	0,0299	0,0122	1,532	1,75
		2	0,794	0,71							
		3	0,774	0,669							
		4	0,774	0,669							
		5	0,835	0,648							
		6	0,774	0,67							
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 20 %	010315	1	0,330	0,346	0,348	0,000956	0,000485	0,0309	0,0126	3,632	2,00
		2	0,393	0,325							
		3	0,309	0,367							
		4	0,372	0,325							
		5	0,330	0,304							
		6	0,351	0,346							
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 20 %	020315	1	0,456	0,513	0,456	0,000353	0,000110	0,0188	0,0077	1,682	3,24
		2	0,456	0,492							
		3	0,435	0,492							
		4	0,477	0,513							
		5	0,435	0,492							
		6	0,477	0,513							
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 20 %	210315	1	0,540	0,617	0,526	0,002940	0,000804	0,0542	0,0221	4,208	3,63
		2	0,477	0,596							
		3	0,519	0,638							
		4	0,603	0,638							
		5	0,456	0,617							
		6	0,561	0,679							

Таблица 3. Метрологические характеристики результатов эксперимента по определению специфичности

Характеристика образца		\bar{x}	S^2	S	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	Теоретическое значение ПКА в образце, МЕ/мл	Recovery, %
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % (140315)	Xn	0,417	0,0001	0,0115	0,0047	—	0,417	100
	$Xn + 0,5$ мл	2,805	0,0102	0,1011	0,0720	0,909	2,710	103,51
	$Xn + 1$ мл	3,590	0,0300	0,1732	0,1230	1,557	3,470	103,46
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 20 % (020315)	Xn	0,456	0,0004	0,0188	0,0077	—	0,456	100
	$Xn + 0,5$ мл	2,620	0,0221	0,1485	0,1050	0,334	2,728	96,04
	$Xn + 1$ мл	3,649	0,0318	0,1782	0,1260	1,601	3,485	104,71

ность окраски прямо пропорциональна концентрации ПКА в препарате.

Задачей валидации аналитической методики было определение ее метрологических характеристик, а именно, линейности, правильности, специфичности и прецизионности (в виде сходимости и внутрилабораторной прецизионности).

Для оценки линейности готовили и тестировали калибровочные образцы с концентрацией ПКА 0 МЕ/мл (буферный раствор) и растворы стандартного образца ПКА, входящего в состав тест-системы, в диапазоне концентраций 0,4–20 МЕ/мл. Находили оптическую плотность (ОП) образцов и строили калибровочный график зависимости значений ОП от концентрации ПКА (рис. 1). Полученные результаты обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной (трендовой) модели. Коэффициент достоверности аппроксимации (R^2) составил 0,994, что свидетельствует о линейности методики.

Правильность методики устанавливали путем оценки отклонения среднего результата от значения, принятого за истинное. Тестировали образцы с концентрацией ПКА 0 и 35 МЕ/мл, входящие в состав тест-системы, а также растворы референс-стандарта ЕФ с концентрацией ПКА 0,625; 4,4 и 12,7 МЕ/мл, и находили содержание ПКА в исследуемых образцах. В процессе обработки результатов определяли следующие метрологические характеристики: среднее значение определяемой величины (\bar{x}), дисперсия (S^2), стандартное отклонение (S), стандартное отклонение среднего результата ($S\bar{x}$). Устанавливали доверительный интервал средних результатов анализа ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$), полученных экспериментально, при доверительной вероятности 95 %. Показано, что значения, принятые за истинные, находятся внутри доверительного интервала, что позволяет считать методику правильной (табл. 1).

Для оценки сходимости (повторяемости) результатов, полученных в одинаковых условиях в пределах короткого промежутка времени, тестировали по 3 производственных серии препаратов Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % (технологические серии 140315, 160315 и 170315) и 20 % (технологические серии 010315, 020315 и 210315) на количественное содержание ПКА. Каждый образец анализировали в 6 повторах. Аналогичное исследование было выполнено в другой день с целью оценки внутрилабораторной прецизионности. Величина относительного стандартного отклонения (S_r) не превышала 6 %, т.е. результаты, полученные при оценке сходимости методики, удовлетворяли критериям приемлемости. Внутрилабораторную прецизионность устанавливали по критерию

Фишера (F), сравнивая значения критерия Фишера, полученного экспериментально ($F_{эксп}$), с табличным значением ($F_{таб}$) при доверительной вероятности 95 %. Как видно из данных, представленных в таблице 2, полученные результаты полностью удовлетворяли критериям приемлемости.

Одним из важных критериев валидации методики является специфичность. Для оценки специфичности применяли метод добавок, используя раствор референс-стандarta ПКА с концентрацией 5 МЕ/мл. Добавляли к 0,5 мл препарата Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % и 20 % (Xn) раствор референс-стандarta ПКА в объеме 0,5 мл ($Xn + 0,5$) и 1,0 мл ($Xn + 1$). Рассчитывали теоретическое значение концентрации ПКА в пробах с добавками, учитывая содержание ПКА в препаратах альбумина, установленное при оценке прецизионности. Определяли практическое значение ПКА в исследуемых образцах, рассчитывали метрологические характеристики и оценивали коэффициент восстановления (Recovery), который по данным производителя набора должен находиться в диапазоне 96–105 %.

Как видно из результатов, представленных в таблице 3, для анализируемых образцов коэффициент восстановления находился внутри интервала, заявленного производителем, и составил 96,04–104,71 %.

Содержание ПКА в препаратах Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % и 20 %, было менее 1 МЕ/мл (табл. 2), что соответствует требованиям, предъявляемым ГФ РФ XIII к данным препаратам [8].

Таким образом, в рамках исследований по разработке методов контроля, направленных на обеспечение безопасности и качества препаратов из плазмы крови человека, рекомендованных ЕФ [13], были проведены валидационные исследования метода количественного определения активатора прекалликреина в препаратах Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % и 20 %. В результате валидации было установлено, что методика является правильной, линейной, прецизионной и специфичной. Кроме того, метод характеризуется простотой проведения эксперимента, высокой точностью и сходимостью результатов, что позволяет использовать его в условиях контрольно-аналитической лаборатории.

Литература

1. Kuwahara SS. Prekallikrein activator (Hageman factor fragment) in human plasma fractions. *Transfusion* 1980; 20(4): 433–9.
2. Гельцер БИ, Жилкова НН. Активность калликреин-кининовой системы у больных витамин B12-дефицитной анемией. *Бюллетень СО РАМН*. 2005; 117(3): 131–4.

3. Aubakirova AK. Оценка состояния калликреин-кининовой системы крови у недоношенных детей с перинатальной асфиксиею. Вестник КРСУ. 2010; 10(4): 105–11.
4. Cyr M, Eastlund T, Blais C Jr, Rouleau JL, Adam A. Bradykinin metabolism and hypotensive transfusion reactions. Transfusion 2001; 41(1): 136–50.
5. Nezlin R. Interactions between immunoglobulin G molecules. Immunol Lett. 2010; 132(1–2): 1–5.
6. WHO. Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series. 1985. № 725. P. 18.
7. Seifner A, Beck G, Bayer P, Eichmeir S, Lackner F, Rögelsperger O, et al. Assessment of immunoglobulin concentrates on thrombogenic activity by thrombin generation assay, prekallikrein activator assay, and size-exclusion chromatography. Transfusion 2014; 54(2): 376–83.
8. ФС. 3.3.2.0006.15. Альбумин человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. М.; 2015. С. 1234–8. Available from: <http://femb.ru/feml>.
9. 2.6.15. Prekallikrein activator. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
10. Приказ Минпромторга России от 14 июня 2013 № 916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств».
11. ОФС. 1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. С. 222–34. Available from: <http://femb.ru/feml>.
12. ОФС. 1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. С. 235–64. Available from: <http://femb.ru/feml>.
13. Human albumin solution. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.

Об авторах

Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Нижний Новгород «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио». Российская Федерация, 603950, Нижний Новгород, ул. Грузинская, д. 44.

Томилин Михаил Вадимович. Начальник научно-производственной лаборатории научного отдела, кандидат биологических наук.

Филатова Екатерина Викторовна. Начальник научного отдела, кандидат биологических наук.

Кузнецова Мария Михайловна. Технолог цеха диагностических препаратов

Судакова Вера Вячеславовна. Микробиолог научно-производственной лаборатории научного отдела.

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России. Российская Федерация, 127473, Москва, 2-й Волконский переулок, д. 10.

Зубкова Наталья Васильевна. Заместитель директора Центра разработок и внедрения (R&D) по препаратам крови, доктор фармацевтических наук.

Адрес для переписки: Томилин Михаил Вадимович; tomilin@imbio.ru

Validation of the method for determination of prekallikrein activator in Human Albumin

M. V. Tomilin¹, E. V. Filatova¹, M. M. Kuznetsova¹, V. V. Sudakova¹, N. V. Zubkova²

¹ Branch of Federal State Unitary Enterprise «Scientific Production Association «Microgen» Nizhny Novgorod Enterprise of Bacterial Preparations Production «ImBio», Nizhny Novgorod, Russia

² Federal State Unitary Enterprise «Scientific Production Association «Microgen», Moscow, Russia

Prekallikrein activator (PKA) is regarded as one of the most important factors determining the safety of blood products such as albumin and intravenous immunoglobulin. PKA impurity at a high concentration may cause undesired side effects when administered to patients of blood products. According to requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (13th edition) human albumin preparations have to pass test for the quantitative determination of prekallikrein activator (PKA), but there is no description of the method. The purpose of this study consisted in validation of a method of the quantitative definition of PKA in the preparations Albumin (human albumin) solution for infusions 10 % and 20 % with use of the commercial kit PreKallikrein Activator Assay Kit PW301EP («Pathway Diagnostics Ltd», UK). It is established that the method is accurate, linear, high-precision and specific. The method is characterized by the simplicity of the experiment, high accuracy and reproducibility that can be used in terms of control and analytical laboratories. It is shown that in all investigated batches of the drug Albumin (human albumin) solution for infusion 10 % and 20 % PKA content was less than 1 IU/ml, which corresponds to the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation to these drugs.

Key words: albumin; prekallikrein activator (PKA); validation; the metrological characteristics; blood products.

For citation: Tomilin MV, Filatova EV, Kuznetsova MM, Sudakova VV, Zubkova NV. Validation of the method for determination of prekallikrein activator in Human Albumin. BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2017; 17(1): 59–64.

References

1. Kuwahara SS. Prekallikrein Activator (Hageman Factor Fragment) In Human Plasma Fractions. Transfusion 1980; 20: 433–9.
2. Geltser BI, Zhilkova NN. The activity of the kallikrein-kinin system in patients with vitamin B12 is-deficiency anemia. Bulletin SB RAMS 2005; 117: 131–4 (in Russian).
3. Aubakirova AK. Assessment of the kallikrein-kinin blood system in preterm infants with perinatal asphyxia. Herald KRSU 2010; 10: 105–11 (in Russian).
4. Cyr M, Eastlund T, Blais Ch, Rouleau J, Adam A. Bradykinin metabolism and hypotensive transfusion reactions. Transfusion 2001; 41: 136–50.
5. Nezlin R. Interactions between immunoglobulin G molecules. Immunology Letters 2010; 132: 1–5.
6. WHO. Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 1985. № 725. P. 18.
7. Seifner A, Beck G, Bayer P, Eichmeir S, Lackner F, Rögelsperger O, et al. Assessment of immunoglobulin concentrates on thrombogenic activity by thrombin generation assay, prekallikrein acti-

- vator assay, and size-exclusion chromatography. *Transfusion* 2014; 54: 376–83.
8. Human albumin (ФС 3.3.2.006.15). State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed. 2015. V. 3. P. 1234–8. Available from: <http://www.femb.ru> (in Russian).
9. 2.6.15. Prekallikrein activator. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
10. Order of the Industry and Trade Ministry of Russia from 14.06.2013 № 916 «On approval of the Rules of production and quality control organization Medicines» (in Russian).
11. Validation of analytical methods (ОФС 1.1.0012.15). State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed. 2015. V. 1. P. 222–34. Available from: <http://www.femb.ru> (in Russian).
12. Statistical analysis of the results of chemical experiment (ОФС 1.1.0013.15). State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed. 2015. V. 1. P. 235–64. Available from: <http://www.femb.ru> (in Russian).
13. Human albumin solution. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.

Authors

Branch of Federal State Unitary Enterprise «Scientific Production Association «Microgen» Nizhny-Novgorod Enterprise of Bacterial Preparations Production «ImBio». The Russian Federation, 603950, Nizhny Novgorod, Gruzinskaja street, 44.

Tomilin MV. Head of the scientific and industrial laboratory of the scientific department. Candidate of biological sciences.

Filatova EV. Head of the scientific department, candidate of biological sciences.

Kuznetsova MM. Technologist of department of diagnostic products.

Sudakova VV. Microbiologist of scientific and industrial laboratory of the scientific department.

Federal State Unitary Enterprise «Scientific Production Association «Microgen», 127473, Moscow, 2nd Volkonsky lane, 10.

Zubkova NV. Deputy Director of R&D Center Microgene. Doctor of Pharmacy.