

БИОПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Том 18, № 2
Апрель – июнь 2018



В НОМЕРЕ

Адьюванты на основе углеводов для производства вакцин

Туберкулезная вакцина БЦЖ: иммунологическая и клиническая
эффективность у детей, рожденных от женщин с ВИЧ-инфекцией

ISSN 2221-996X



9 772221 996004

Редакция журнала не несет ответственности за содержание рекламных материалов.

Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции журнала.

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами для авторов, размещенными на сайте журнала.

Все статьи проходят рецензирование двумя рецензентами. Используется модель двойного слепого рецензирования.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается. Ускоренная публикация не допускается.

Труды заочных конференций не публикуются.

БИО ПРЕПАРАТЫ

**ПРОФИЛАКТИКА,
ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ**

Рецензируемый научно-практический журнал
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Том 18, № 2
Апрель – июнь 2018

BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie
[**BIO**preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]

Peer-reviewed scientific and practical journal of
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Volume 18, No. 2
April – June 2018

«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» — журнал ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Создан в 2001 г. как периодическое научное издание Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича. В журнале рассматриваются вопросы разработки, стандартизации, контроля качества, производства и применения медицинских биологических препаратов, а также диагностики инфекционных, аллергических и иммунопатологических процессов.

В журнале публикуются обзорные и оригинальные статьи, область исследований которых соответствует **медицинской и биологической отраслям науки** и следующим группам специальностей: **03.01.00 Физико-химическая биология, 14.01.00 Клиническая медицина, 14.03.00 Медико-биологические науки.**



Л. А. Тарасевич

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Олефир Юрий Витальевич, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Меркулов Вадим Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор

Бондарев Владимир Петрович, доктор медицинских наук, профессор

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Климов Владимир Иванович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник

НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ

Гойкалова Ольга Юрьевна,
кандидат биологических наук, доцент
Лебединская Елена Владимировна,
кандидат биологических наук

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Авдеева Жанна Ильдаровна, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)
Бакулин Михаил Константинович, доктор медицинских наук, профессор (Киров, Россия)
Борисевич Игорь Владимирович, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)
Воробьева Мая Сергеевна, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)
Дармов Илья Владимирович, доктор медицинских наук, профессор (Киров, Россия)
Дегтярев Сергей Харитонович, доктор биологических наук, профессор (Новосибирск, Россия)
Иванов Вячеслав Борисович, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)
Игнатьев Георгий Михайлович, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)
Леви Диана Тимофеевна, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)
Медуницын Николай Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)
Мовсисянц Арташес Авакович, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)
Мосягин Вячеслав Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор (Москва, Россия)
Пащенко Юрий Иванович, доктор биологических наук, профессор (Сергиев Посад, Московская область, Россия)
Хамитов Равиль Авгатович, доктор медицинских наук, профессор (Вольгинский, Владимирская область, Россия)

РЕДАКТОР

Шестакова Алина Павловна

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Амвросьева Тамара Васильевна, доктор медицинских наук, профессор (Минск, Республика Беларусь)
Борисевич Сергей Владимирович, доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН (Сергиев Посад, Московская область, Россия)
Брико Николай Иванович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)
Волчков Виктор Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор (Лион, Франция)
Гинцбург Александр Леонидович, доктор биологических наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)
Дятлов Иван Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Оболенск, Московская область, Россия)
Зверев Виталий Васильевич, доктор биологических наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)
Кутырев Владимир Викторович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Саратов, Россия)
Львов Дмитрий Константинович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)
Михайлов Михаил Иванович, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)
Покровский Валентин Иванович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)
Савченко Валерий Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)
Учайкин Василий Федорович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)
Хаитов Рахим Мусаевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия)
Чумаков Константин Михайлович, доктор биологических наук (Силвер-Спринг, Мэриленд, США)

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment] — a journal of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia. It was established in 2001 as a scientific journal of the L.A. Tarasevich State Scientific Research Institute for Standardization and Control of Biological Medicinal Products. It covers such issues as development, standardization, quality control, production and use of medicinal biological products, as well as diagnosis of infectious, allergic and immunopathological processes.

The journal publishes review papers and research articles pertaining to **biological and medical areas of research** and one of the following specialist fields: **03.01.00 Physicochemical Biology, 14.01.00 Clinical Medicine, 14.03.00 Medical and Life Sciences.**



L. A. Tarasevich

EDITOR-IN-CHIEF

Yuri V. Olefir, Doctor of Medical Sciences, Senior Research Associate

DEPUTY EDITORS-IN-CHIEF

Vadim A. Merkulov, Doctor of Medical Sciences, Professor

Vladimir P. Bondarev, Doctor of Medical Sciences, Professor

EXECUTIVE EDITOR

Vladimir I. Klimov, Candidate of Medical Sciences, Senior Research Associate

EDITOR

Alina P. Shestakova

SCIENCE EDITORS

Olga Yu. Goykalova,

Candidate of Biological Sciences, Assistant Professor

Elena V. Lebedinskaya,

Candidate of Biological Sciences

EDITORIAL BOARD

Zhanna I. Avdeeva, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

Mikhail K. Bakulin, Doctor of Medical Sciences, Professor (Kirov, Russia)

Igor V. Borisevich, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

Maya S. Vorobieva, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

Ilya V. Darmov, Doctor of Medical Sciences, Professor (Kirov, Russia)

Sergey Kh. Degtyarev, Doctor of Biological Sciences, Professor (Novosibirsk, Russia)

Vyacheslav B. Ivanov, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

Georgy M. Ignatyev, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

Diana T. Levi, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

Nikolay V. Medunitsyn, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

Artashes A. Movsesyants, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

Vyacheslav D. Mosyagin, Doctor of Medical Sciences, Professor (Moscow, Russia)

Yuri I. Pashchenko, Doctor of Biological Sciences, Professor (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

Ravil A. Khamitov, Doctor of Medical Sciences, Professor (Volginsky, Vladimir Region, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Tamara V. Amvrosyeva, Doctor of Medical Sciences, Professor (Minsk, Republic of Belarus)

Sergey V. Borisevich, Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

Nikolay I. Briko, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

Viktor E. Volchkov, Doctor of Medical Sciences, Professor (Lyon, France)

Aleksandr L. Gintsburg, Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

Ivan A. Dyatlov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Obolensk, Moscow Region, Russia)

Vitaly V. Zverev, Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

Vladimir V. Kuttyrev, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Saratov, Russia)

Dmitry K. Lvov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

Mikhail I. Mikhaylov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS (Moscow, Russia)

Valentin I. Pokrovsky, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

Valery G. Savchenko, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

Vasily F. Uchaykin, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

Rakhim M. Khaitov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS (Moscow, Russia)

Konstantin M. Chumakov, Doctor of Biological Sciences (Silver Spring, Maryland, USA)

БИОПРЕПАРАТЫ

Том 18, № 2
Апрель – июнь 2018

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал

СОДЕРЖАНИЕ

Редакционная статья

Творчество Льва Александровича Тарасевича в области иммунологии и вакцинологии.

К 150-летию со дня рождения

Н. В. Медуницын 72

Обзоры

Молекулярно-биологические методы контроля качества субстанций биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК

Е. Д. Мыца, Н. В. Чертова, Е. В. Эльберт, А. С. Сухно, Р. А. Волкова, В. А. Меркулов 75

Адъюванты на основе углеводов для производства вакцин

С. С. Курашова, Т. К. Дзагурова, А. А. Ишмухаметов, М. С. Егорова, М. В. Баловнева,
С. Е. Соцкова, Е. А. Ткаченко 81

Оригинальные статьи

Характеристика кандидата в стандартные образцы аллергена из пыльцы тимopheевки луговой по белковому профилю и специфическим аллергенным компонентам

И. В. Цымбаревич, И. С. Ефимова, С. П. Калинин, А. В. Зубков, С. А. Мазурина, Н. А. Михайлова,
Н. В. Зубкова 92

Разработка и валидация методики определения невидимых механических включений в воде для инъекций с применением метода Култера (электрочувствительных зон)

А. А. Воропаев, О. В. Фадейкина, Т. Н. Ермолаева, Д. С. Давыдов, Р. А. Волкова, Д. В. Шведов 98

Трипсин. Свойства и применение в производстве биологических лекарственных препаратов

С. М. Суханова, Е. М. Петручук, А. А. Генералов 106

Туберкулезная вакцина БЦЖ: иммунологическая и клиническая эффективность у детей, рожденных от женщин с ВИЧ-инфекцией

Н. И. Клевно, В. А. Аксенова 114

Оценка стабильности показателей качества отечественной вакцины против гриппа, предназначенной для иммунизации населения в течение эпидемического сезона 2017–2018 гг.

П. В. Демидова, К. М. Мефед, Д. С. Давыдов, К. А. Саркисян, А. А. Мовсисянц, В. А. Меркулов 121

Хроника

Вячеслав Дмитриевич Мосягин (к 55-летию со дня рождения) 133

Свидетельство о регистрации средства массовой информации:
ПИ № ФС77-53128 от 14.03.2013

Учредитель:

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

Адрес редакции: 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

E-mail: biopreparaty@expmc.ru

Телефон: +7 (495) 234-61-04, доб. 63-35, 63-42, 63-08, 63-36

Журнал включен в наукометрическую базу данных
Science Index

Сайт: www.biopreparations.ru

© ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2018

Издатель: ООО «Ваше Цифровое Издательство»

Юридический адрес: 109263, Москва, ул. Шкулева, д. 9, к. 2

E-mail: isupport@neicon.ru

Телефон/факс: +7 (499) 754-99-93

Сайт: http://elpub.ru

Подписано в печать: 18.05.2018

Формат 60×90/8. Усл. печ. л. 8,25

Бумага мелованная. Печать офсетная

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

CONTENTS

Editorial

**Works of Lev Aleksandrovich Tarasevich in the Field of Immunology and Vaccinology.
On the Occasion of the 150th Anniversary of His Birth**

N. V. Medunitsyn 72

Reviews

**Molecular-Biological Methods of Quality Control of Biological Active Substances
Produced by Recombinant DNA Technology**

E. D. Mytsa, N. V. Chertova, E. V. Elbert, A. S. Sukhno, R. A. Volkova, V. A. Merkulov 75

Carbohydrate-Based Adjuvants for Vaccine Production

S. S. Kurashova, T. K. Dzagurova, A. A. Ishmukhametov, M. S. Egorova, M. V. Balovneva,
S. E. Sotskova, E. A. Tkachenko 81

Original Articles

**Characterization of the Candidate Reference Material of Timothy Pollen Allergen Extract
in Terms of Protein Profile and Specific Allergenic Components**

I. V. Tcybarevich, I. S. Efimova, S. P. Kalinin, A. V. Zubkov, S. A. Mazurina, N. A. Mikhailova,
N. V. Zubkova 92

**Development and Validation of a Procedure for Subvisible Particles Determination in Water
for Injections by the Coulter Principle (Electrical Sensing Zone Method)**

A. A. Voropaev, O. V. Fadeikina, T. N. Ermolaeva, D. S. Davydov, R. A. Volkova, D. V. Shvedov 98

Trypsin. Properties and Use in the Production of Biological Medicinal Products

S. M. Sukhanova, E. M. Petruchuk, A. A. Generalov 106

**BCG Tuberculosis Vaccine: Immunological and Clinical Efficacy
in Children Born to HIV-Infected Women**

N. I. Klevno, V. A. Aksenova 114

**Analysis of Batch to Batch Consistency of a Locally Produced Influenza Vaccine
for the 2017–2018 Influenza Season**

P. V. Demidova, K. M. Mefed, D. S. Davydov, K. A. Sarkisyan, A. A. Movsesyants, V. A. Merkulov 121

Chronicle

Vyacheslav Dmitriyevich Mosyagin (on the 55th Anniversary) 133

Mass media registration certificate:

ПМ № ФС77-53128 of March 14, 2013

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

Postal address: 8/2 Petrovsky boulevard, Moscow 127051

E-mail: biopreparaty@expmed.ru

Phone: +7 (495) 234-61-04, ext. 63-35, 63-42, 63-08, 63-36

The journal is included in the Science Index scientometric
database

Website: www.biopreparations.ru

© FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, 2018

Publisher: «Your Digital Publishing» LLC

Registered office: 9/2 Shkuleva street, Moscow 109263

E-mail: isupport@neicon.ru

Phone/fax: +7 (499) 754-99-93

Website: http://elpub.ru

Passed for printing: May 18, 2018

Format 60×90/8. Conventional printed sheets: 8.25

Enamel-paper. Offset printing



Творчество Льва Александровича Тарасевича в области иммунологии и вакцинологии. К 150-летию со дня рождения

Works of Lev Aleksandrovich Tarasevich in the Field of Immunology and Vaccinology. On the Occasion of the 150th Anniversary of His Birth

Лев Александрович Тарасевич (1868–1927 гг.), двоюродный брат по происхождению, — выдающийся иммунолог, микробиолог, эпидемиолог, патолог и организатор здравоохранения.

Л.А. Тарасевич родился 2 февраля 1868 г. в г. Тирасполе Херсонской губернии. В 1886 г. окончил Кишиневскую гимназию, в 1891 г. — Новороссийский университет в Одессе, а в 1897 г. — Парижский университет. В 1899 г. работал в Киевском университете на кафедре общей патологии у В.В. Подвысоцкого, а в 1900–1901 гг. — в лаборатории И.И. Мечникова Пастеровского института в Париже. Был одним из любимых учеников И.И. Мечникова и последователем его клеточной теории иммунитета.

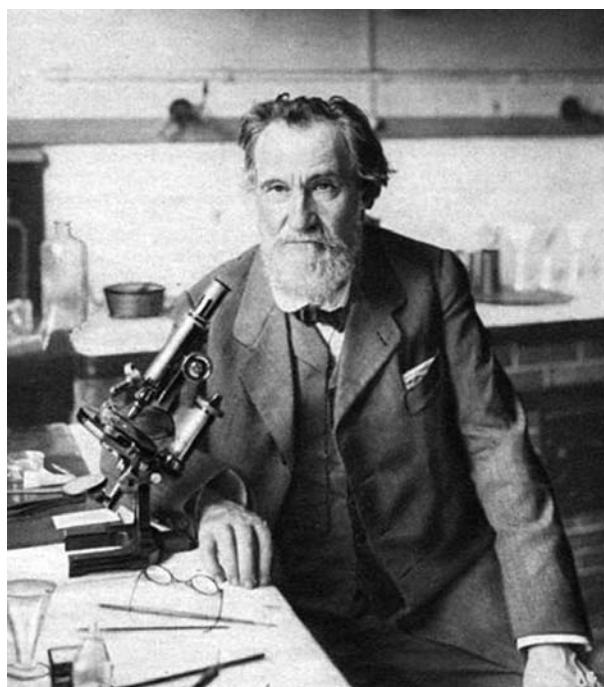
В 1902–1907 гг. Лев Александрович был приват-доцентом в Новороссийском университете, а с 1907 по 1911 г. — в Московском университете. В 1911 г. вместе с другими преподавателями покинул Московский университет в знак протеста против политики министра народного просвещения Л.А. Кассо, но затем был восстановлен в должности по требованию студентов. С 1908 по 1924 г. преподавал на кафедре бактериологии (в дальнейшем — микробиологии) медицинского отделения Московских высших женских курсов (в настоящее время — Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова).

Л.А. Тарасевич был разносторонним ученым, внесшим весомый вклад в развитие иммунологии, вакцинологии, эпидемиологии и микробиологии. Научная деятельность Л.А. Тарасевича совпала со временем крупнейших открытий в области иммунологии и бактериологии, возникновения новых учений и острых дискуссий.

Диссертационная работа Л.А. Тарасевича «К учению о гемолизинах. Историко-критическое и эксперимен-

тальное исследование» (1902 г.) была подготовлена в лаборатории И.И. Мечникова. В ней приведен анализ состояния иммунологии того времени и изучены закономерности развития иммунного ответа на чужеродные эритроциты. Лев Александрович был одним из первых, кто обосновал роль ретикуло-эндотелиальной системы в формировании иммунитета.

Значительное место иммунология занимает и в книге Л.А. Тарасевича «Курс общей патологии для врачей и студентов» (1908 г.). Книга написана в период окончания противостояния сторонников клеточной и гумо-



И.И. Мечников в лаборатории Пастеровского института (1910–1915 гг.)

ральной теорий иммунитета. В то время работы Л.А. Тарасевича имели большое значение для примирения двух основных учений. В книге приведены доказательства, что иммунный ответ развивается благодаря сложному взаимодействию клеточных и гуморальных факторов. Большой раздел в книге посвящен воспалению как реакции организма в ответ на повреждение. Автор рассматривает воспаление как защитную реакцию, которая при определенных условиях (чрезмерная интенсивность патологического процесса, его опасная локализация) может быть нежелательной. Эта точка зрения соответствует современным представлениям о воспалении.

Л.А. Тарасевич был горячим пропагандистом иммунизации населения с целью предотвращения эпидемий инфекционных заболеваний. В то время было большое количество противников иммунизации, препятствовавших вакцинации из-за возможности возникновения поствакцинальных осложнений. Своим оппонентам Л.А. Тарасевич писал в 1914 г.: «Прививки не являются, конечно, ни абсолютным, ни идеальным средством, но они представляют по обстоятельствам настоящего времени наиболее существенную предупредительную меру по отношению к целому ряду заболеваний, и проведение их надо признать обязательным».

Статьи и выступления Л.А. Тарасевича, его разумный, взвешенный подход к массовой вакцинации сыграли решающую роль в применении этого метода профилактики инфекций в России. Благодаря его усилиям была организована вакцинация военных и беженцев против холеры и брюшного тифа, а также новорожденных детей против туберкулеза.

Л.А. Тарасевич всемерно способствовал развитию передовых направлений в вакцинологии, в частности применению метода пероральной иммунизации, эффективность которого обосновал А.М. Безредка. Благодаря поддержке Льва Александровича разрабатывались пероральные вакцины против дизентерии, брюшного тифа и холеры.

Ратуя за массовую вакцинацию, Л.А. Тарасевич считал, что в борьбе с инфекциями первостепенное значение должны иметь системные санитарно-гигиенические

и социальные реформы. Он утверждал: «Быть длительно вполне здоровым можно только в здоровой среде».

Л.А. Тарасевич придавал большое значение проблемам аллергии. Он длительное время занимался изучением пищевой аллергии и экспериментальным воспроизведением анафилаксии к белкам коровьего молока и яичному белку. Л.А. Тарасевич внес существенный вклад в изучение эпидемиологии холеры, брюшного тифа, малярии, сыпного тифа, дизентерии, сифилиса, туберкулеза. Он исследовал инфекционную заболеваемость, механизмы развития естественной иммунизации, формирование коллективного иммунитета и его влияние на циркуляцию возбудителей инфекционных болезней в эпидемическом очаге. Работы Льва Александровича способствовали формированию эпидемиологии как самостоятельной области медицинских знаний, непосредственно связанной с практикой противозидемических мероприятий.

В 1911 г. Л.А. Тарасевич участвовал в экспедиции И.И. Мечникова в Калмыцкие степи с целью изучения эпидемиологических особенностей распространения чумы и туберкулеза в этом регионе. В 1914–1916 гг. Л.А. Тарасевич был главным военно-полевым санитарным инспектором русской армии, был инициатором и организатором вакцинации военнослужащих против брюшного тифа и холеры. Под руководством Л.А. Тарасевича была разработана программа противозидемических мероприятий для Медицинского совета при Временном правительстве России.

Лев Александрович является основателем системы государственного надзора за качеством вакцин и сывороток. История государственного контроля иммунобиологических препаратов в России начинается с организации в 1915 г. станции контроля вакцин и сывороток на базе кафедры микробиологии на медицинском отделении Высших женских курсов в Москве. Руководителем станции был Л.А. Тарасевич.

В октябре 1918 г. на Первом съезде бактериологов и эпидемиологов России было принято решение о необходимости организации в стране специального контрольного института. И уже в январе 1919 г. по приказу



Л.А. Тарасевич — санитар в армии
(1914–1916 гг.)



Экспедиция в Калмыкию, 1911 г.

народного комиссара здравоохранения Н.А. Семашко был организован Государственный контрольный институт сывороток и вакцин в составе объединенного Государственного института народного здравоохранения (ГИНЗ), в который входили несколько институтов Наркомздрава РСФСР биологического профиля. Руководителем ГИНЗ и директором Контрольного института был назначен Лев Александрович Тарасевич. По замыслу Л.А. Тарасевича институт должен был выполнять задачу организации государственного контроля качества бактериальных препаратов и централизованной апробации вводимых в практику новых вакцин и сывороток. В институте были созданы отделения по контролю оспенного детрита и вакцин против кишечных инфекций, противодифтерийной сыворотки (1920 г.) и по изготовлению диагностических препаратов. В 1927 г. после смерти Льва Александровича институту присвоили его имя.

Л.А. Тарасевич был организатором и руководителем Центральной сывороточно-вакцинной комиссии, которая была прообразом созданного позднее Комитета вакцин и сывороток, а затем — Комитета иммунобиологических препаратов. Л.А. Тарасевич заложил основные принципы организации независимого государственного контроля вакцин и сывороток.

Л.А. Тарасевич был талантливым организатором здравоохранения. Он был председателем Ученого медицинского совета при Народном комиссариате здравоохранения РСФСР, бессменным председателем всех Всероссийских съездов бактериологов, эпидемиологов и санитарных врачей, редактором созданного по его инициативе журнала «Микробиология, патология и инфекционные болезни» (с 1935 г. — «Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии»).

Лев Александрович — автор около 100 печатных научных работ, в их числе наиболее важные:

К учению о гемолизинах. Историко-критическое и экспериментальное исследование. Одесса, 1902;

Курс общей патологии. 1908. 4-е изд. Москва—Ленинград, 1923;

О голодании. Речь, произнесенная на 2-м общественном собрании X Пироговского съезда. Киев, 1907;

Анафилаксия (факты и теория). Москва, 1910;

Медицинская микробиология. Руководство для врачей и студентов в трех томах. Под ред. Л.А. Тарасевича. Петроград—Киев, 1912–1915;



Экспедиция института Пастера в Астрахань, 1911 г.

Заразные болезни. Сыпной и возвратный тифы, дезинсекция, оспа, желудочно-кишечные инфекции, прививки, раневая инфекция. Изд. 2-е, дополненное. Москва, 1916.

Для активной пропаганды достижений науки в России Л.А. Тарасевич использовал свои широкие научные связи с зарубежными институтами, особенно с Институтом Пастера в Париже. Он много сделал для подготовки медицинских кадров в России. Был инициатором реформ в преподавании медицинских дисциплин и энергичным сторонником равноправия женщин в вопросах медицинского образования на факультетах университетов.

В 1923 г. Л.А. Тарасевичу было присвоено почетное звание «Герой труда на фронте народного здравоохранения». Он был членом Всеукраинской академии наук, награжден почетной золотой медалью Гамбургского университета. Лев Александрович был эрудированным, всесторонне образованным человеком.

Л.А. Тарасевич умер 12 июня 1927 г. в санатории под Дрезденом, куда по решению министра здравоохранения РСФСР Н.А. Семашко был направлен на лечение. Прах Л.А. Тарасевича захоронен в Москве на старом Новодевичьем кладбище.

*Доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН Н.В. Медуницын*

Молекулярно-биологические методы контроля качества субстанций биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК

Е. Д. Мыца, Н. В. Чертова, Е. В. Эльберт, А. С. Сухно, Р. А. Волкова*, В. А. Меркулов

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Биотехнологические препараты, полученные с применением технологии рекомбинантных ДНК, широко используются в настоящее время. В соответствии с международными и отечественными требованиями содержание остаточной ДНК штамма-продуцента в подобных препаратах не должно превышать 10 нг на 1 дозу, для препаратов, предназначенных для частого или длительного введения, эта величина не должна превышать 100 пг на 1 дозу. В статье представлено описание наиболее часто используемых методов определения содержания остаточной ДНК штамма-продуцента в субстанциях биотехнологических препаратов: молекулярная гибридизация с биотиновой или дигоксигениновой меткой ДНК-зонда (полуколичественный метод), система Threshold, ПЦР в режиме реального времени, метод с флуоресцентным реагентом (количественные методы). В случае использования методов с флуоресцентным реагентом или ПЦР в режиме реального времени для замены ранее использовавшегося метода требуется подтверждение их правильности, например с помощью сравнительной оценки содержания остаточной ДНК двумя методами — вновь вводимым и ранее использовавшимся методом. Отмечены преимущества и недостатки методов, источники неопределенности результатов при проведении испытаний, указана необходимость использования стандартных и контрольных образцов, аттестованных в установленном порядке. В субстанциях, внесенных в Государственный реестр лекарственных средств, содержание остаточной ДНК штамма-продуцента соответствует международным рекомендациям.

Ключевые слова: биотехнологические препараты; остаточная ДНК штамма-продуцента; рекомбинантные белки; молекулярно-биологические методы контроля; стандартные и контрольные образцы; полимеразная цепная реакция (ПЦР); метод молекулярной гибридизации; система Threshold; метод с флуоресцентным реагентом

Для цитирования: Мыца ЕД, Чертова НВ, Эльберт ЕВ, Сухно АС, Волкова РА, Меркулов ВА. Молекулярно-биологические методы контроля качества субстанций биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2018;18(2):75–80. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-75-80>

* Контактное лицо: Волкова Рауза Асхатовна; Volkova@expmed.ru

Molecular-Biological Methods of Quality Control of Biological Active Substances Produced by Recombinant DNA Technology

E. D. Mytsa, N. V. Chertova, E. V. Elbert, A. S. Sukhno, R. A. Volkova*, V. A. Merkulov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Biotechnological products manufactured by recombinant DNA technology are widely used nowadays. According to the national and international requirements the amount of residual host cell DNA in such products should not exceed 10 ng per dose. However, for products intended for frequent or long-term use, this amount must not exceed 100 pg per dose. This article describes methods most frequently used for quantification of residual host cell DNA in biological active substances contained in biotechnological products: molecular hybridization with biotin- or digoxigenin-labelled DNA-probes (semiquantitative method), Threshold system, real-time PCR, method based on the use of a fluorescent reagent (assays). If a method based on the use of a fluorescent reagent or real-time PCR are used to replace the current procedure, it is necessary to demonstrate their validity, e.g. by comparing the results of residual DNA quantification obtained by the two methods — the new one and the current one. The article dwells upon the advantages and disadvantages of the methods and potential sources of uncertainty. It highlights the importance of using appropriately certified reference standards and retention samples. The biological active substances included into the State Register of Medicinal Products conform to the international requirements in terms of the amount of residual host cell DNA.

Key words: biotechnological products; residual host cell DNA; recombinant proteins; molecular-biological methods of quality control; polymerase chain reaction (PCR); molecular hybridization method; Threshold system; method based on the use of a fluorescent reagent

For citation: Mytsa ED, Chertova NV, Elbert EV, Sukhno AS, Volkova RA, Merkulov VA. Molecular-Biological Methods of Quality Control of Biological Active Substances Produced by Recombinant DNA Technology. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2018;18(2):75–80. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-75-80>

* Contact person: Rauza A. Volkova; Volkova@expmed.ru

Использование в фармацевтической промышленности технологии рекомбинантной ДНК позволяет получать целевые рекомбинантные белки в необходимом количестве и обеспечивать практическое здравоохранение современными вакцинами и биотерапевтическими препаратами (моноклональные антитела, эритропоэтин, интерфероны, интерлейкины, рецепторы клеток, факторы плазмы крови, инсулин, другие препараты).

Качество данных препаратов обеспечивается соблюдением технологии производства и требований надлежащей производственной практики, подтверждается системой контроля на этапах производства и контроля готовой продукции. Для контроля качества продукции используется широкий круг методов: биологические, физико-химические, биохимические, иммунохимические, молекулярно-биологические.

Молекулярно-биологические методы используются для оценки подлинности, специфической активности препаратов, вирусной безопасности сырья и промежуточных продуктов, а также для определения содержания остаточной ДНК клеток-продуцентов в очищенном продукте или фармацевтической субстанции, внесенной в Государственный реестр лекарственных средств. Для оценки подлинности, специфической активности и вирусной безопасности наиболее распространенным молекулярно-биологическим методом контроля является метод на основе амплификации нуклеиновых кислот. Для определения содержания остаточной ДНК используются различные количественные и полуколичественные методы [1, 2].

Цель работы — провести теоретический анализ современных молекулярно-биологических методов контроля качества субстанций препаратов, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК по показателю «Остаточная ДНК штамма-продуцента».

В задачи исследования входило:

- представить анализ методов определения остаточной ДНК штамма-продуцента, включенных в нормативную документацию на фармацевтические субстанции биотехнологических препаратов отечественного и зарубежного производства;
- привести сравнительную характеристику методов оценки остаточной ДНК штамма-продуцента;
- охарактеризовать источники неопределенности методик количественной оценки остаточной ДНК штамма-продуцента;
- изучить рекомендации международных организаций и данные нормативной документации по количественному содержанию остаточной ДНК штамма-продуцента в фармацевтических субстанциях.

Вакцины и биотехнологические препараты, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК, производятся путем культивирования продуцентов, представляющих собой прокариотические или эукариотические клетки со встроенными экспрессирующими системами [3–5]. Фармацевтическая субстанция может содержать различные примеси биологической природы: связанные с продуцентом (остаточная ДНК штамма-продуцента, белки клетки-хозяина, вирусные частицы — при использовании вирусов в качестве вектора) или связанные с технологическим процессом (компоненты питательных сред, иммуносорбенты для аффинной хроматографии, другие вещества, использующиеся в процессе очистки). Содержание данных примесей может оказывать влияние на безопасность препарата, поэтому должно быть оценено в субстанции или очищенном продукте и указано в досье на препарат. При валидации технологического процесса (процесса очистки целевого белка) устанавливают степень удаления примесей на отдельных этапах очистки. Требования к содержанию остаточной ДНК штамма-продуцента и белков клетки-хозяина в очи-

щенном продукте или фармацевтической субстанции должны быть регламентированы, и, по сути, являются одними из показателей эффективности очистки продукта [1]. Изучение биологической активности остаточной ДНК продолжается [6–9].

В соответствии с международными рекомендациями содержание остаточной ДНК не должно превышать 10 нг на 1 дозу препарата [10–12], при этом для препаратов, предназначенных для частого или длительного введения (например, моноклональные антитела, инсулины), рекомендуется снижение допустимой величины до 100 пг на 1 дозу [13].

Методы определения остаточной ДНК штамма-продуцента

Для определения остаточной ДНК штамма-продуцента в биотехнологических продуктах используются в основном следующие методы [1, 2]: молекулярная гибридизация с биотиновой или дигоксингениновой меткой ДНК-зонда, полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени, система Threshold, метод с флуоресцентным реагентом.

Метод с флуоресцентным реагентом. Количественное определение остаточной ДНК с флуоресцентным реагентом PicoGreen позволяет определять достаточно низкие количества двухцепочечной ДНК — порядка 100 пг в анализируемом образце [14–16]. Свободный краситель не флуоресцирует, но при связывании с двухцепочечной ДНК его флуоресценция многократно возрастает (более чем в 100 раз). Существует линейная зависимость между флуоресценцией, детектируемой прибором, и концентрацией двухцепочечной ДНК в образце. Данный метод позволяет определять всю имеющуюся в образце двухцепочечную ДНК.

Особенностью красителя PicoGreen является его способность прочно связываться не только с полимерной цепью ДНК, но и с короткими (<20 пар нуклеотидов) дуплексами [16].

Молекулярная гибридизация. Количественное определение остаточной ДНК методом молекулярной гибридизации основано на комплементарности меченого ДНК-зонда и ДНК штамма-продуцента. Изначально в молекулярной гибридизации использовали радиоактивно меченные нуклеотиды, как правило, изотопом фосфора ³²P. После гибридизации образцы-мишени выявляли с помощью радиографии. Определение проводили в соответствии с МУК 4.1/4.2.588–96 [17].

В настоящее время чаще всего применяются биотиновая или дигоксингениновая метки. Оба варианта характеризуются достаточно высокой аналитической чувствительностью — менее 100 пг в образце.

При использовании биотиновой метки зонд (ДНК, меченная биотином) получают методом случайных праймеров с использованием биотинилированного нуклеотида. Биотин обладает большим сродством к авидину или стрептавидину и образует с ними нерастворимый комплекс. Эффективность мечения увеличивается с увеличением продолжительности мечения и при использовании предварительной обработки ДНК рестриктазами.

Для определения количества искомой ДНК ее выделяют из субстанции, денатурируют (при температуре 100 °С или в щелочной среде), наносят на нейлоновую мембрану (нейтральную или положительно заряженную) и иммобилизуют. В процессе гибридизации зонды, добавленные в раствор, связываются с комплементарной ДНК на мембране. После инкубации в блокирующем растворе добавляют раствор стрептавидина, конъюгированного, как правило, с щелочной фосфатазой.

Образовавшийся биотин-стрептавидиновый комплекс взаимодействует с субстратом (BCIP/NBT), по интенсивности окра-

шивания образовавшегося продукта в сравнении с образцами стандартного ряда оценивают количество ДНК в испытуемом образце [18].

При использовании дигоксигениновой метки получение зонда, меченного дигоксигенином, и последующий процесс гибридизации проводят по аналогичной схеме. Отличие заключается в том, что для обнаружения ДНК, связанной с меченым зондом, используются антитела против дигоксигенина, конъюгированные с щелочной фосфатазой [19].

Методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время ПЦР в реальном времени все чаще используется для определения количества остаточной ДНК. Необходимыми компонентами являются праймеры, ДНК-полимераза, зонды, нуклеотиды, ионы Mg^{2+} , буферный раствор [20–22].

Для определения остаточной ДНК используются различные реагенты и молекулярные зонды, среди них наиболее часто используются краситель SYBR Green I и ДНК-зонды с флуоресцентной меткой.

Использование SYBR Green I основано на способности красителя увеличивать интенсивность флуоресценции при связывании с двухцепочечной ДНК. Пик поглощения флуоресценции находится при длине волны 494 нм, пик испускания — при 520 нм. При добавлении красителя в реакционную смесь он неспецифически связывается с двухцепочечной ДНК, и по мере наработки копий амплифицируемого участка пропорционально увеличивается и интенсивность флуоресценции.

Метод с использованием ДНК-зондов, меченных на 5'-конце флуоресцентным красителем и имеющих на 3'-конце гаситель флуоресценции и фосфатную группу, основан на использовании 5'-экзонуклеазной активности полимеразы [23]. Структура свободного зонда препятствует флуоресценции за счет близкого расположения гасителя. При отжиге праймеров зонды связываются с комплементарными участками ДНК. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и, дойдя до участка, гибридизованного с зондом, расщепляет зонд за счет 5'-экзонуклеазной активности. В результате флуоресцентная метка отделяется от зонда и гасителя, и ее свечение может быть детектировано. Увеличение флуоресценции будет прямо пропорционально количеству наработанного ПЦР-продукта [24, 25].

Система Threshold. Иммуноферментный метод с использованием системы Threshold позволяет определять тотальную ДНК и измерять количество одноцепочечной ДНК вплоть до пикограмм, метод может быть назван золотым стандартом определения остаточной ДНК. Данный метод основан на переводе двухцепочечной ДНК в одноцепочечную форму и выявлении одноцепочечной ДНК, предварительно связанной с двумя белками в присутствии стрептавидина [26]. Один из этих белков выделен из *Escherichia coli* — белок класса RecQ DNA helicases: SSB (single-stranded DNA-binding protein), способен связываться с одноцепочечной ДНК, конъюгирован с биотином, обладающим сродством к стрептавидину. Второй белок представляет собой анти-ДНК моноклональное антитело, конъюгированное с уреазой. Оба белка обладают высокой способностью к связыванию с одноцепочечной ДНК независимо от ее нуклеотидного состава. Благодаря этому в присутствии стрептавидина образуется устойчивый комплекс стрептавидин-биотин-SSB-ДНК-анти-ДНК-моноклональные антитела-уреаза [27].

Этот комплекс переносят на биотинилированную нитроцеллюлозную мембрану путем фильтрации под вакуумом. Молекулы стрептавидина специфично связываются с биотином ДНК-комплекса и биотином нитроцеллюлозной мембраны,

обеспечивая прочное прикрепление комплекса к биотинилированной мембране. Избыток не связанного стрептавидина и белков удаляют промыванием [28].

Количество связанной уреазы, пропорциональное количеству ДНК в образце, оценивают по уреазной активности (в качестве субстрата используют мочевины). Скорость ферментативной реакции оценивают по изменению pH с применением специального детектора. Расчет содержания ДНК в образце проводится по компьютерной программе [29]. Предел количественного определения составляет 2 пг ДНК.

Количество ДНК в образце оценивают по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных образцов ДНК.

Характеристика методов оценки остаточной ДНК штамма-продуцента

В работе S. Mehta и J.T. Keer [30] было рассмотрено девять факторов, которые влияют на выбор аналитической методики: стоимость оборудования, стоимость одного анализа, пропускная способность, чувствительность, простота использования, надежность, соответствие требованиям регуляторных органов, применимость для производства, ее аналитическая гибкость. По мнению авторов, надежность является самым важным фактором.

Молекулярная гибридизация и флуоресцентный метод являются сравнительно недорогими методами (с точки зрения прямых затрат и издержек на проведение одного эксперимента). Однако гибридизация представляет собой количественный трудоемкий метод. Флуоресцентный метод с PicoGreen — недорогой и удобный для пользователей количественный метод, позволяет обнаруживать любые двухцепочечные ДНК [15]. При применении данного метода должен быть использован калибровочный ряд, обеспечивающий необходимую чувствительность методики.

ПЦР в реальном времени и Threshold-анализы позволяют проводить количественную оценку остаточной ДНК штамма-продуцента с необходимой чувствительностью и точностью. Метод Threshold является высокоточным и хорошо воспроизводимым, не требует дорогостоящего оборудования и реагентов. ПЦР-анализ интенсивно развивается в последние годы, обеспечивает точность, чувствительность и воспроизводимость испытаний, имеет большую пропускную способность, но правильность методики требует обоснования. Информативность ПЦР-анализа в отношении выявления остаточной ДНК в основном зависит от правильного выбора праймеров.

Для характеристики правильности методик на основе ПЦР и с флуоресцентным реагентом рекомендуется проведение оценки содержания ДНК в сравнении с ранее использовавшимися методами гибридизации или Threshold.

Чувствительность (предел обнаружения) рассмотренных методов определения остаточной ДНК по данным литературы приведена в таблице 1.

Таблица 1. Предел обнаружения молекулярно-биологических методов определения содержания остаточной ДНК (по [30])

Предел обнаружения остаточной ДНК методом:			
с флуоресцентным реагентом	молекулярной гибридизации	ПЦР	система Threshold
0,2 нг	10 нг	10 фг — 5 пг	2 пг

Источники неопределенности методик количественной оценки остаточной ДНК штамма-продуцента

Неопределенность результатов испытания — это диапазон значений, в пределах которого находится «истинное» значение измеряемой величины. Диапазон значений позволяет судить о надежности результатов. Экспериментальные результаты могут быть представлены как $x \pm u$, где x — значение измеряемой величины, а u — это неопределенность результата измерения [31]. Источником неопределенности при использовании молекулярно-биологических методов является прежде всего этап пробоподготовки, включая отбор проб, а также такие факторы, как стабильность и концентрация образца, условия амплификации и детекции, аналитическая чувствительность методики, адекватность способа аттестации используемых стандартных и контрольных образцов. Неопределенность методики может быть оценена с помощью стандартного отклонения, установленного в условиях воспроизводимости [32].

Стандартные образцы

Стандартизация условий испытаний необходима для обеспечения точности определения остаточной ДНК штамма-продуцента. Одним из основных условий стандартизации методики является использование стандартных и контрольных образцов. В методике определения остаточной ДНК штамма-продуцента используются различные ДНК-стандарты: внутрипроизводственные стандартные образцы ДНК, выделенные из клеток-продуцентов, стандарты, поставляемые в комплектах производителей наборов [29, 33]. Обычно значение концентрации ДНК в таких стандартных образцах дается по результатам определения спектрофотометрическим методом и без указания неопределенности, что не позволяет оценить прослеживаемость указанной величины. Отсутствие стандартных образцов необходимой категории затрудняет стандартизацию методики [34, 35].

Остаточная ДНК штамма-продуцента в фармацевтических субстанциях

В настоящее время в Государственный реестр лекарственных средств (<http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>) внесено более 40 фармацевтических субстанций отечественных и зарубежных производителей для препаратов, производимых по технологии рекомбинантной ДНК, в том числе 11 субстанций инсулина, 13 субстанций интерферона альфа-2b, 5 субстанций эритропоэтина, 4 субстанции моноклональных антител, 6 субстанций филграстима; более 10 биотехнологических субстанций проходят процедуру внесения в Государственный реестр лекарственных средств.

В соответствии с требованиями производитель имеет возможность использовать любой доступный метод для определения остаточной ДНК штамма-продуцента в фармацевтической субстанции. Используемая методика должна быть валидирована в соответствии с ГФ XIII ОФС 1.1.0012.15 [36].

Во всех субстанциях содержание остаточной ДНК не превышает 10 нг на дозу, что соответствует международным рекомендациям [11–13], в препаратах, предназначенных для частого или длительного применения, содержание остаточной ДНК, как правило, не превышает 100 пг в дозе [14].

Ключевую роль в определении остаточной ДНК играет пробоподготовка, т.е. выделение ДНК из субстанции. Эффективность выделения ДНК должна быть оценена, подтверждена материалами валидации методики и учтена при расчете окончательного результата. Как правило, выделение ДНК из штамма-продуцента проводят согласно Руководству по проведению

доклинических исследований лекарственных средств [2] с некоторыми отступлениями.

Для обеспечения достоверности и надежности результатов определения остаточной ДНК необходимо использование стандартных образцов, а также положительных и отрицательных контрольных образцов как для этапа пробоподготовки, так и для этапа определения ДНК. Использование образца с добавлением известного, желательного минимального, количества ДНК позволяет оценить эффективность процесса выделения.

Должны быть предусмотрены критерии пригодности системы и критерии оценки приемлемости результатов, установленные на основе результатов валидации методики.

Заключение

Для определения остаточной ДНК штамма-продуцента в биотехнологических продуктах используются в основном следующие методы: молекулярная гибридизация с биотиновой или диоксигениновой меткой, ПЦР в режиме реального времени, Threshold, метод с флуоресцентным реагентом.

Метод молекулярной гибридизации — классический метод для определения остаточной ДНК, он является полуквантитативным и достаточно трудоемким. Метод Threshold — первый количественный метод, но его применение зависит от наличия дорогостоящего оборудования и реагентов. Методы с флуоресцентным реагентом и ПЦР в режиме реального времени являются количественными методами, но в случае их использования для замены ранее использовавшегося метода требуется подтверждение их правильности, например с помощью сравнительной оценки содержания остаточной ДНК двумя методами — вновь вводимым и ранее использовавшимся методом.

Для обеспечения достоверности и надежности результатов определения остаточной ДНК необходимо использование стандартных образцов, аттестованных в установленном порядке.

В субстанциях, внесенных в Государственный реестр лекарственных средств, содержание остаточной ДНК штамма-продуцента соответствует международным требованиям.

Информация об отсутствии конфликта интересов.

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

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

Литература / References

1. Общая фармакопейная статья 1.7.1.0007.15 Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантной ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.: 2015. [General Monograph 1.7.1.0007.15 Drugs Produced by Recombinant DNA Methods. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (In Russ.)]
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2013. [Guidance on Preclinical Evaluation of Medicines (Immunobiological Drugs). Part 2. Moscow: Grif and K; 2013 (In Russ.)]
3. Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза. Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств. Т. 3. М.: Ремедиум; 2017. [Normative Legal Acts in the Sphere of Medicinal Products Circulation within the Framework of the Eurasian Economic Union. Development and Carrying out of Research of Biological Medicinal Products. V. 3. Moscow: Remedium; 2017 (In Russ.)]

4. Andersen DC, Krummen L. Recombinant Protein Expression for Therapeutic Applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(2):117–23.
5. Chu L, Robinson DK. Industrial Choices for Protein Production by Large-Scale Cell Culture. *Curr Opin Biotechnol.* 2001;12(2):180–7.
6. Sheng L, Cai F, Zhu Y, Pal A, Athanasiou M, Orrison B, et al. Oncogenicity of DNA in vivo: Tumor Induction with Expression Plasmids for Activated H-ras and C-myc. *Biologicals.* 2008;36(3):184–97. DOI: 10.1016/j.biologicals.2007.11.003
7. Wang X, Morgan DM, Wang G, Mozier NM. Residual DNA Analysis in Biologics Development: Review of Measurement and Quantitation Technologies and Future Directions. *Biotechnol Bioeng.* 2012;109(2):307–17. DOI: 10.1002/bit.23343
8. Peden K, Sheng L, Pal A, Lewis A. Biological Activity of Residual Cell-Substrate DNA. *Dev Biol (Basel)* 2006;123:45–53.
9. Wolter T, Richter A. Assays for Controlling Host-Cell Impurities in Biopharmaceuticals. *BioProcess Int.* 2005;3(2):40–6.
10. Requirements for the Use of Animal Cells as in vitro Substrates for the Production of Biologicals. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-seventh report. WHO; 1998 (WHO Technical Report Series, No. 878), Annex 1.
11. Meeting Report. WHO Study Group on Cell Substrates for Production of Biologicals; 2007. Available from: http://www.who.int/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/cells/Cells.FINAL.MtgRep.IK.26_Sep_07.pdf
12. WHO. 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. 2013. Available from: http://www.who.int/biologicals/biotherapeutics/rDNA_DB_final_19_Nov_2013.pdf
13. Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research; 1997. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/.../UCM153182.pdf>
14. Ikeda Y, Iwakiri S, Yoshimori T. Development and Characterization of a Novel Host Cell DNA Assay Using Ultra-Sensitive Fluorescent Nucleic Acid Stain «PicoGreen». *J Pharm Biomed Anal.* 2009;49(4):997–1002. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.01.022
15. Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation. *Anal Biochem.* 1997;249(2):228–38. DOI: 10.1006/abio.1997.2177
16. Dragan AI, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD. Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding. *Biophys J.* 2010;99(9):3010–9. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.09.012
17. МУК 4.1/4.2.588-96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. Минздрав России, М.; 1998. [Methodical Instructions МУК 4.1 / 4.2.588-96 «Methods of Control Medical Immunobiological Drugs Administered to People». Ministry of Health of Russia, Moscow; 1998 (In Russ.)]
18. Gebeyehu G, Rao PY, SooChan P, Simms DA, Klevan L. Novel Biotinylated Nucleotide — Analogs for Labeling and Colorimetric Detection of DNA. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(11):4513–34.
19. DIG Application Manual for Filter Hybridization. Roche Diagnostics GmbH; 2008. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/General_Information/1/dig-application-manual-for-filter-hybridisation-iris.pdf
20. Gijssbers L, Koel B, Weggeman M, Goudsmit J, Havenga M, Marzio G. Quantification of Residual Host Cell DNA in Adenoviral Vectors Produced on PER. C6 Cells. *Hum Gene Ther.* 2005;16(3):393–8. DOI: 10.1089/hum.2005.16.393
21. Gregory CA, Rigg GP, Illidge CM, Matthews RC. Quantification of Escherichia coli Genomic DNA Contamination in Recombinant Protein Preparations by Polymerase Chain Reaction and Affinity-Based Collection. *Anal Biochem.* 2001;296(1):114–21. DOI: 10.1006/abio.2001.5237
22. Wang KY, Guo YJ, Sun SH, Shi K, Zhang S, Wang KH, et al. 16S rRNA Gene Probe Quantitates Residual Host Cell DNA in Pharmaceutical-Grade Plasmid DNA. *Vaccine.* 2006;24(14):2656–61. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.11.066
23. Ребриков ДВ, Саматов ГА, Трофимов ДЮ, Семенов ПА, Савилова АМ, Кофиади ИА, Абрамов ДД. ПЦР «в реальном времени». М.: Бином. Лаборатория знаний; 2009. [Rebrikov DV, Samatov GA, Trofimov DYU, Semenov PA, Savilova AM, Kofiadi IA, Abramov DD. PCR «Real Time». Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy; 2009 (In Russ.)]
24. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic Principles of Real-Time Quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):209–19.
25. Кузнецов ВВ, Кузнецова ВВ, Романова ГА, ред. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: Бином. Лаборатория знаний; 2012. [Kuznetsov VV, Kuznetsova VV, Romanova GA, eds. Molecular-Genetic and Biochemical Methods in Modern Plant Biology. Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy; 2012 (In Russ.)]
26. Wilchek M, Bayer EA. The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Application. *Anal Biochem.* 1988;171(1):1–32.
27. Blakeley RL, Zerner B. Jack Bean Urease: the First Nickel Enzyme. *J Mol Catalysis.* 1984;23(2–3):263–92.
28. Ishikawa E, Imagawa M, Hashida S, Yoshitake S, Hamaguchi Y, Ueno T. Enzyme-Labeling of Antibodies and Their Fragments for Enzyme Immunoassay and Immunohistochemical Staining. *J Immunoassay.* 1983;4(3):209–327.
29. Molecular Devices. The Threshold DNA Assay Kit. Available from: <https://www.moleculardevices.com/reagents-supplies/assay-kits/contaminant-detection-assays>
30. Mehta S, Keer JT. Performance Characteristics of Host-Cell DNA Quantification Methods. *BioProcess Int.* 2007;4(9):44–58.
31. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2nd ed.; 2000. Available from: <https://eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2000-1.pdf>
32. Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы оценки неопределенности методик испытаний и стандартных образцов иммунобиологических лекарственных средств. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017;17(1):27–31. [Volkova RA, Fadeikina OV. The Problem of Estimating the Uncertainty of Test Methods and Standard Samples of Immunobiological Medicines BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2017;17(1):27–31 (In Russ.)] DOI: 10.30895/2221-996X-2017-1-27-31
33. Cygnus Technologies. CHO DNA Amplification Kit in Tubes. Available from: https://cygnustechnologies.com/product_info.php/products_id/442/cplD/53
34. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016;16(4):229–36. [Volkova RA, Fadeikina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, Olefir YuV, Merkulov VA, et al. Topical Issues Related to Reference Standards in the Sphere of Circulation of Biological Products. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2016;16(4):229–36 (In Russ.)] DOI: 10.30895/2221-996X-2016-16-4-229-236
35. Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических

ских лекарственных препаратов. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013;(2):28–32. [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 Russ.)]

Об авторах

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

Мыца Елена Дмитриевна. Эксперт 2 категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Чертова Наталья Вячеславовна. Эксперт 2 категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Эльберт Елизавета Викторовна. Главный эксперт лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Сухно Анатолий Сергеевич. Эксперт 1 категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

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

Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, доктор мед. наук, профессор

Поступила 11.10.2017

Принята к публикации 26.04.2018

36. Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General Monograph 1.1.0012.15 Validation of Analytical Techniques. The State Pharmacopoeia of Russian Federation. 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)]

Authors

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

Elena D. Mytsa. 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Natalia V. Chertova. 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality

Yelizaveta V. Elbert. Chief Expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Anatoliy S. Sukhno. 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Rauza A. Volkova. 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

Vadim A. Merkulov. Deputy Director-General for Medicinal Products' Evaluation. Doctor of Medical Sciences, Professor

Received 11 October 2017

Accepted 26 April 2018

Адъюванты на основе углеводов для производства вакцин

С. С. Курашова¹, Т. К. Дзагурова¹, А. А. Ишмухаметов^{1,2}, М. С. Егорова¹, М. В. Баловнева¹, С. Е. Соцкова¹,
Е. А. Ткаченко^{1,2,*}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»,

домовладение 8, стр. 1, поселок Института полиомиелита, поселение Московский, Москва, 108819, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

Общепризнанным способом усиления иммуногенности вакцин является добавление в их состав адъювантов. Последние характеризуются большим разнообразием, поэтому подбор адъюванта осуществляется путем сравнения эффективности адъювантов на моделях животных, а также оценки их безопасности и переносимости. Среди множества различных групп веществ, потенциально обладающих адъювантными свойствами, сравнительно мало внимания уделяют адъювантам на основе углеводов, несмотря на то, что они совместимы с живыми векторными вакцинами, безопасны, хорошо переносятся, а их производство не отличается трудоемкостью. Благодаря этим преимуществам применение именно таких адъювантов в сочетании с любым типом вакцины, в том числе с векторной или ДНК-вакциной, может быть наиболее целесообразным и перспективным. В настоящем обзоре рассмотрены различные типы углеводных адъювантов и механизмы, определяющие их эффективность.

Ключевые слова: адъювант; гуморальный иммунитет; полисахариды; иммуногенность; безопасность вакцин; живые векторные вакцины; иммунитет; иммунологическая активность полисахаридов

Для цитирования: Курашова СС, Дзагурова ТК, Ишмухаметов АА, Егорова МС, Баловнева МВ, Соцкова СЕ, Ткаченко ЕА. Адъюванты на основе углеводов для производства вакцин. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2018;18(2):81–91. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-81-91>

* Контактное лицо: Ткаченко Евгений Александрович; evgeniytkach@mail.ru

Carbohydrate-Based Adjuvants for Vaccine Production

S. S. Kurashova¹, T. K. Dzagurova¹, A. A. Ishmukhametov^{1,2}, M. S. Egorova¹, M. V. Balovneva¹, S. E. Sotskova¹,
E. A. Tkachenko^{1,2,*}

¹ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences,

8/1 housing estate of the Institute of Poliomyelitis, «Moskovsky» settlement, Moscow 108819, Russian Federation

² Sechenov First Moscow State Medical University,

8/2 Trubetskaya St, Moscow 119991, Russian Federation

Addition of adjuvants is a generally recognized method of enhancing the immunogenicity of vaccines. There is a large variety of adjuvants, therefore the choice of an adjuvant is based on the comparison of adjuvants efficacy in animal models, as well as assessment of their safety and tolerability. There are many different groups of substances that may have adjuvant properties, but relatively little attention is paid to carbohydrate-based adjuvants, despite the fact that they are compatible with live vector vaccines, safe, well tolerated, and their production is not laborious. Thanks to these advantages the use of these particular adjuvants in combination with any type of vaccine, including vector vaccines and DNA vaccines, may be most appropriate and promising. This review examines various types of carbohydrate adjuvants and the mechanisms that determine their efficacy.

Key words: adjuvant; humoral immunity; polysaccharides; immunogenicity; vaccine safety; live vector vaccines; immunity; immunological activity of polysaccharides

For citation: Kurashova SS, Dzagurova TK, Ishmukhametov AA, Egorova MS, Balovneva MV, Sotskova SE, Tkachenko EA. Carbohydrate-Based Adjuvants for Vaccine Production. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2018;18(2):81–91. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-81-91>

* Contact person: Evgeniy A. Tkachenko; evgeniytkach@mail.ru

Одним из важнейших факторов, определяющих развитие инфекционного заболевания, является состояние иммунной системы человека, ее врожденных неспецифических факторов защиты и специфического адаптивного иммунитета [1].

Распознавание и элиминация из организма генетически чужеродного материала — сложный, многоступенчатый процесс, в котором участвуют структуры врожденного и адаптивного иммунитета. Организм реагирует на проникновение болезнетворных микроорганизмов, вирусов, продуктов их жизнедеятельности, белковых молекул и других чужеродных агентов посредством активации гуморального (созревание иммунокомпетентных В-лимфоцитов, секреция антител) и клеточного (сенсibilизация Т-лимфоцитов, образование клеток-эффекторов, формирование клеток-киллеров) звеньев иммунитета [2].

Целью вакцинации является создание специфической невосприимчивости к инфекции, обусловленной наличием специфических антител и популяций иммунокомпетентных клеток, которые при повторном контакте с антигеном быстро пролиферируют. Это достигается посредством активации врожденного иммунитета и клонов В- и/или Т-клеточного звена адаптивного иммунитета [3].

Первые вакцины содержали помимо инаktivированных антигенов значительное количество иммунологически активных примесей, которые в определенной степени способствовали повышению уровня иммунитета, но вместе с тем они нередко способствовали усилению реактогенности вакцин. Предпринимавшиеся попытки повысить чистоту вакцинных препаратов с целью снижения степени их реактогенности приводили к неутешительным результатам — с повышением чистоты иммуногенность вакцин снижалась. Вследствие этого возникала необходимость в разработке способов усиления иммуногенности вакцин посредством добавления различных природных или синтетических соединений, а также различных видов молекул и макромолекулярных комплексов. Такие соединения, или комплекс веществ, используемые для усиления иммунного ответа при введении одновременно с иммуногеном, получили название адъюванты (от лат. *adjuvare* — «помочь» или «усилить»).

Усиление иммуногенности вакцины, обусловленное добавлением адъюванта, может способствовать достижению и других целей иммунопрофилактики, таких как снижение количества (дозы) антигена, ускорение формирования иммунного ответа, увеличение продолжительности иммунной защиты, повышение эффективности вакцины при введении лицам с ослабленным иммунитетом [4, 5].

Выбор адъюванта осуществляется методом, основанным на сравнении эффективности адъювантов на моделях животных, а также оценке их безопасности и переносимости.

Термин «иммунологический адъювант» был впервые предложен еще в 1920-е гг. знаменитым французским иммунологом и ветеринаром Гастоном Раймоном [6]. Принцип изготовления анатоксинов в дальнейшем был использован и другими исследователями для получения соответствующих бактериальных и вирусных вакцин, а также при создании ассоциированных вакцин из анатоксинов и микробных тел [7, 8].

Стимулирующая эффективность адъювантов была показана в опытах на лошадях при совместном введении анатоксинов с квасцами, хлористым кальцием, тапиокой, лецитином, холестерином, ланолином, бензином [7]. Адъювантная активность соединений алюминия была впервые продемонстрирована на примере дифтерийного анатоксина, адсорбированного на гидроксиде алюминия. Данное открытие позволило значительно

снизить дозы антигенов при иммунизации и увеличить тем самым безопасность вакцины [6–8].

При сравнении адъювантного эффекта было обнаружено, что только гидроокись алюминия стимулировала выработку высокоаффинных антигенспецифических иммуноглобулинов класса G на таком же высоком уровне, как и полный адъювант Фрейнда. Хорошо выраженные иммуномодулирующие свойства алюминия связаны в первую очередь со стимуляцией выработки антител [9, 10].

Гидроксид алюминия в качестве адъюванта имеет как достоинства, так и недостатки. Механизм адъювантного действия алюминия остается до конца не изученным [11]. Вполне очевидно, что адъювантная активность препаратов алюминия проявляется в способности адсорбировать антигены, формировать и медленно реализовывать депо антигенов, постепенно доставляя их в зоны локализации иммунокомпетентных клеток [12]. В свете накапливающихся современных данных механизм действия солей алюминия не может быть объяснен исключительно классической теорией «депо». Другой возможный механизм — введение солей алюминия — способствует активации системы комплемента, эозинофилов или макрофагов [11]. Известно также, что гидроксид алюминия способен вызывать продукцию цитокинов [9, 12].

Основные недостатки адъювантов на основе солей алюминия заключаются в отсутствии воздействия на клеточный иммунитет, а также в формировании воспалительной реакции в месте введения [9]. Также к недостаткам относятся наблюдаемое в ряде случаев увеличение продукции IgE, связанное с введением гидроокиси алюминия, и потенциальная нейротоксичность. В последнем случае это может быть связано с нарушением функции почек, при котором алюминий может накапливаться и быть токсичным для организма [9, 10].

Следует отметить, что, несмотря на отмеченные выше недостатки, практически во всех вакцинах, разрешенных для иммунизации людей, используются до настоящего времени адъюванты на основе солей алюминия. Это связано прежде всего с опытом их длительного и безопасного использования [13].

Вместе с тем существование определенных проблем безопасности применения адъювантов на основе солей алюминия вызывает необходимость разработки новых перспективных адъювантов, отвечающих повышенным требованиям безопасности [14, 15].

К основным требованиям относят: отсутствие местных и системных реакций (генерализованной токсичности, пирогенности), реакций гиперчувствительности, канцерогенности, снижение дозы антигена или уменьшение количества инъекций, необходимых для формирования полноценного протективного иммунитета, а также выработку стойкого иммунного ответа у детей разного возраста, пожилых и лиц с ослабленным иммунитетом [7].

Классификация адъювантов

Адъюванты классифицируются по происхождению, механизму действия, физико-химическим свойствам. К сожалению, механизм действия для большинства адъювантов полностью не изучен. Адъюванты сгруппированы в две большие группы — корпускулярные и некорпускулярные. Эффект действия адъювантов может быть обусловлен иммуномодуляцией, оптимизацией процесса презентации антигена, индукцией ответа CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), таргетингом и формированием депо [8].

По своему химическому составу и по механизму действия адъюванты представляют собой гетерогенную группу соедине-

ний, объединяет их лишь одно свойство: способность усиливать иммунный ответ [16]. На основе адьювантных свойств они могут быть объединены в три группы:

- вызывающие формирование депо в месте введения (например, минеральные соединения, адьюванты на основе масел, липосомы, биodeградируемые полимерные микросферы более 10 мкм);
- действующие как носитель для антигенов, которые обеспечивают лучшую презентацию антигенов иммунокомпетентным клеткам (например, липосомы, масляные адьюванты, биodeградируемые полимерные микросферы менее 10 мкм, неионные блок-полимерные сурфактанты);
- действующие как иммуностимуляторы (например, полный адьювант Фрейнда, мурамилдипептид, липополисахарид, липид А, монофосфорил липид А, коклюшный токсин, цитокины) [7, 10].

Некоторые принципы действия адьювантов:

- стабилизируют конформацию эпитопа;
- создают депо в месте инокуляции с медленным высвобождением антигена;
- представляют антиген антигенпрезентирующим клеткам (АПК) в виде мультимолекулярных агрегатов или способствуют связыванию антигена с рецепторами АПК;
- направляют презентацию антигена по пути МНС класса I или МНС класса II путем прямого пептидного обмена на поверхности молекул МНС — преимущественно стимулируют Th1- или Th2-тип ответа за счет активации CD4⁺ Т-хелперов и CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов [8].

По механизму действия адьюванты классифицируются как иммуномодуляторы, средства доставки или комбинация двух этих вариантов.

Иммуномодулирующие адьюванты в основном активируют рецепторы врожденного иммунного ответа, такие как Toll-подобные (TLRs), NOD-подобные рецепторы (NLR), лектины C-типа и RIG-I-подобные рецепторы (RLR). Природа инициации сигналов «опасности» распознается клетками врожденного иммунного ответа и может предопределять тип, характер и интенсивность адаптивного иммунного ответа.

Некоторые адьюванты, такие как минеральные соли, липосомы, микрочастицы, сапонины, эмульсии, могут усиливать процесс презентации антигена, тем самым повышая иммунный потенциал вакцин. Комбинированные адьюванты включают большее число компонентов, которые могут действовать синергически, включая различные иммунные механизмы [8].

Адьюванты на основе углеводов

Среди множества различных групп веществ, потенциально обладающих адьювантными свойствами, сравнительно мало внимания уделяют адьювантам на основе углеводов (табл. 1), несмотря на то, что они совместимы, в том числе с живыми векторными вакцинами, безопасны, хорошо переносятся, а их производство не отличается трудоемкостью. Благодаря этим преимуществам применение именно таких адьювантов в сочетании с любым типом вакцины, включая векторные или ДНК-вакцины, может быть наиболее целесообразным и перспективным.

В последнее время с точки зрения безопасности рассматривается возможность применения в качестве адьювантов таких углеводных соединений, как полисахариды, которые характеризуются минимальным риском образования токсических метаболитов или накопления в тканях организма. Это позволяет считать их наилучшими кандидатами среди других веществ, обладающих адьювантной активностью. Следует отметить, что многие полисахариды играют основную роль

в передаче сигнала в иммунной системе, и потому неудивительно, что при тестировании многих углеводов было показано наличие у них адьювантной активности [17].

Фруктановые адьюванты

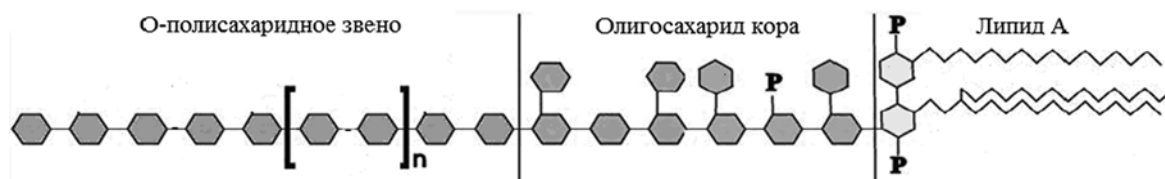
Одним из первых полисахаридов, у которого выявлена иммунологическая активность, была β -D-[2-1] поли(фруктофуранозил)-D-глюкоза, более известная как инулин, представляющий собой природный полисахарид, выделенный из растений семейства *Compositae*. Инулин состоит из линейных цепей фруктозильных групп, соединенных β (2-1)-гликозидными связями, которые заканчиваются кольцом α -D-[1-2]-глюкопиранозидом. Впервые влияние инулина на иммунную систему было выявлено после его введения в организм человека с целью оценки функциональной способности почек. Инулин приводил к активации системы комплемента в отсутствие антигенов, т.е. за счет включения альтернативного пути активации комплемента. Установлено, что комплемент активируется благодаря мелким инулиновым кристаллам, содержащимся в инъекционном растворе [18]. Только нерастворимые кристаллы обладают способностью индуцировать иммунологическую активность, в отличие от растворимых альфа- и бета-форм инулина, которые такой способностью не обладают [19]. Наиболее мощной адьювантной активностью обладает дельта-инулин — кристаллизованная форма инулина, выпускаемая как адьювант под торговым названием Advax™ [20]. При применении у мышей, крыс, морских свинок, кроликов, цыплят, собак, овец, обезьян, лошадей и верблюдов данный адьювант усиливал иммуногенность различных белковых антигенов, выделенных из вирусных, бактериальных и протозойных патогенных микроорганизмов, токсинов, опухолевых антигенов и аллергенов. Адьювант Advax™ усиливал иммуногенность вакцин, что было показано на моделях мышей, инфицированных вирусами гриппа H1N1 [21], японского энцефалита [22], лихорадки Западного Нила [14], гепатита В [23] и вирусом иммунодефицита человека [24]. Адьювантное действие Advax™ продемонстрировано также на моделях хорьков, зараженных вирусом гриппа птиц H5N1 [25], лошадей, инфицированных японским энцефалитом [26], и верблюдов, зараженных вирусом африканской конской чумы и сапа [27]. На модели японского энцефалита и лихорадки Западного Нила усиление защитных свойств под влиянием адьюванта Advax™ связывали с индукцией выработки В-клеток памяти; при этом на модели гриппа и других заболеваний отмечена активация как В-, так и Т-клеток памяти. Применение рекомбинантной вакцины против пандемического штамма вируса гриппа у человека с использованием дельта-инулина способствовало увеличению уровня сероконверсии [28].

Адьювант Advax™ стимулирует формирование надежного Т-клеточного иммунитета при одновременном введении с антигенами [21], что позволяет считать целесообразным его использование в вакцинах против рака, ВИЧ и туберкулеза. Показано, что Advax™ способствует формированию более выраженного адаптивного иммунного ответа даже при раздельном введении с антигеном. При введении за 24 ч до инъекции вакцины на основе поверхностного антигена гепатита В этот адьювант был эффективен, что выгодно отличает его от адьювантов на основе солей алюминия [23]. Кроме того, действие адьюванта Advax™ не предполагает связывания антигена, что позволяет просто смешивать антиген с данным адьювантом. Важным аспектом применения Advax™ является отсутствие нежелательного воздействия на эффективность живых векторных вакцин, в том числе рекомбинантного модифицированного вируса осповакцины Ankara (MVA) и живой вакцины

Таблица 1. Примеры адъювантов на основе углеводов

Адъювант	Химическая структура	Модифицированные формы	Источник	Рецепторы	Активность / механизм действия
Дельта-инулин	β -D-[2-1] поли(фруктофуранозил) α -D-глюкоза	Эпсилон, омега	Растения семейства <i>Compositae</i>	Неизвестны	Провоспалительная / TLR-независимая, активация системы комплемента, стимуляция секреции хемокинов
Декстран	α -1,6-глюкан с α -1,3-ветвями	Декстрана сульфат, DEAE-декстран, ацелированный декстран	Лактобактерии	Глюкановые	Провоспалительная / активатор инфламмосом, активатор системы комплемента, фактора NFkB, индукция IL1 β , IL-6, TNF- α
Лентинан	β -1,3-глюкогексоза с β -1,6-ветвями	Лентинана сульфат	Грибы шиитакэ	Глюкановые	Провоспалительная / активатор инфламмосом, активатор системы комплемента, фактора NFkB, индукция IL1 β , IL-6, TNF- α
Зимозан	β -1,3-глюкан	Частицы глюкана	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GR, TLR2, Dectin-1, ASC	Провоспалительная / активатор инфламмосом, активатор системы комплемента, фактора NFkB, индукция IL1 β , IL-6, TNF- α
Бета-глюкан	β -1,3-глюкан	Частицы глюкана	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GR, TLR2, Dectin-1, ASC	Провоспалительная / активатор инфламмосом, активатор системы комплемента, фактора NFkB, индукция IL1 β , IL-6, TNF- α
Маннан	1,4-полимальтоза	Окисление, восстановление, ацилирование, маннозильированные ниосомы	<i>Aloe barbadensis</i>	MBL, маннозные	Провоспалительная / активатор фактора NFkB, индукция IL1 β , IL-6, TNF- α
Хитин	N-ацетил-D-глюкозамин	Ацелирование (хитозан)	Ракообразные	Dectin-1, MMR, TLR-2	Провоспалительная / фосфорилирование MAPK, индукция TNF- α , COX-2, простагландина E2, созревание дендритных клеток
Мурамилдипептид	N-ацетил мурамил-L-аланин-D-изоглутамин	D-мурапальмитин, глюкозаминилмурамилдипептид, мурабутид	Микобактерии, <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	NOD2	Провоспалительная / активатор фактора NFkB, индукция IL1 β , IL-6, TNF- α
Фактор жгутикообразования	трегалоза-6-6-димиколат	Множество	<i>M. tuberculosis</i>	Mincle	Провоспалительная / активирует передачу сигналов моноцитам, активирует фактор NFkB, IL1 β , IL-6, TNF- α
Липополисахарид (ЛПС)	*	Монофосфорил липид А (МФЛ)	Грамотрицательные бактерии	TLR4	Провоспалительная / активатор фактора NFkB, индукция IL1 β , IL-6, TNF- α
QS21 Тритерпеновые гликозиды		GPI-0100	Кора <i>Quillaja saponaria</i>	Инфламмосома	Провоспалительная / активатор инфламмосом и NFkB

*



против респираторно-синцициального вируса (RSV). Примечательно, что во многих исследованиях с участием животных и человека были продемонстрированы безопасность и низкая реактогенность адъюванта Advax™. Это подтверждает гипотезу о том, что полисахариды в целом отлично переносятся. Дельта-инулин не токсичен и ареактогенен, возможно, в силу того,

что его введение не приводит к активации таких рецепторов системы врожденного иммунитета, как TLR, Dectin-1 или инфламмосомы. Вследствие этого отсутствует выработка провоспалительных цитокинов, например интерлейкина-1 (IL-1), которые и вызывают побочные эффекты при использовании других адъювантов.

Глюкановые адьюванты

Глюканы — это полисахариды, выделенные из растений или микроорганизмов, состоящие из повторяющихся молекул D-глюкозы, соединенных гликозидными связями с образованием различных конформаций. Различают 2 типа глюканов — альфа и бета. Альфа-глюканы — декстран (α -1,6-глюкан), гликоген (α -1,4- и α -1,6-глюкан), пуллулан (α -1,4- и α -1,6-глюкан) и крахмал (α -1,4- и α -1,6-глюкан). К бета-глюканам относят целлюлозу (β -1,4-глюкан), курдлан (β -1,3-глюкан), ламинарин (β -1,3- и β -1,6-глюкан), хризоламинарин (β -1,3-глюкан), лентинан (очищенный β -1,6- и β -1,3-глюкан, выделенный из *Lentinus edodes*), лихенин (β -1,3- и β -1,4-глюкан), плевран (β -1,3- и β -1,6-глюкан, выделенный из *Pleurotus ostreatus*) и зимозан (β -1,3-глюкан, выделенный из *Saccharomyces*). Каждый тип глюканов может в широких пределах различаться по качеству и чистоте и может содержать полимерные цепи разной длины с различным количеством ответвлений. Поскольку эти отличительные особенности полимеров зависят от источника глюканов, их названия происходят от названий растений или микроорганизмов, из которых их получают. Так, несмотря на то, что зимозан представляет собой преимущественно β -1,3-глюкан, экстрагированный из клеточных стенок дрожжей, он также содержит разное количество других полисахаридов и белков, которые тоже обладают адьювантной активностью.

Не всегда возможно определить, какой из компонентов глюканового комплекса отвечает за его адьювантную активность. Как видно из данных, представленных в таблице 1, глюканы и другие углеводные адьюванты модулируют иммунный ответ посредством активации специфических рецепторов системы врожденного иммунитета. В этом процессе участвуют β -глюкановые рецепторы, маннанные рецепторы, Dectin-1, TLR и другие рецепторы, экспрессируемые на моноцитах и АПК. Связывание полисахаридов с соответствующими рецепторами на клетках системы врожденного иммунитета приводит к активации моноцитов. Результатом транслокации в ядро транскрипционного фактора каппа-В (NFkB) является продукция провоспалительных цитокинов, что, в свою очередь, стимулирует формирование адаптивного иммунного ответа на введенный антиген.

Альфа-глюкановые адьюванты

Декстран — это разветвленный микробный полисахарид, состоящий из α -1,6-глюкана с α -1,3-ответвлениями. У сульфата декстрана был обнаружен выраженный провоспалительный эффект, что проявилось в его способности вызывать воспалительный колит у мышей. На макаках-резус было показано, что диэтиламиноэтил-декстран (DEAE-декстран) — поликатионный дериват декстрана — усиливал выработку антител в ответ на введение инактивированной формалином вакцины против вируса веносуального лошадиного энцефаломиелиита [29]. DEAE-декстран аналогичным образом способствовал формированию у мышей иммунного ответа на введение цельноклеточной вакцины против холеры [30]. Микрочастицы ацетилированного декстрана (Ac-DEX) используются для доставки к иммунным клеткам имиквимода (агонист рецептора TLR7), что позволяет повысить активность рецептора TLR7 [31].

Бета-глюкановые адьюванты

Зимозан состоит из комплекса белков с β -1,3-глюканом, выделенным из клеточной стенки дрожжей. Связываясь с рецепторами TLR-2 и Dectin-1 на моноцитах, он активирует фактор NFkB, а также стимулирует альтернативный путь активации комплемента, внося вклад в развитие выраженной воспалительной реакции [32]. Зимозан, а также маннан не-

посредственно активируют инфламмосомы посредством воздействия на белок ASC и криопирин, что приводит к активации каспазы-1 и продукции IL-1 β . Возможно, данный механизм действия и определяет их высокую реактогенность [33]. С помощью этих механизмов зимозан индуцирует неспецифическую устойчивость к бактериальным и грибковым инфекциям, а также активирует процессы гибели опухолевых клеток с помощью полиморфноядерных лейкоцитов [34]. Зимозан способен усиливать ответную реакцию организма на ДНК-вакцины посредством комплемент-зависимого механизма [35].

Лентинан, состоящий из β -1,3-глюкана с β -1,6-ответвлениями, выделен из растительного сырья, а также грибов шиитакэ (*Lentinus edodes*). Показано, что лентинан при интраназальном введении способствовал повышению продукции оксида азота и IL-6 в бронхоальвеолярных макрофагах, в результате чего формировалась неспецифическая устойчивость к вирусной инфекции. Как и другие иммунологически активные полисахариды, лентинан характеризовался противоопухолевой и антибактериальной активностью [36]. Добавление лентинана увеличивало эффективность вакцины, используемой для лечения экспериментальной меланомы B16 у мышей. Кроме того, лентинан способствовал увеличению продукции цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и развитию воспаления и некроза в ткани опухоли [37]. При введении курам сульфатированного лентинана в сочетании с вакциной против болезни Ньюкасла происходило увеличение титра антител в сыворотке крови и усиление Т-клеточного пролиферативного ответа, а также уменьшалось количество случаев с летальным исходом среди заболевших птиц [38].

К β -1,3-глюканам относят также алгал, экстрагированный из *Euglena gracilis*. Алгал стимулирует гуморальный и клеточный иммунный ответ на введение пептидных антигенов гликопротеина D вируса герпеса [39].

Частицы бета-глюкана представляют собой очищенные клеточные стенки *Saccharomyces cerevisiae*, обработанные таким образом, чтобы удалить маннаны и дрожжевые белки, оставив остов, состоящий в основном из β -1,3-D-глюканов. Полная пористая структура таких частиц позволяет заполнить их антигенами, в том числе вирусными векторами, что приводит к стимуляции фагоцитоза дендритными клетками, увеличению уровня экспрессии маркеров созревания и повышению активности антиген-специфических Т-клеток [40].

Маннанные адьюванты

Маннан представляет собой полимер маннозы с 1,4-гликозидными связями, который у дрожжей, бактерий и растений выполняет функцию запасного полисахарида. Связывание маннана при помощи маннан-связывающего лектина и других лектинов С-типа семейства маннозных рецепторов приводит к активации комплемента, опсонизации, фагоцитозу, активации инфламмосом, каспазы 1 и выработке провоспалительных цитокинов [33, 41]. Способность маннана воздействовать на созревание дендритных клеток реализуется посредством TLR4-зависимого механизма [42]. Маннан и его производные широко применяют для доставки антигенов в дендритные клетки, в особенности в составе вакцин против опухолей человека. При окислительном связывании с рекомбинантным белковым антигеном и последующем интраназальном его введении маннан усиливал выработку антиген-специфических сывороточных и секреторных антител у мышей F1 и C57BL. В клиническом исследовании антигена MUC-1 (антиген, экспрессируемый различными опухолями, в данном случае аденокарциномой), конъюгированного с окисленным маннаном, частота рецидивирования опухоли была более чем в четыре

паза ниже [43]. При конъюгации основного миелинового белка (ОМБ) с восстановленным маннаном иммунный ответ против ОМБ реализовывался не Th1, а Th2, что предотвращало развитие экспериментального аллергического энцефаломиелита у мышей [44]. На модели болезни Альцгеймера у гипореактивных трансгенных мышей было показано, что маннан, конъюгированный с антигеном Аβ, усиливал продукцию антител против данного антигена, что указывает на способность адьюванта маннана преодолевать аутоотолерантность [45]. Введение полиманнозы, выделенной из *Aloe barbadensis*, приводило к повышению титров антител у мышей, иммунизированных вирусом Коксаки В3. Манноза также использовалась для доставки липосом, содержащих плазмидную ДНК, в макрофаги [46]. Покрытие катионных липосом маннаном значительно усиливало способность ДНК-вакцины против ВИЧ индуцировать специфический клеточный иммунный ответ, а также повышало активность ДНК-вакцины против меланомы [47]. Маннан использовали для улучшения доставки живых вирусных векторных вакцин. Кроме того, для доставки антигена эндотелия — кадгерина, в качестве вакцины у мышей был применен рекомбинантный аденовирусный вектор, модифицированный добавлением маннана. Было показано, что маннан способствовал усилению иммуногенности вакцины, в результате чего происходило предотвращение роста опухоли и повышение уровня выживаемости животных [48].

Данные, представленные выше, свидетельствуют о том, что маннан может быть использован как в качестве адьюванта, так и в качестве инструмента, облегчающего доставку живых векторных вакцин непосредственно в дендритные клетки.

Хитозановые адьюванты

Хитозан получают путем частичного деацетилирования хитина, представляющего собой линейный полимер D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина с β-1-4-связями, который экстрагируют из креветок. Хитозан проявляет широкий спектр иммуномодулирующих свойств, в том числе способствует активации макрофагов и выделению провоспалительных цитокинов, что приводит к повышению титров антител к вводимым совместно с ним антигенам. Описанные эффекты опосредуются связыванием хитина с такими рецепторами, как Dectin-1, макрофагальный маннозный рецептор и TLR-2 [49]. Добавление хитозана к инактивированной вакцине против гриппа, вводимой внутримышечно, способствовало повышению титров антител у мышей [50] и обеспечению более эффективной защиты при заражении летальной дозой вируса [51]. Было исследовано применение в качестве назальных адьювантов хитина и его производных ввиду наличия у них мукоадгезивных свойств. Такие производные хитина, как N-триметилхитозан хлорид, усиливают всасывание белков на поверхности слизистой оболочки [52]. Совместное применение микрочастиц хитозана и адьюванта LTK63 на основе мукозального токсина существенно усиливало иммуногенность интраназальной менингококковой (группа C) полисахаридной вакцины [53]. Также интраназальное введение наночастиц хитозана, содержащих плазмидную ДНК-вакцину, способствовало развитию выраженного иммунного ответа как гуморального и клеточного, так и слизистых оболочек [54]. Введение хитозана при интраназальной иммунизации крупного рогатого скота вакциной на основе аденовируса типа 5, экспрессирующего гликопротеин D бычьего герпесвируса, увеличивало иммуногенность препарата. При этом наилучшую защиту от инфекции обеспечивало применение в качестве адьюванта гликоль-хитозана [55].

Сходным образом при глазнично-носовом введении 1-суточным цыплятам апатогенной энтеротропной живой вакцины против вируса болезни Ньюкасла совместно с хитозаном происходило формирование более выраженного иммунного ответа [56]. Хитозан повышал защитную эффективность живой ослабленной гриппозной вакцины: его применение приводило к увеличению уровня антител, специфичных к вирусу гриппа, и количества Т-клеток, секретирующих IFN-γ [57]. В ходе испытаний I фазы на людях было изучено сочетание хитозана, интраназальной вакцины на основе норовирусоподобных частиц, полученных из норовируса с генотипом GI.1, и МФЛ в качестве адьюванта. Благодаря повышению мукоадгезивных свойств вакцины происходила индукция высоких титров IgG и IgA против норовируса [58], что указывает на возможность применения хитозана в качестве адьюванта в вакцинах, предназначенных для человека. Но при исследовании вакцин против рака были выявлены и отрицательные эффекты хитозана. У мышей аденовирусная вакцина против рака в комбинации с хитозаном в качестве адьюванта приводила к снижению активности антиген-специфичных CD8⁺ Т-клеток, ЦТЛ и уменьшению выработки IFN-γ [59]. Причиной этому послужило ингибирование хитозаном опосредованной аденовирусом экспрессии трансгена и активности АПК.

Липоарабиноманнанные адьюванты

Золотым стандартом адьювантной активности все еще остается обладающий высокой токсичностью полный адьювант Фрейнда, основным ингредиентом которого являются микобактерии. При этом продолжают выявлять все новые и новые бактериальные компоненты, способствующие адьювантной активности. Оказалось, что многие адьювантные соединения, в том числе олигосахариды, гликопротеины и гликолипиды, обнаруженные в бактериальных экстрактах, содержат углеводы. Известно, что иммунные клетки распознают микобактерии за счет различных рецепторов, в том числе TLR и лектинов C-типа (например, маннозного рецептора, Dectin-1 и DC-SIGN), взаимодействующих с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP). Причем многие из этих вариантов взаимодействия зависят от углеводных структур в клеточной стенке микобактерии. Основным структурным компонентом на поверхности микобактерии является липоарабиноманнан (ЛАМ). Иммунная активность ЛАМов зависит от их структуры. Так, ЛАМы непатогенных микобактерий связываются с TLR2 на макрофагах, активируют NFκB и индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов [60]. Напротив, маннозильированный ЛАМ патогенной *M. tuberculosis*, связываясь с маннозным рецептором и DC-SIGN, приводит к стимулированию продукции противовоспалительных цитокинов [60]. Таким образом, ЛАМы могут быть индукторами как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов в зависимости от их происхождения и от того, с каким рецептором системы врожденного иммунитета они связываются (например, с маннозным рецептором, TLR1/TLR2, TLR4 или DC-SIGN), что подчеркивает наличие тонких различий в передаче сигнала посредством углеводов [60]. Данные об использовании ЛАМ в качестве адьюванта для живых вирусных векторных вакцин отсутствуют.

Мурамилдипептидные адьюванты

Мурамилдипептид (MDP; N-ацетилмурамил-L-аланин-D-изоглютамин) был впервые идентифицирован во фракции микобактериального пептидогликана, известной своей выраженной адьювантной активностью [61]. Он был исследован и как самостоятельное вещество, и как компонент более слож-

ных адьювантных составов. MDP активирует такие рецепторы врожденного иммунитета, как NOD2 и TLR, что приводит к выраженной продукции NFκB, провоспалительных цитокинов и ускорению созревания дендритных клеток. Решающее значение для обеспечения адьювантной активности MDP имеет углеводный фрагмент, что было показано при исследовании индукции гиперчувствительности замедленного типа у морских свинок под воздействием углеводных аналогов MDP [62]. При этом существуют определенные требования к структуре углеводного фрагмента MDP: адьювантной активностью при комбинации с вакциной обладали только аналоги MDP, содержащие D-маннозамин, D-галактозамин и D-глюкозу [62]. Аналоги MDP могут быть гидрофильными либо липофильными, при этом последние обладают большей иммунологической активностью. При введении в физиологическом растворе аналоги MDP в большей степени стимулируют гуморальный иммунитет, тогда как при введении с эмульсиями либо в липосомах они индуцируют формирование клеточного иммунитета.

Липополисахаридные адьюванты

Бактериальный липополисахарид (ЛПС) является мощным стимулятором активации макрофагов и выработки провоспалительных цитокинов. Поскольку сам по себе ЛПС токсичен для человека, чтобы применять его в качестве адьюванта, разрабатываются менее реактогенные аналоги на основе компонента липида А, состоящего из β-(1,6)-связанного D-глюкозаминдисахарида, фосфорилированного в положениях 1-O и 4'-O. В условиях низкой кислотности липид А может быть гидролизован с целью удаления 1-фосфатной группы, а последующая обработка слабой щелочью приводит к удалению жирной кислоты в положении 3 с образованием монофосфорилированного липида А (МФЛ). По сравнению с ЛПС МФЛ обладает низкой токсичностью, но сохраняет иммуностимулирующую активность [63]. Снижение реактогенности по сравнению с ЛПС объясняется тем, что передача сигнала МФЛ через рецепторы TLR4 осуществляется преимущественно посредством адаптора TRIF вместо адаптора MYD88 [64]. МФЛ используется в различных патентованных адьювантных составах, в том числе адьювантах AS02 и AS04 (компании GSK), где МФЛ применяется в комбинации с QS21 и эмульсией типа «масло-в-воде», либо с гидроксидом алюминия соответственно. Адьювант AS04, который является комбинацией алюминия и деривата мурамила дипептида — LPS [9], входит в состав лицензированных вакцин против гепатита В (Fendrix®) и вируса папилломы человека (Cervarix®) [65]. Также в исследованиях на мышах было показано, что эффективность применения МФЛ в качестве мукосального адьюванта для вакцины против гриппа на основе вирусоподобных частиц была сходна с эффективностью адьювантов на основе солей алюминия или CrG (синтетические олигонуклеотиды, содержащие неметилированные CrG, являющиеся триггерами клеток, экспрессирующих TLR9, в том числе дендритных клеток и В лимфоцитов человека) [66]. Данные об использовании МФЛ в качестве адьюванта для живых вирусных векторных вакцин отсутствуют, что может быть связано с несовместимостью МФЛ с вирусами в смеси из-за его высокой гидрофобности.

Сапониновые адьюванты

Имеются данные о том, что адьювантной активностью обладают все сапонины, полученные из растений семейств *Rhamnaceae*, *Araliaceae*, *Polygalaceae* и *Fabaceae* [67]. Наиболее широко изученным сапониновым адьювантом является QS21. Он представляет собой сапонин, выделенный из Quil A — сме-

си тритерпеновых гликозидов из коры южноамериканского мыльного дерева *Quillaja aponaria* [68, 69]. Главным фактором, ограничивающим применение QS21, является возможное развитие таких нежелательных реакций, как боль в месте введения и гемолиз, возникающих из-за способности данного сапонаина лизировать клеточные мембраны. Для преодоления описанных недостатков был создан ряд химически модифицированных вариантов QS21. Так, GPI-0100 представляет собой вариант QS21, в который была внедрена C-12 алкильная цепь с использованием стабильной амидной связи с карбоксильной группой остатка глюкуроновой кислоты деацилированного сапонаина [70]. Показано, что GPI-0100 по сравнению с QS2, стимулирует Th2-тип иммунного ответа, тогда как QS21 стимулирует Th1-тип иммунного ответа [71]. Адьювантной активностью также обладают и другие сапонины растительного происхождения. Например, глицирризин, представляющий собой тритерпеновый сапониновый гликозид глицирризиновой кислоты и придающий сладковатый вкус солодковому корню, активирует NFκB и индуцирует выработку провоспалительных медиаторов макрофагами мышей, а также обладает адьювантной активностью при совместном введении с антигеном [72]. Сапониновые адьюванты не подходят для использования в качестве адьювантов для живых вирусных векторов вследствие их способности разрушать клеточные мембраны, что также ограничивает их использование с инактивированными или рекомбинантными антигенами [73] или с ДНК-вакцинами [74].

Механизмы адьювантного действия углеводов

Множество описанных выше адьювантов на основе полисахаридов, в том числе зимозан, маннан, MDP и ЛПС, действуют путем активации таких рецепторов врожденного иммунитета, как TLR, NOD2 и лектины C-типа, что вызывает продукцию провоспалительных цитокинов, которая приводит к усилению иммуногенности вакцины [39, 75]. Ряд углеводных адьювантов, в том числе MDP, ЛПС, зимозан, маннан, β-глюкан и дельта-инулин, активируют комплемент, что также может способствовать их адьювантной активности [76, 77]. Кроме того, определенную роль в проявлении адьювантного действия углеводов также может играть хемотаксис, индуцированный IL-8, MCP-1, MIP-1α и MIP-1β. Например, миграцию лимфоцитов эффективно индуцируют фосфоманнозилные структуры [78, 79]. Некоторые углеводные соединения, такие как зимозан, маннан и QS21, напрямую активируют инфламмосому, что также способствует проявлению их адьювантной активности [33]. Особенностью, отличающей дельта-инулин от других углеводных адьювантов, является то, что он не активирует TLR, инфламмосомы или другие рецепторы врожденного иммунитета и поэтому не индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов. Тем не менее под его воздействием происходит усиление ответа антиген-специфических Т- и В-клеток памяти, что свидетельствует о том, что дельта-инулин все же характеризуется выраженной адьювантной активностью. По-видимому, данный эффект реализуется за счет уникальной способности стимулировать функциональную активность АПК без активации генов провоспалительных цитокинов [80].

Заключение

Поскольку вещества на основе полисахаридов играют важную роль в обеспечении иммунитета, исследования углеводных соединений могут быть плодотворными для разработки новых адьювантов. В целом углеводы безопасны и хорошо переносятся, а значит, соответствуют одному из главных критериев, которые предъявляются к адьювантам, применяемым у человека.

Наиболее перспективными углеводами с адъювантной активностью считают полисахариды. Но некоторые из них, такие как декстран, зимозан и маннан, могут способствовать выраженной продукции провоспалительных цитокинов, что ограничивает их использование в вакцинах для профилактики заболеваний у человека. Уникальным полисахаридным адъювантом, который не активирует TLR и инфламмосомы, является дельта-инулин. Он не вызывает продукции провоспалительных цитокинов и поэтому обладает благоприятным профилем переносимости и безопасности, что позволяет рассматривать данное вещество как потенциальный компонент профилактических вакцин, применяемых у человека. Все адъюванты, относящиеся к группе полисахаридов, совместимы с живыми вирусными векторными вакцинами, причем по многим из них существуют данные об эффективности такого сочетания. Поскольку подбор адъювантов к живым векторным вакцинам вызывает определенные трудности, лучшими кандидатами для такого применения могут быть именно полисахаридные адъюванты.

Информация об отсутствии конфликта интересов.

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

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

Литература / References

1. Дранник ГН. Клиническая иммунология и аллергология. Одесса: АстроПринт; 1999. [Drannik GN. *Clinical Immunology and Allergology*. Odessa: AstroPrint; 1999 (in Russ.)]
2. Дитятковская ЕМ, Василевская ИВ, Кийко ЛА. Аллергология и иммунология. Днепропетровск: ФПО ДГМА; 2003. [Dityatkovskaya EM, Vasilevskaya IV, Kijko LA. *Allergology and Immunology*. Dnepropetrovsk: FPO DGMA; 2003 (in Russ.)]
3. Хаитов РМ. Иммунология: структура и функции иммунной системы: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. [Khaitov RM. *Immunology: Structure and Functions of the Immune System: Textbook*. Moscow: GEOTAR-Media; 2013 (in Russ.)]
4. Vogel FR. Adjuvants in Perspective. *Dev Biol Stand*. 1998;92:241–8.
5. Vogel FR. Improving Vaccine Performance with Adjuvants. *Clin Infect Dis*. 2000;30 Suppl 3:S266–70. DOI: 10.1086/313883
6. Исаенко ЕЮ, Бабич ЕМ, Елисеева ИВ, Ждамарова ЛА, Белозерский ВИ, Колпак СА. Адъюванты в современной вакцинологии. *Аннали Мечниковского институту* 2013;(4):5–21. [Isaenko YeYu, Babych YeM, Yelyseyeva IV, Zhdamarova LA, Belozersky VI, Kolpak SA. *Adjuvants in Modern Vaccinology*. *Annali Mechnikovskogo institutu* 2013;(4):5–21 (in Russ.)]
7. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for Human Vaccines — Current Status, Problems and Future Prospects. *Vaccine* 1995;13(14):1263–76. DOI: 10.1016/0264-410X(95)00011-O
8. O'Hagan DT, ed. *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*. Totowa NJ: Humana Press; 2000.
9. Козлов ВГ, Ожерелков СВ, Санин АВ, Кожевникова ТН. Адъюванты в современной медицине и ветеринарии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии* 2014;(1):91–102. [Kozlov VG, Ozherelkov SV, Sanin AV, Kozhevnikova TN. *Adjuvants in Modern Medicine and Veterinary*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii* 2014;(1):91–102 (in Russ.)]
10. Суворов АН, Леонтьева ГФ, Мeringова ЛФ, Грабовская КБ, Гупалова ТВ, Воробьева ЕИ и др. Влияние различных адъювантов на иммуногенность компонентов вакцин против стрептококков группы В. *Медицинская Иммунология* 2008;10(2-3):215–22. [Suvorov AN, Leon-
- tyeva GF, Meringova LF, Grabovskaya KB, Gupalova TV, Vorobyeva EI, et al. *Effects of Different Adjuvants upon Immunogenicity of Anti-Group B Streptococcal Vaccine Components*. *Medicinskaya Immunologiya* 2008;10(2-3):215–22 (in Russ.)]
11. Aguilar JC, Rodriguez EG. Vaccine Adjuvants Revisited. *Vaccine* 2007;25(19):3752–62. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.01.111
12. McKee AS, Marrack P. Old and New Adjuvants. *Curr Opin Immunol*. 2017;47:44–51. DOI: 10.1016/j.coi.2017.06.005
13. Savelkoul HF, Ferro VA, Strioga MM, Schijns VE. Choice and Design of Adjuvants for Parenteral and Mucosal Vaccines. *Vaccines (Basel)* 2015;3(1):148–71. DOI: 10.3390/vaccines3010148
14. Petrovsky N, Larena M, Siddharthan V, Prow NA, Hall RA, Lobigs M, Morrey J. An Inactivated Cell Culture Japanese Encephalitis Vaccine (JE-ADVAX) Formulated with Delta Inulin Adjuvant Provides Robust Heterologous Protection Against West Nile Encephalitis via Cross-Protective Memory B Cells and Neutralizing Antibody. *J Virol*. 2013;87(18):10324–33. DOI: 10.1128/JVI.00480-13
15. Passeri E, Villa C, Couette M, Itti E, Brugieres P, Cesaro P, et al. Long-Term Follow-up of Cognitive Dysfunction in Patients with Aluminum Hydroxide-Induced Macrophagic Myofasciitis (MMF). *J Inorg Biochem*. 2011;105(11):1457–63. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.08.006
16. Ciabattini A, Pettini E, Fiorino F, Pastore G, Andersen P, Pozzi G, Medagliani D. Modulation of Primary Immune Response by Different Vaccine Adjuvants. *Front Immunol*. 2016;7:427. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00427
17. Petrovsky N. Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs. *Drug Saf*. 2015;38(11):1059–74. DOI: 10.1007/s40264-015-0350-4
18. Cooper PD, Carter M. Anti-Complementary Action of Polymorphic «Solubility Forms» of Particulate Inulin. *Mol Immunol*. 1986;23(8):895–901.
19. Cooper PD, Barclay TG, Ginic-Markovic M, Petrovsky N. The Polysaccharide Inulin is Characterized by an Extensive Series of Periodic Isoforms with Varying Biological Actions. *Glycobiology* 2013;23(10):1164–74. DOI: 10.1093/glycob/cwt053
20. Cooper PD, Petrovsky N. Delta Inulin: A Novel, Immunologically Active, Stable Packing Structure Comprising β -D-[2 $\rightarrow$ 1] poly(fructo-furanosyl) α -D-glucose Polymers. *Glycobiology* 2011;21(5):595–606. DOI: 10.1093/glycob/cwq201
21. Honda-Okubo Y, Saade F, Petrovsky N. Advax™, a Polysaccharide Adjuvant Derived from Delta Inulin, Provides Improved Influenza Vaccine Protection through Broad-Based Enhancement of Adaptive Immune Responses. *Vaccine* 2012;30(36):5373–81. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.06.021
22. Larena M, Prow NA, Hall RA, Petrovsky N, Lobigs M. JE-ADVAX Vaccine Protection against Japanese Encephalitis Virus Mediated by Memory B Cells in the Absence of CD8(+) T Cells and Pre-Exposure Neutralizing Antibody. *J Virol*. 2013;87(8):4395–402. DOI: 10.1128/JVI.03144-12
23. Saade F, Honda-Okubo Y, Trec S, Petrovsky N. A Novel Hepatitis B Vaccine Containing Advax™, a Polysaccharide Adjuvant Derived from Delta Inulin, Induces Robust Humoral and Cellular Immunity with Minimal Reactogenicity in Preclinical Testing. *Vaccine* 2013;31(15):1999–2007. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.12.077
24. Cristillo AD, Ferrari MG, Hudacik L, Lewis B, Galmin L, Bowen B, et al. Induction of Mucosal and Systemic Antibody and T-cell Responses Following Prime-Boost Immunization with Novel Adjuvanted Human Immunodeficiency Virus-1-vaccine Formulations. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 1):128–40. DOI: 10.1099/vir.0.023242-0
25. Layton RC, Petrovsky N, Gigliotti AP, Pollock Z, Knight J, Donart N, et al. Delta Inulin Polysaccharide Adjuvant Enhances the Ability of Split-Virion H5N1 Vaccine to Protect against Lethal Challenge in Ferrets. *Vaccine* 2011;29(37):6242–51. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.06.078

26. Lobigs M, Pavy M, Hall RA, Lobigs P, Cooper P, Komiya T, et al. An Inactivated Vero Cell-Grown Japanese Encephalitis Vaccine Formulated with Advax, a Novel Inulin-Based Adjuvant, Induces Protective Neutralizing Antibody against Homologous and Heterologous Flaviviruses. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 6):1407–17. DOI: 10.1099/vir.0.019190-0
27. Eckersley AM, Petrovsky N, Kinne J, Wernery R, Wernery U. Improving the Dromedary Antibody Response: the Hunt for the Ideal Camel Adjuvant. *J Camel Pract Res*. 2011;18(1):35–46.
28. Gordon DL, Sajkov D, Woodman RJ, Honda-Okubo Y, Cox MM, Heinzl S, Petrovsky N. Randomized Clinical Trial of Immunogenicity and Safety of a Recombinant H1N1/2009 Pandemic Influenza Vaccine Containing Advax™ Polysaccharide Adjuvant. *Vaccine* 2012;30(36):5407–16. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.06.009
29. Houston WE, Crabbs CL, Kremer RJ, Springer JW. Adjuvant Effects of Diethylaminoethyl-dextran. *Infect Immun*. 1976;13(6):1559–62.
30. Kaistha J, Sokhey J, Singh S, Kumar S, John PC, Sharma NC. Adjuvant Effect of DEAE-dextran and Tetanus Toxoid on Whole Cell Heat Inactivated Phenol Preserved Typhoid Vaccine. *Indian J Pathol Microbiol*. 1996;39(4):287–92.
31. Bachelder EM, Beaudette TT, Broaders KE, Frechet JM, Albrecht MT, Mateczun AJ, et al. In vitro Analysis of Acetated Dextran Microparticles as a Potent Delivery Platform for Vaccine Adjuvants. *Mol Pharm*. 2010;7(3):826–35. DOI: 10.1021/mp900311x
32. Schorlemmer HU, Bitter-Suermann D, Allison AC. Complement Activation by the Alternative Pathway and Macrophage Enzyme Secretion in the Pathogenesis of Chronic Inflammation. *Immunology* 1977;32(6):929–40.
33. Lamkanfi M, Malireddi RK, Kanneganti TD. Fungal Zymosan and Mannan Activate the Cryopyrin Inflammasome. *J Biol Chem*. 2009;284(31):20574–81. DOI: 10.1074/jbc.M109.023689
34. Morikawa K, Takeda R, Yamazaki M, Mizuno D. Induction of Tumoricidal Activity of Polymorphonuclear Leukocytes by a Linear beta-1,3-D-glucan and Other Immunomodulators in Murine Cells. *Cancer Res*. 1985;45(4):1496–501.
35. Ara Y, Saito T, Takagi T, Hagiwara E, Miyagi Y, Sugiyama M, et al. Zymosan Enhances the Immune Response to DNA Vaccine for Human Immunodeficiency Virus Type-1 through the Activation of Complement System. *Immunology* 2001;103(1):98–105.
36. Jeannin JF, Lagadec P, Pelletier H, Reisser D, Olsson NO, Chihara G, Martin F. Regression Induced by Lentinan, of Peritoneal Carcinomatosis in a Model of Colon Cancer in Rat. *Int J Immunopharmacol*. 1988;10(7):855–61.
37. Wang J, Zhou ZD, Xia DJ. Study on Effect of Lentinan in Enhancing Anti-Tumor Action of Dendritic Cytoma Vaccine and Its Mechanism. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2007;27(1):60–4.
38. Guo Z, Hu Y, Wang D, Ma X, Zhao X, Zhao B, et al. Sulfated Modification Can Enhance the Adjuvanticity of Lentinan and Improve the Immune Effect of ND Vaccine. *Vaccine* 2009;27(5):660–5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.11.038
39. Mohagheghpour N, Dawson M, Hobbs P, Judd A, Winant R, Dousman L, et al. Glucans as Immunological Adjuvants. *Adv Exp Med Biol*. 1995;383:13–22.
40. Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Specht CA, Levitz SM. Robust Stimulation of Humoral and Cellular Immune Responses Following Vaccination with Antigen-Loaded Beta-Glucan Particles. *MBio*. 2010;1(3):e00164–10. DOI: 10.1128/mBio.00164-10
41. Takahara K, Yashima Y, Omatsu Y, Yoshida H, Kimura Y, Kang YS, et al. Functional Comparison of the Mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type Lectins. *Int Immunol*. 2004;16(6):819–29. DOI: 10.1093/intimm/dxh084
42. Sheng KC, Pouniotis DS, Wright MD, Tang CK, Lazoura E, Pietersz GA, Apostolopoulos V. Mannan Derivatives Induce Phenotypic and Functional Maturation of Mouse Dendritic Cells. *Immunology* 2006;118(3):372–83. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2006.02384.x
43. Vassilaros S, Tsibanis A, Tsikkinis A, Pietersz GA, McKenzie IF, Apostolopoulos V. Up to 15-year Clinical Follow-up of a Pilot Phase III Immunotherapy Study in Stage II Breast Cancer Patients using Oxidized Mannan-MUC1. *Immunotherapy* 2013;5(11):1177–82. DOI: 10.2217/imt.13.126
44. Katsara M, Yuriev E, Ramsland PA, Tselios T, Deraos G, Lourbopoulos A, et al. Altered Peptide Ligands of Myelin Basic Protein (MBP87-99) Conjugated to Reduced Mannan Modulate Immune Responses in Mice. *Immunology* 2009;128(4):521–33. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03137.x
45. Petrushina I, Ghochikyan A, Mkrtichyan M, Mamikonyan G, Movsesyan N, Ajdari R, et al. Mannan-Abeta28 Conjugate Prevents Abeta-plaque Deposition, but Increases Microhemorrhages in the Brains of Vaccinated Tg2576 (APPsw) Mice. *J Neuroinflammation*. 2008;5:42. DOI: 10.1186/1742-2094-5-42
46. Kawakami S, Sato A, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. Mannose Receptor-Mediated Gene Transfer into Macrophages using Novel Mannosylated Cationic Liposomes. *Gene Ther*. 2000;7(4):292–9. DOI: 10.1038/sj.gt.3301089
47. Lu Y, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Development of an Antigen-Presenting Cell-Targeted DNA Vaccine Against Melanoma by Mannosylated Liposomes. *Biomaterials* 2007;28(21):3255–62. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.03.028
48. Zhao Z, Yao Y, Ding Z, Chen X, Xie K, Luo Y, et al. Antitumour Immunity Mediated by Mannan-Modified Adenovirus Vectors Expressing VE-cadherin. *Vaccine* 2011;29(25):4218–24. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.03.109
49. Arca HC, Gunbeyaz M, Senel S. Chitosan-based Systems for the Delivery of Vaccine Antigens. *Expert Rev Vaccines* 2009;8(7):937–53. DOI: 10.1586/erv.09.47
50. Ghendon Y, Markushin S, Vasiliev Y, Akopova I, Koptiaeva I, Krivtsov G, et al. Evaluation of Properties of Chitosan as an Adjuvant for Inactivated Influenza Vaccines Administered Parenterally. *J Med Virol*. 2009;81(3):494–506. DOI: 10.1002/jmv.21415
51. Chang H, Li X, Teng Y, Liang Y, Peng B, Fang F, Chen Z. Comparison of Adjuvant Efficacy of Chitosan and Aluminum Hydroxide for Intraperitoneally Administered Inactivated Influenza H5N1 Vaccine. *DNA Cell Biol*. 2010;29(9):563–8. DOI: 10.1089/dna.2009.0977
52. Kotze AF, Luessen HL, de Leeuw BJ, de Boer BG, Verhoef JC, Junginger HE. N-trimethyl Chitosan Chloride as a Potential Absorption Enhancer Across Mucosal Surfaces: In Vitro Evaluation in Intestinal Epithelial Cells (Caco-2). *Pharm Res*. 1997;14(9):1197–202.
53. Baudner BC, Giuliani MM, Verhoef JC, Rappuoli R, Junginger HE, Giudice GD. The Concomitant Use of the LTK63 Mucosal Adjuvant and of Chitosan-Based Delivery System Enhances the Immunogenicity and Efficacy of Intranasally Administered Vaccines. *Vaccine* 2003;21(25–26):3837–44.
54. Khatri K, Goyal AK, Gupta PN, Mishra N, Vyas SP. Plasmid DNA Loaded Chitosan Nanoparticles for Nasal Mucosal Immunization Against Hepatitis B. *Int J Pharm*. 2008;354(1–2):235–41. DOI: 10.1016/j.jipharm.2007.11.027
55. Gogev S, de Fays K, Versali MF, Gautier S, Thiry E. Glycol Chitosan Improves the Efficacy of Intranasally Administered Replication Defective Human Adenovirus Type 5 Expressing Glycoprotein D of Bovine Herpesvirus 1. *Vaccine* 2004;22(15–16):1946–53. DOI: 10.1016/j.vaccine.2003.11.011
56. Rauw F, Gardin Y, Palya V, Anbari S, Lemaire S, Boschmans M, et al. Improved Vaccination Against Newcastle Disease by an in Ovo Recombinant HVT-ND Com-

- bined with an Adjuvanted Live Vaccine at Day-Old. *Vaccine* 2010;28(3):823–33. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.10.049
57. Wang X, Zhang W, Liu F, Zheng M, Zheng D, Zhang T, et al. Intranasal Immunization with Live Attenuated Influenza Vaccine Plus Chitosan as an Adjuvant Protects Mice against Homologous and Heterologous Virus Challenge. *Arch Virol*. 2012;157(8):1451–61. DOI: 10.1007/s00705-012-1318-7
58. El-Kamary SS, Pasetti MF, Mendelman PM, Frey SE, Bernstein DI, Treanor JJ, et al. Adjuvanted Intranasal Norwalk Virus-Like Particle Vaccine Elicits Antibodies and Antibody-Secreting Cells that Express Homing Receptors for Mucosal and Peripheral Lymphoid Tissues. *J Infect Dis*. 2010;202(11):1649–58. DOI: 10.1086/657087
59. Lemke CD, Graham JB, Geary SM, Zamba G, Lubaroff DM, Salem AK. Chitosan is a Surprising Negative Modulator of Cytotoxic CD8+ T Cell Responses Elicited by Adenovirus Cancer Vaccines. *Mol Pharm*. 2011;8(5):1652–61. DOI: 10.1021/mp100464y
60. Doz E, Rose S, Nigou J, Gilleron M, Puzo G, Erard F, et al. Acylation Determines the Toll-Like Receptor (TLR)-Dependent Positive Versus TLR2-, Mannose Receptor-, and SIGIRR1-Independent Negative Regulation of Pro-inflammatory Cytokines by Mycobacterial Lipomannan. *J Biol Chem*. 2007; 282(36):26014–25. DOI: 10.1074/jbc.M702690200
61. Yamamura Y, Azuma I, Sugimura K, Yamawaki M, Uemiya M. Adjuvant Activity of 6-O-mycoloyl-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine. *Gan* 1976;67(6):867–77.
62. Azuma I, Okumura H, Saiki I, Kiso M, Hasegawa A, Tanio Y, Yamamura Y. Adjuvant Activity of Carbohydrate Analogs of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine on the Induction of Delayed-Type Hypersensitivity to Azobenzenearsonate-N-acetyl-L-tyrosine in Guinea Pigs. *Infect Immun*. 1981;33(3):834–39.
63. Masihi KN, Lange W, Brehmer W, Ribi E. Immunobiological Activities of Nontoxic Lipid A: Enhancement of Nonspecific Resistance in Combination with Trehalose Dimycolate against Viral Infection and Adjuvant Effects. *Int J Immunopharmacol*. 1986;8(3):339–45.
64. Cekic C, Casella CR, Eaves CA, Matsuzawa A, Ichijo H, Mitchell TC. Selective Activation of the p38 MAPK Pathway by Synthetic Monophosphoryl Lipid A. *J Biol Chem*. 2009;284(46):31982–91. DOI: 10.1074/jbc.M109.046383
65. Schiller JT, Castellsague X, Villa LL, Hildesheim A. An Update of Prophylactic Human Papillomavirus L1 Virus-Like Particle Vaccine Clinical Trial Results. *Vaccine* 2008;26(Suppl 10):K53–K61. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.06.002
66. Quan FS, Ko EJ, Kwon YM, Joo KH, Compans RW, Kang SM. Mucosal Adjuvants for Influenza Virus-Like Particle Vaccine. *Viral Immunol*. 2013;26(6):385–95. DOI: 10.1089/vim.2013.0013
67. Lacaille-Dubois M-A. Bioactive Saponins with Cancer Related and Immunomodulatory Activity: Recent Developments. In: Atta-ur-Rahman, ed. *Bioactive Natural Products*. Amsterdam: Elsevier; 2005. Vol. 32, Part L, P. 209–246. DOI: 10.1016/s1572-5995(05)80057-2.
68. Kensil CR, Wu JY, Soltysik S. Structural and Immunological Characterization of the Vaccine Adjuvant QS-21. *Pharm Biotechnol*. 1995;6:525–41.
69. Pham HL, Ross BP, McGeary RP, Shaw PN, Hewavitharana AK, Davies NM. Saponins from *Quillaja Saponaria* Molina: Isolation, Characterization and Ability to Form Immuno Stimulatory Complexes (ISCOMs). *Curr Drug Deliv*. 2006;3(4):389–97.
70. Quenelle DC, Collins DJ, Rice TL, Prichard MN, Marciani DJ, Kern ER. Effect of an Immune Enhancer, GPI-0100, on Vaccination with Live Attenuated Herpes Simplex Virus (HSV) Type 2 or Glycoprotein D on Genital HSV-2 Infections of Guinea Pigs. *Antiviral Res*. 2008;80(2):223–4. DOI: 10.1016/j.antiviral.2008.05.011
71. Ragupathi G, Coltart DM, Williams LJ, Koide F, Kagan E, Allen J, et al. On the Power of Chemical Synthesis: Immunological Evaluation of Models for Multiantigenic Carbohydrate-Based Cancer Vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(21):13699–704. DOI: 10.1073/pnas.202427599
72. Raphael TJ, Kuttan G. Effect of Naturally Occurring Triterpenoids Glycyrrhizic Acid, Ursolic Acid, Oleanolic Acid and Nomilin on the Immune System. *Phytomedicine* 2003;10(6–7):483–9. DOI: 10.1078/094471103322331421
73. Newman MJ, Wu JY, Gardner BH, Anderson CA, Kensil CR, Recchia J, et al. Induction of Cross-Reactive Cytotoxic T-lymphocyte Responses Specific for HIV-1 gp120 Using Saponin Adjuvant (QS-21) Supplemented Subunit Vaccine Formulations. *Vaccine* 1997;15(9):1001–7.
74. Sasaki S, Sumino K, Hamajima K, Fukushima J, Ishii N, Kawamoto S, et al. Induction of Systemic and Mucosal Immune Responses to Human Immunodeficiency Virus Type 1 by a DNA Vaccine Formulated with QS-21 Saponin Adjuvant via Intramuscular and Intranasal Routes. *J Virol*. 1998;72(6):4931–9.
75. Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, et al. Acemannan Purified from Aloe Vera Induces Phenotypic and Functional Maturation of Immature Dendritic Cells. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(7):1275–84.
76. Bohana-Kashtan O, Ziporen L, Donin N, Kraus S, Fishelson Z. Cell Signals Transduced by Complement. *Mol Immunol*. 2004;41(6–7):583–97. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.04.007
77. Rawal N, Rajagopalan R, Salvi VP. Stringent Regulation of Complement Lectin Pathway C3/C5 Convertase by C4b-binding Protein (C4BP). *Mol Immunol*. 2009;46(15):2902–10. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.07.006
78. Weston SA, Parish CR. Modification of Lymphocyte Migration by Mannans and Phosphomannans. Different Carbohydrate Structures Control Entry of Lymphocytes into Spleen and Lymph Nodes. *J Immunol*. 1991;146(12):4180–6.
79. Dong SF, Chen JM, Zhang W, Sun SH, Wang J, Gu JX, et al. Specific Immune Response to HBsAg is Enhanced by Beta-glucan Oligosaccharide Containing an alpha-(1→3)linked Bond and Biased towards M2/Th2. *Int Immunopharmacol*. 2007;7(6):725–33. DOI: 10.1016/j.intimp.2007.01.004
80. Petrovsky N, Cooper PD. Advax™, a Novel Microcrystalline Polysaccharide Particle Engineered from Delta Inulin, Provides Robust Adjuvant Potency together with Tolerability and Safety. *Vaccine* 2015;33(44):5920–6. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.09.030

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, домовладение 8, стр. 1, Российская Федерация

Курашова Светлана Сергеевна. Младший научный сотрудник

Дзагурова Тамара Казбековна. Руководитель лаборатории геморрагических лихорадок, д-р мед. наук

Ишмухаметов Айдар Айратович. Генеральный директор, д-р мед. наук

Егорова Мария Сергеевна. Старший научный сотрудник, канд. биол. наук

Баловнева Мария Владимировна. Старший научный сотрудник, канд. биол. наук

Соцкова Светлана Евгеньевна. Директор по организационно-методической работе

Ткаченко Евгений Александрович. Руководитель научного направления, д-р мед. наук, профессор

Поступила 30.03.2018

Принята к публикации 26.04.2018

Authors

Federal State Budgetary Scientific Institution «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences», 8/1 housing estate of the Institute of Poliomyelitis, «Moskovsky» Settlement, Moscow 108819, Russian Federation

Svetlana S. Kurashova. Junior Researcher

Tamara K. Dzagurova. Head of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers. Doctor of Medical Sciences

Aidar A. Ishmukhametov. General Director. Doctor of Medical Sciences

Maria S. Egorova. Senior Researcher. Candidate of Biological Sciences

Maria V. Balovneva. Senior Researcher. Candidate of Biological Sciences

Svetlana E. Sotskova. Director in Charge of Organisational and Methodical Issues

Evgeniy A. Tkachenko. Scientific Supervisor. Doctor of Medical Sciences, Professor

Received 30 March 2018

Accepted 26 April 2018

Характеристика кандидата в стандартные образцы аллергена из пыльцы тимopheевки луговой по белковому профилю и специфическим аллергенным компонентам

И. В. Цымбаревич¹, И. С. Ефимова¹, С. П. Калинин¹, А. В. Зубков², С. А. Мазурина², Н. А. Михайлова², Н. В. Зубкова^{1,*}

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», ул. 1-я Дубровская, д. 15, Москва, 115088, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный пер., 5А, стр. 2, Москва, 105064, Российская Федерация

Лекарственные препараты на основе пыльцевых экстрактов аллергенов широко применяются для лечения и диагностики поллинозов. Согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания аллергенную активность этих препаратов оценивают относительно аттестованных стандартных образцов (СО), биологическая активность которых была подтверждена *in vivo* у лиц, сенсибилизированных к исследуемому аллергену. Кандидат в СО тимopheевки луговой в виде готовой лекарственной формы (ГЛФ) и соответствующий аллергенный пыльцевой экстракт (полуфабрикат) были охарактеризованы по белковому профилю и аллергенному составу методами электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и вестерн-блота. Исследование проводили в сравнении с ГЛФ, аллергенными пыльцевыми экстрактами разных периодов сбора пыльцы и даты выпуска, а также международным стандартом аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520). Методами электрофореза в ПААГ и ВЭЖХ выявлено совпадение белковых профилей кандидата в СО по основным белковым фракциям со всеми аллергенными экстрактами и ГЛФ разных дат выпуска. Метод ВЭЖХ подтвердил сходство белковых профилей кандидата в СО и международного стандарта аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520), показав некоторые различия в соотношении основных белковых фракций. Методом вестерн-блота подтверждено наличие главных специфических аллергенных компонентов с относительными молекулярными массами в области 50–60 и 27–35 кДа. Состав специфических аллергенных компонентов препаратов тимopheевки производства АО «НПО «Микроген» по основным белковым и аллергенным компонентам совпадал с международным стандартом аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520).

Ключевые слова: стандартизация; тимopheевка; аллергенные компоненты; аллергенный пыльцевой экстракт; стандартный образец

Для цитирования: Цымбаревич ИВ, Ефимова ИС, Калинин СП, Зубков АВ, Мазурина СА, Михайлова НА, Зубкова НВ. Характеристика кандидата в стандартные образцы аллергена из пыльцы тимopheевки луговой по белковому профилю и специфическим аллергенным компонентам. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2018;18(2):92–97. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-92-97>

* Контактное лицо: Зубкова Наталия Васильевна; n.v.zubkova@microgen.ru

Characterization of the Candidate Reference Material of Timothy Pollen Allergen Extract in Terms of Protein Profile and Specific Allergenic Components

I. V. Tsyymbarevich¹, I. S. Efimova¹, S. P. Kalinin¹, A. V. Zubkov², S. A. Mazurina², N. A. Mikhailova², N. V. Zubkova^{1,*}

¹ Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, 15 1st Dubrovskaya St, Moscow 115088, Russian Federation

² Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A/2 Maly Kazenny lane, Moscow 105064, Russian Federation

Medicinal products based on pollen allergen extracts are widely used for diagnosis and therapy of pollinosis. According to the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed., the allergenic potency of such products is assessed against certified reference materials whose biological activity was confirmed *in vivo* in subjects sensitized to particular tested allergens. The finished dosage form of a candidate In-House Reference Material (IHRM) of timothy pollen allergen extract and the corresponding allergen pollen extract (intermediate) were characterized in terms of protein profile and allergenic composition using SDS-PAGE, gel-filtration HPLC, and western blotting. The test samples were compared to finished pharmaceutical products (FPP) and pollen allergen extracts produced at different dates and made from pollen harvested at different dates, as well as to the WHO International Standard (IS) of Timothy Pollen Extract (NIBSC code: 82/520). SDS-PAGE and gel-filtration HPLC showed that the candidate IHRM protein profile was comparable in terms of major protein fractions to those of all the FPP batches and pollen allergen extracts produced at different dates. HPLC confirmed the comparability of the protein profiles of the candidate IHRM and the IS (NIBSC code: 82/520), but showed minor

variations in the ratio of the main protein fractions. Western blotting confirmed the presence of the main allergenic components with relative molecular masses ranging from 50 to 60 kDa and from 27 to 35 kDa. The composition of specific allergenic components of timothy pollen allergen products manufactured by JSC «SIC «Microgen» was identical with that of the WHO IS of Timothy Pollen Extract in terms of the main protein and allergenic components.

Key words: standardization; timothy; allergenic components; pollen allergen extract; reference materials

For citation: Tcymbarevich IV, Efimova IS, Kalinin SP, Zubkov AV, Mazurina SA, Mikhailova NA, Zubkova NV. Characterization of the Candidate Reference Material of Timothy Pollen Allergen Extract in Terms of Protein Profile and Specific Allergenic Components. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2018;18(2):92–97. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-92-97>

Contact person: Natalia V. Zubkova; n.v.zubkova@microgen.ru

Пыльца тимopheевки луговой (лат. *Phleum pratense*) относится к одним из самых распространенных природных аллергенов среди луговых трав. До 20 % пациентов с аллергией сенсибилизированы к тимopheевке луговой и родственным видам [1] в связи с высокой степенью перекрестной реактивности между белками-аллергенами. Аллергическая реакция провоцирует клинические проявления: поллиноз, аллергический ринит, бронхиальную астму, аллергический конъюнктивит и др. Для лечения и диагностики таких пациентов в 1960-х годах были разработаны препараты пыльцевых аллергенов, представляющие собой водно-солевые экстракты белково-полисахаридных комплексов, выделенных из сырья природного происхождения и способных вызывать аллергическую реакцию.

Состав аллергенных пыльцевых экстрактов чрезвычайно сложен и разнообразен, в него входят белки, пептиды, гликопротеиды, полисахариды, производные липидов и т.д. Традиционно выделяют главные и второстепенные аллергенные компоненты. Подобное разделение основано на частоте реагирования на них лиц с повышенной чувствительностью к соответствующим аллергенам. За главные аллергены принимают те, на которые реагируют более 50 % лиц, сенсибилизированных к пыльцевому экстракту [2].

Многокомпонентный состав аллергенных экстрактов, получаемых из природных источников, создает трудности для стандартизации готовых форм препаратов, изготовленных на их основе. До настоящего времени по-прежнему не разработаны унифицированные методы определения специфической активности и характеристики белкового состава. Для этой цели применяются разные системы и единицы измерения [3], среди них: биологическая единица — BU (Biological Unit), биологическая аллергенная единица — BAU (Biological Allergenic Unit), аллергенная единица — AU (Allergen Units), индекс реактивности — IR (Index of Reactivity), международная единица — IU (International Unit), единица белкового азота — PNU (Protein Nitrogen Unit) и другие.

Выпускаемые в настоящее время диагностические и лечебные аллергены производства АО «НПО «Микроген» стандартизуют по содержанию единиц белкового азота (PNU).

Согласно последним дополнениям к ОФС.1.7.1.0001.15 «Аллергены» Государственной фармакопеи РФ XIII издания (ГФ РФ XIII) [4] серии пыльцевых экстрактов должны быть охарактеризованы относительно стандартного образца (СО). СО представляет собой одну из серий аллергенного экстракта или готового препарата аллергена. В мировой практике для стандартизации аллергенов каждый производитель разрабатывает собственные референс-препараты (In-House Reference Standards), которые также представляют собой охарактеризованные стандартные производственные серии, аттестованные по результатам контроля на сенсибилизированных пациентах и применяемые для сравнительной оценки качества других серий посредством комбинации иммунохимических методов.

Для обеспечения постоянства аллергенной активности выпускаемых лекарственных препаратов пыльцевых аллергенов определяющим является сопоставление выпускаемой серии препарата с СО, охарактеризованным в том числе по белковому и аллергенному составу. Согласно требованиям ГФ РФ XIII серия СО должна быть аттестована по следующим показателям: содержанию общего белка, белковому профилю, аллергенным компонентам, специфической активности. Аналогичные требования к стандартизации аллергенов выдвигают и зарубежные фармакопеи. По показателю «Белковый профиль» СО должен быть охарактеризован одним из следующих методов — электрофорезом в ПААГ с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE электрофорез), иммуноэлектрофорезом, капиллярным электрофорезом, хроматографией, масс-спектрометрией. Также СО должен быть охарактеризован по показателю «Подлинность». Выявление специфических аллергенных компонентов осуществляется методами вестерн-блота или иммуноферментного анализа с использованием специфических IgE-содержащих сывороток крови от лиц, сенсибилизированных к исследуемому аллергену.

Цель работы — характеристика кандидата в стандартные образцы (СО) аллергена из пыльцы тимopheевки луговой по белковому профилю и специфическим аллергенным компонентам (с помощью вестерн-блота).

Материалы и методы

Материалы

1. Кандидат в СО: Аллерген из пыльцы тимopheевки луговой для диагностики и лечения (ПУ № ЛС-000881) в концентрации 8200 PNU/мл. Согласно требованиям нормативной документации показатель белкового азота для готовой лекарственной формы (ГЛФ) должен лежать в диапазоне 10000 ± 2500 PNU/мл. Соответствующие аллергенные пыльцевые экстракты (полуфабрикаты) в концентрации 25400 PNU/мл (№ 1) и 16200 PNU/мл (№ 2), изготовленные по действующему промышленному регламенту. Производитель: АО «НПО «Микроген» (г. Ставрополь, НПО «Аллерген»).

2. Образцы аллергена из пыльцы тимopheевки луговой от разных дат выпуска и годов сбора пыльцы в виде ГЛФ в концентрациях 9900 PNU/мл (2011 г.), 11400 PNU/мл (2011 г.) и 9700 PNU/мл (2012–2013 гг.). Аллергенные пыльцевые экстракты (полуфабрикаты) в концентрациях 25000 PNU/мл (2012 г.) и 29000 PNU/мл (2013 г.).

3. Международный стандарт аллергена из пыльцы тимopheевки луговой, WHO International Standard Timothy Pollen Extract (Национальный институт биологической стандартизации и контроля (NIBSC)) code: 82/520, с активностью 100000 IU (международных единиц) на ампулу. Стандарт восстанавливали в 1 мл воды до концентрации 100000 IU/мл. Для последующего анализа использовали концентрацию 10000 IU/мл.

4. Стандарт для эксклюзионной хроматографии Gel Filtration Standard (BioRad Labs, США, #151-1901).

5. Бычий сывороточный альбумин (БСА), фракция V (AppliChem, Германия, A6588,0100).

6. Сыворотка крови к аллергену из пыльцы тимфеовки луговой (положительная). Специфическая активность: содержит аллергенспецифические IgE-антитела к аллергену тимфеовки луговой; уровень IgE-антител — 3-й класс.

Методы

Электрофорез в ПААГ и вестерн-блот. Испытания кандидата в СО проводили по показателям: «Белковый профиль» (электрофорез в ПААГ, ВЭЖХ) и «Подлинность» (вестерн-блот). Электрофорез проводили в 15 % ПААГ с додецилсульфатом натрия (SDS) в восстанавливающих условиях (в присутствии дитиотреитола) с использованием системы для вертикального электрофореза Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad Labs, США, #165-8004). Приготовление 15 % ПААГ, электрофорез, окрашивание ПААГ Coomassie R-250 (Serva, Германия, #1752501) осуществляли в соответствии с ОФС.1.2.1.0023.15 [5]. Определение подлинности в присутствии аллергенспецифических сывороток выполняли методом вестерн-блота в соответствии с ОФС.1.7.2.0022.15 [6]. Образцы концентрировали с помощью микроконцентраторов Amicon Ultra-0.5 (Merck, Германия, #UFC5010BK).

Эксклюзионная ВЭЖХ. Хроматографический анализ кандидата в СО, аллергенных пыльцевых экстрактов, серий ГЛФ и стандарта ВОЗ тимфеовки луговой проводили при соблюдении фармакопейных требований методом эксклюзионной ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования [7, 8].

Анализ проводили на колонке Supelco 12 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция) с применением хроматографической системы Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Германия). Детекцию осуществляли на флуориметрическом детекторе в режиме длин волн возбуждения/испускания $E_x = 280$ / $E_m = 345$ нм. Элюирование выполняли 10-мМ фосфатным буферным раствором (рН 6,8), содержащим 0,4-М натрия хлорида и 0,02 % твин 20, модифицированным ацетонитрилом (соотношение 4:1), со скоростью 0,5 мл/мин. Объем инъекций составлял 50 мкл.

Образцы аллергенных препаратов использовали без предварительной пробоподготовки. Приготовление стандарта для эксклюзионной хроматографии проводили в соответствии с рекомендациями производителя, затем разводили в 100 раз в подвижной фазе. Раствор БСА с концентрацией 1 мг/мл готовили по навеске, разводили в подвижной фазе до концентрации 0,025 мг/мл. Международный стандарт аллергена из пыльцы тимфеовки луговой (NIBSC code: 82/520) разводили до 10000 IU/мл подвижной фазой.

Результаты и обсуждение

Белковый и аллергенный состав препаратов пыльцевого экстракта может существенно отличаться у разных производителей лечебных аллергенов [9]. Состав экстракта определяется прежде всего видом растения. Однако известно, что на содержание компонентов также оказывают влияние дополнительные факторы: климатические и погодные условия, влажность среды, условия хранения, стадия созревания пыльцы на момент экстракции, а также технология производства. Поэтому перед изготовителями аллергенных препаратов из пыльцы растений стоит задача по получению экстрактов оптимального состава с максимально полным и стандартным набором основных аллергенных компонентов.

Ранее были описаны главные аллергены тимфеовки луговой, к которым относятся белки: Phl p 1 (>90 %) и Phl p 5 (85 %) (27–35 кДа) [10], Phl p 2 (60 %) и Phl p 3 (70 %) (11–14 кДа) [11, 12], Phl p 4 (75 %) и Phl p 13 (56 %) (50–60 кДа) [11, 12]. Помимо главных аллергенов, специфические IgE антитела могут взаимодействовать с второстепенными аллергенами: Phl p 6 (12–13 кДа), Phl p 7 (8–10 кДа), Phl p 11 (16–20 кДа) и Phl p 12 (12–15 кДа) [13, 14].

Также в 1985 г. был аттестован первичный международный стандарт аллергена из пыльцы тимфеовки луговой (WHO International Standard Timothy Pollen Extract, NIBSC code: 82/520) по биологической активности [2]. Каждой ампуле стандарта было присвоено 100000 IU (международных единиц).

В настоящей работе проанализирован кандидат в СО аллергена из пыльцы тимфеовки луговой по показателям «Белковый профиль» методами гель-электрофореза в ПААГ и ВЭЖХ и «Подлинность» методом вестерн-блота.

На первом этапе были получены белковые профили кандидата в СО, образцов ГЛФ и аллергенных пыльцевых экстрактов (полуфабрикатов) тимфеовки луговой (рис. 1) от разных дат выпуска. Установлено, что относительные молекулярные массы подавляющего большинства белков пыльцы тимфеовки, в том числе белков-аллергенов, лежат в диапазоне 10–100 кДа. Анализ электрофоретических профилей экстрактов тимфеовки луговой производства АО «НПО «Микроген» выявил наличие полос белков с ожидаемыми для главных и второстепенных аллергенных компонентов молекулярными массами в области 50–60 кДа (группы 4 и 13), 27–35 кДа (группы 1 и 5) и менее 14 кДа (группы 2 и 3) (обозначены стрелками на рис. 1). В ходе работы также установлено, что белковые профили исследованных образцов тимфеовки луговой идентичны и не зависят от года заготовки сырья и даты выпуска препаратов. Более концентрированные образцы аллергенных пыльцевых экстрактов имели более выраженный профиль, так как увеличение концентрации повышает чувствительность метода гель-электрофореза в ПААГ. Наиболее представленными оказались фракции белков с молекулярными массами 50–60 и менее 14 кДа, которые также были выявлены при сравнении

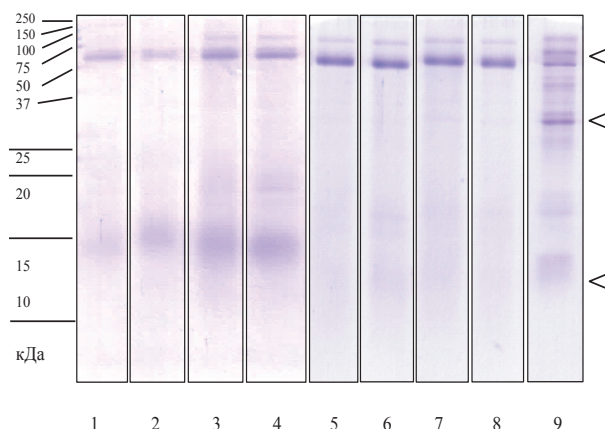


Рис. 1. Электрофорез коммерческих серий и аллергенных экстрактов тимфеовки луговой различных годов сбора пыльцы. Окрашивание Coomassie R-250. Готовые лекарственные формы: 1 — 2011 г., 2 — 2011 г., 3 — 2012/2013 гг.; 4 — 2013 г. (кандидат в стандартные образцы); промежуточные аллергенные экстракты: 5 — 2013 г. (кандидат в стандартные образцы № 1); 6 — 2013 г. (кандидат в стандартные образцы № 2); 7 — 2012 г.; 8 — 2013 г.; 9 — международный стандарт аллергена из пыльцы тимфеовки луговой (NIBSC code: 82/520) (октябрь 1980-х гг.).

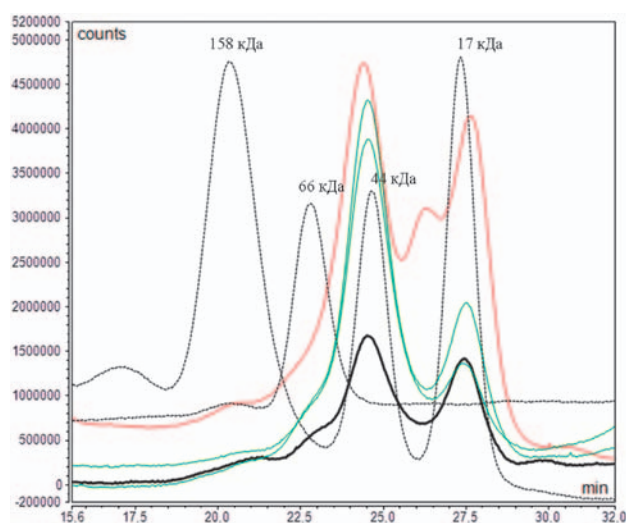


Рис. 2. Хроматографические профили кандидата в стандартные образцы аллергенного пыльцевого экстракта тимфеовки луговой (черная хроматограмма) и его промежуточных аллергенных экстрактов (зеленые хроматограммы) на фоне международного стандарта аллергена из пыльцы тимфеовки луговой (NIBSC code: 82/520) (красная хроматограмма). Стандарты относительной молекулярной массы для эксклюзионной хроматографии обозначены пунктирной линией.

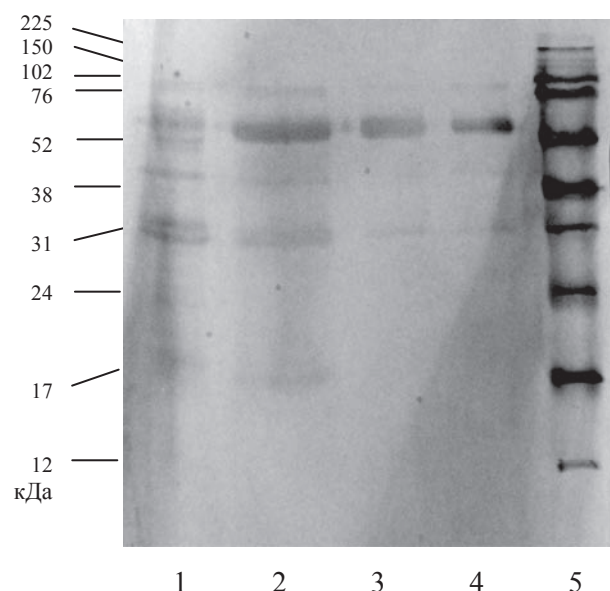


Рис. 3. Выявление специфических аллергенных компонентов аллергенного пыльцевого экстракта тимфеовки луговой с антителами из сыворотки крови пациентов. 1 — Международный стандарт аллергена из пыльцы тимфеовки луговой (NIBSC code: 82/520); 2 — кандидат в стандартные образцы (5-кратный); 3 — соответствующий аллергенный экстракт кандидата в стандартные образцы; 4 — кандидат в стандартные образцы; 5 — маркер.

с белковым профилем международного стандарта аллергена из пыльцы тимфеовки луговой (NIBSC code: 82/520).

Помимо электрофореза в ПААГ, белковые профили кандидата в СО, образцов ГЛФ и аллергенных пыльцевых экстрактов (полуфабрикатов) тимфеовки луговой были получены методом эксклюзионной ВЭЖХ. Диапазон относительных молекулярных масс основных детектируемых фракций был оценен относительно стандарта для эксклюзионной хроматографии,

содержащего, в том числе смесь белков в интересующем нас диапазоне относительных молекулярных масс 17–158 кДа, и образца БСА с относительной молекулярной массой 66 кДа (рис. 2, пунктирные линии). Для всех изученных образцов тимфеовки были выявлены две группы основных пиков, соответствующих белковым фракциям в диапазоне относительных молекулярных масс около 50 и 15 кДа, что полностью соответствует данным электрофореза в ПААГ. Сравнение хроматографических профилей кандидата в СО (рис. 2, черная линия) и аллергенных пыльцевых экстрактов, в том числе послуживших сырьем для его приготовления (рис. 2, зеленые линии), а также образцов ГЛФ от других дат выпуска (данные не приведены) показало идентичность содержащихся в образцах белковых фракций. Отсутствие на хроматограмме кандидата в СО фракции 27–35 кДа, детектируемой, однако, для международного стандарта аллергена из пыльцы тимфеовки луговой (NIBSC code: 82/520) (рис. 2, красная линия), связано, по-видимому, с ее низкой концентрацией; при этом ее присутствие в аллергене тимфеовки производства АО «НПО «Микроген» было доказано методом вестерн-блота (рис. 3).

Методом вестерн-блота проведен анализ подлинности аллергена из пыльцы тимфеовки луговой. Предварительно был отобран образец сыворотки крови от лица, сенсibilизированного к пыльце тимфеовки луговой, и содержащий соответствующие антитела. Для повышения чувствительности метода вестерн-блота образец кандидата в СО был сконцентрирован в пять раз с помощью микроконцентраторов. Затем были исследованы кандидат в СО из пыльцы тимфеовки луговой (в исходной и пятикратной концентрациях) в сравнении с соответствующим аллергенным экстрактом (в исходной концентрации) и международным стандартом аллергена из пыльцы тимфеовки луговой (NIBSC code: 82/520; 10000 IU/мл), получены профили их аллергенных специфических компонентов (рис. 3). Обнаружены специфические аллергенные компоненты в двух основных областях: 27–35 кДа, соответствующей главным белкам-аллергенам Phl p 1 и Phl p 5; и 50–60 кДа, соответствующей главным белкам-аллергенам групп 4 и 13. Также выявлены полосы преципитации менее 20 кДа, предположительно соответствующие минорным аллергенным компонентам. Полученные профили специфических аллергенных компонентов показали высокую степень сходства международного стандарта аллергена из пыльцы тимфеовки луговой (NIBSC code: 82/520) и образцов производства АО «НПО «Микроген».

Выводы

Охарактеризован белковый профиль кандидата в СО аллергена из пыльцы тимфеовки луговой методами гель-электрофореза в ПААГ и ВЭЖХ. Подтверждена идентичность белковых профилей исследованных образцов аллергена из пыльцы тимфеовки луговой разных дат выпуска. Выявлено наличие специфических аллергенных компонентов в кандидате в СО и в соответствующем полуфабрикате, а также сходство аллергенного профиля с образцом международного стандарта аллергена из пыльцы тимфеовки луговой (NIBSC code: 82/520). Целесообразно использование более концентрированных образцов аллергена для успешной идентификации белковых и аллергенных компонентов в составе.

Информация об отсутствии конфликта интересов.

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

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

Литература / References

1. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, et al. Allergenic Pollen and Pollen Allergy in Europe. *Allergy* 2007;62(9):976–90. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01393.x
2. Gjesing B, Jäger L, Marsh DG, Löwenstein H. The International Collaborative Study Establishing the First International Standard for Timothy (*Phleum pratense*) Grass Pollen Allergenic Extract. *J Allergy Clin Immunol.* 1985;75(2):258–67.
3. Невская ЛВ, Радунская СФ, Лавренчик ЕИ, Мовсесянц АА, Капитанова ВК, Короткова МЮ. Применение иммуноанализа для решения актуальных проблем стандартизации препаратов аллергенов. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015;(3):17–20. [Nevskaya LV, Radunskaya SF, Lavrenchik EI, Movsesyants AA, Kapitanova VK, Korotkova MYu. Immunoassay for the Purpose of Solving Current Issues Associated with Standardization of Allergen Preparations. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015;(3):17–20 (in Russ.)] DOI: 10.30895/2221-996X-2015-3-17-20
4. Общая фармакопейная статья 1.7.1.0001.15 Аллергены. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.; 2015. [General Monograph 1.7.1.0001.15 Allergens. *The State Pharmacopoeia of Russian Federation* 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
5. Общая фармакопейная статья 1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General Monograph 1.2.1.0023.15 SDS-PAGE. *The State Pharmacopoeia of Russian Federation* 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
6. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0022.15 Определение подлинности и чистоты иммунобиологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.; 2015. [General Monograph 1.7.2.0022.15 Characterization and Purity Determination of Biotherapeutics by Immunoblotting. *The State Pharmacopoeia of Russian Federation* 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
7. Общая фармакопейная статья 1.2.1.2.0001.15 Хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General Monograph 1.2.1.2.0001.15 Chromatography. *The State Pharmacopoeia of Russian Federation* 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
8. Общая фармакопейная статья 1.2.1.2.0005.15 Высокоэффективная жидкостная хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General Monograph 1.2.1.2.0005.15 High-Performance Liquid Chromatography. *The State Pharmacopoeia of Russian Federation* 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
9. Focke M, Marth K, Flicker S, Valenta R. Heterogeneity of Commercial Timothy Grass Pollen Extracts. *Clin Exp Allergy* 2008;38(8):1400–8. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2008.03031.x
10. Matthiesen F, Löwenstein H. Group V Allergens in Grass Pollens. I. Purification and Characterization of the Group V Allergen from *Phleum pratense* Pollen, Phl p V. *Clin Exp Allergy* 1991;21(3):297–307.
11. Suck R, Petersen A, Hagen S, Cromwell O, Becker WM, Fiebig H. Complementary DNA Cloning and Expression of a Newly Recognized High Molecular Mass Allergen Phl p 13 from Timothy Grass Pollen (*Phleum pratense*). *Clin Exp Allergy* 2000;30(3):324–32.
12. Suck R, Hagen S, Cromwell O, Fiebig H. The High Molecular Mass Allergen Fraction of Timothy Grass Pollen (*Phleum pratense*) between 50–60 kDa is Comprised of Two Major Allergens: Phl p 4 and Phl p 13. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(10):1395–402.
13. Sekerkova A, Polackova M, Striz I. Detection of Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7 and Phl p 12 Specific IgE Antibodies in the Sera of Children and Adult Patients Allergic to *Phleum* Pollen. *Allergol Int.* 2012;61(2):339–46. DOI: 10.2332/allergolint.11-OA-0372
14. Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P, et al. Profilins Constitute a Novel Family of Functional Plant Pan-allergens. *J Exp Med.* 1992;175(2):377–85.

Об авторах

Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген». Российская Федерация, 115088, Москва, ул. 1-я Дубровская, д. 15

Цымбаревич Ирина Всеволодовна. Главный специалист-эксперт по экспериментальным технологиям отдела инновационных проектов Центра разработок и внедрения (R&D)

Ефимова Ирина Сергеевна. Начальник отдела инновационных проектов Центра разработок и внедрения (R&D), канд. хим. наук

Калинин Сергей Павлович. Директор Центра разработок и внедрения (R&D), канд. техн. наук

Зубкова Наталия Васильевна. Заместитель директора Центра разработок и внедрения (R&D) по технологиям, д-р фарм. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». Российская Федерация, 105064, Москва, Малый Казенный пер., д. 5А, стр. 2

Зубков Александр Владимирович. Заведующий лабораторией иммунологической диагностики эндокринных заболеваний, канд. мед. наук

Мазурина Светлана Александровна. Ведущий научный сотрудник лаборатории аллергодиагностики, канд. биол. наук

Михайлова Наталья Александровна. Заместитель директора института по научной работе, д-р мед. наук, профессор

Поступила 19.02.2018

Принята к публикации 26.04.2018

Authors

Joint Stock Company «Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines», 15 1st Dubrovskaya St, Moscow 115088, Russian Federation

Irina V. Tsyimbarevich. Chief Expert in Experimental Technologies of the Department of Innovation Projects of the Centre for R&D Implementation

Irina S. Efimova. Head of the Department of Innovation Projects of the Centre for R&D Implementation. Candidate of Chemical Sciences

Sergey P. Kalinin. Director of the Centre for R&D Implementation. Candidate of Technical Sciences

Natalia V. Zubkova. Deputy Director of the Centre for R&D Implementation. Doctor of Pharmaceutical Sciences

Federal State Budgetary Scientific Institution «Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 5A/2 Maly Kazenny lane, Moscow 105064, Russian Federation

Alexander V. Zubkov. Head of the Laboratory of Immunological Diagnosis of Endocrine Disorders. Candidate of Medical Sciences

Svetlana A. Mazurina. Leading Researcher of the Laboratory of Allergy Diagnosis. Candidate of Biological Sciences

Natalya A. Mikhailova. Deputy Director of the Scientific Research Institute. Doctor of Medical Sciences, Professor

Received 19 February 2018

Accepted 26 April 2018

Разработка и валидация методики определения невидимых механических включений в воде для инъекций с применением метода Култера (электрочувствительных зон)

А. А. Воропаев*, О. В. Фадейкина, Т. Н. Ермолаева, Д. С. Давыдов, Р. А. Волкова, Д. В. Шведов

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

Вода для инъекций является одним из самых распространенных растворителей для приготовления лекарственных форм для парентерального применения. Согласно Европейской фармакопее, для контроля на невидимые механические включения рекомендуется использование счетно-фотометрического метода и метода микроскопии. В Российской фармакопее XIII издания дополнительно предусмотрено применение метода Култера (электрочувствительных зон). В связи с этим актуальным является разработка методики определения невидимых механических включений в воде для инъекций, основанной на методе Култера (далее — методика). В статье представлены результаты разработки и валидационных исследований характеристик методики: правильности, линейности разведений, промежуточной прецизионности, повторяемости при оценке количества частиц размером более 10 мкм. Результаты оценки невидимых механических включений, полученные с использованием разработанной методики на основе метода Култера, сопоставляли с результатами, полученными по методике на основе счетно-фотометрического метода. Правильность разработанной методики подтверждена статистической незначимостью отличий полученных результатов. Значения промежуточной прецизионности по фактору «время» (не более 14 %) и повторяемости (не более 15 %) не превысили принятого критерия приемлемости получаемых результатов, равного пределу допускаемой погрешности прибора при оценке счетной концентрации частиц в исследуемых образцах (20 %). Показана линейность разведений методики (коэффициент детерминации $R^2 = 0,999$). Результаты, полученные в ходе валидационных исследований методики, показывают принципиальную возможность применения метода Култера для оценки невидимых механических включений в воде для инъекций.

Ключевые слова: вода для инъекций; невидимые механические включения; метод Култера (электрочувствительных зон); счетно-фотометрический метод (метод светоблокировки)

Для цитирования: Воропаев АА, Фадейкина ОВ, Ермолаева ТН, Давыдов ДС, Волкова РА, Шведов ДВ. Разработка и валидация методики определения невидимых механических включений в воде для инъекций с применением метода Култера (электрочувствительных зон). БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2018;18(2):98–105. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-98-105>

* Контактное лицо: Воропаев Андрей Андреевич; voropaev@expmed.ru

Development and Validation of a Procedure for Subvisible Particles Determination in Water for Injections by the Coulter Principle (Electrical Sensing Zone Method)

A. A. Voropaev*, O. V. Fadeikina, T. N. Ermolaeva, D. S. Davydov, R. A. Volkova, D. V. Shvedov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Water for injections is one of the most popular diluents used for preparation of parenteral dosage forms. The European Pharmacopoeia recommends two methods for the determination of subvisible particulate matter: Light Obscuration Particle Count Test and Microscopic Particle Count Test. The Russian Pharmacopoeia, 13th ed., additionally allows for the use of the Coulter principle (Electrical Sensing Zone method). Thus, a procedure had to be developed for subvisible particles determination in water for injections based on the Coulter principle (hereinafter — procedure). The article presents the results of development and validation of the procedure, i.e. the characteristics of accuracy, dilutional linearity, ruggedness in terms of the time factor, and repeatability for particles more than 10 µm in size. The results of subvisible particles determination obtained with the help of the developed procedure based on the Coulter principle were compared to the results obtained with the help of the light obscuration particle count test. The accuracy of the developed procedure was supported by the statistical insignificance of the differences between the obtained results. The values of ruggedness in terms of the time factor (NMT 14 %) and repeatability (NMT 15 %) did not exceed the established acceptance criterion which is equal to the acceptable limit of the instrument error for particle count in the tested samples (20 %). The dilutional linearity of the procedure was demonstrated (coefficient of determination $R^2 = 0.999$). The results obtained during the validation studies support the possibility of using the Coulter principle for the assessment of subvisible particles in water for injections.

Key words: water for injections; subvisible particulate matter; Coulter principle (electrical sensing zone method); light obscuration particle count test

For citation: Voropaev AA, Fadeikina OV, Ermolaeva TN, Davydov DS, Volkova RA, Shvedov DV. Development and Validation of a Procedure for Subvisible Particles Determination in Water for Injections by the Coulter Principle (Electrical Sensing Zone Method). *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2018;18(2):98–105. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-98-105>

* **Contact person:** Andrey A. Voropaev; voropaev@expmed.ru

Вода для инъекций является одним из самых распространенных растворителей для приготовления лекарственных форм для парентерального применения [1]. Получают воду для инъекций из воды питьевой методами дистилляции, ионного обмена, обратного осмоса или комбинацией этих методов. При этом в воде для инъекций практически не остается ионов и электропроводность, в зависимости от температуры, составляет от 2,1 до 3,1 мкСм/см [2]. Для контроля на невидимые механические включения используют счетно-фотометрический метод и метод микроскопии [3]. Российской фармакопеей дополнительно предусмотрено применение метода электрочувствительных зон (метод Култера) [4]. В связи с этим актуальным является разработка методики определения невидимых механических включений в воде для инъекций, основанной на методе Култера (далее — методика).

Существенное ограничение метода Култера заключается в том, что измерения необходимо проводить в растворе электролита [5]. Изотонический раствор Изотон II, который производитель оборудования рекомендует использовать для корректной работы прибора, характеризуется удельной электропроводностью (σ), равной 17,17 мСм/см, и удельным сопротивлением (ρ), равным 58,8 кОм/см. Вода для инъекций, имеющая электропроводность в 6–8 тысяч раз меньшую, чем электропроводность Изотона, не является электролитом (неэлектропроводный материал) и непосредственное измерение в ней количества и размера частиц методом Култера невозможно. Проведенные нами ранее экспериментальные исследования показали, что для расширения возможностей применения этого метода возможно разведение испытуемого образца раствором электролита. При этом даже разведение в 2–6 раз не приводило к уменьшению точности результатов измерений: коэффициент вариации не превышал 3 % [6].

Цель работы — разработать и провести валидационные исследования методики, основанной на методе Култера, прободготовки и анализа воды для инъекций методом электрочувствительных зон.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- определить параметры разведения воды для инъекций раствором натрия хлорида;
- оценить линейность разведений методики;
- оценить характеристики точности методики: правильность, промежуточную прецизионность по фактору «время», повторяемость.

Материалы и методы

Материалы

Для разработки и проведения валидационных исследований методики определения невидимых механических включений в воде для инъекций с применением метода Култера (электрочувствительных зон) были использованы: вода для инъекций производства ООО «Гротекс», Россия; суспензия стандартных латексных частиц N.I.S.T. (National Institute of Standards and Technology) Coulter[®] CC Size Standards с заданными размерами (20,6 мкм) производства фирмы Beckman Coulter[™], США; натрий хлорид химически чистый (содержание основного компонента 99,0–100,5 %), производства Sigma-Aldrich,

США; шприцевой фильтр Minisart с диаметром пор 0,2 мкм, производства Sartorius Stedim biotech, Франция.

Приготовление модельных суспензий частиц в воде для инъекций. Готовили три модельные смеси латексных частиц в воде для инъекций. К 200 мл воды для инъекций добавляли 1 мл суспензии стандартных латексных частиц размером 20,6 мкм (модельная смесь № 1, концентрация частиц 3000–4000 шт./мл). Затем тщательно перемешивали с использованием магнитной мешалки. Из полученной суспензии отбирали 20 мл и добавляли к 180 мл воды для инъекций и снова перемешивали с использованием магнитной мешалки (модельная смесь № 2, концентрация частиц 300–400 шт./мл). Данную процедуру повторяли еще один раз (модельная смесь № 3, концентрация частиц 30–40 шт./мл). В результате были получены смеси латексных частиц десятикратного разведения. Данные смеси использовали в качестве модельных при валидации методики. Каждый образец модельной смеси делили на две части, которые исследовали методом Култера и счетно-фотометрическим методом.

Приготовление раствора натрия хлорида 9 %. К 50 мл воды для инъекций добавляли 4,5 г натрия хлорида. Перемешивали с использованием магнитной мешалки. Затем приготовленный раствор фильтровали с использованием шприцевого фильтра с размером пор 0,2 мкм.

Методы

Метод электрочувствительных зон (метод Култера).

Принцип метода Култера основан на измерении импульсов электрического напряжения, возникающих при прохождении частицы через отверстие (апертура) в непроводящей перегородке (апертурная трубка). Импульс напряжения обусловлен увеличением сопротивления между электродами в тот момент, когда частица, увлекаемая потоком токопроводящей жидкости, проходит сквозь апертуру («электрочувствительная зона»). Величина импульса пропорциональна объему частицы.

Валидационные исследования методики проводили с использованием подготовленных модельных смесей, используя анализатор частиц Multisizer 4e и программное обеспечение Multisizer 4e. Согласно Государственной фармакопее (ГФ) Российской Федерации XIII издания использовали апертурную трубку размером 100 мкм, количество проб — 3 [4].

Метод счетно-фотометрический. Счетно-фотометрический метод (светоблокировки) основан на принципе поглощения частицами проходящего света. Действие приборов, которые реализуют этот метод, основано на прохождении исследуемого раствора через кювету, расположенную между источником света и фотодиодом. Частицы, проходящие через кювету, пересекают луч света и снижают начальную интенсивность первоначального потока. Амплитуда сигнального импульса пропорциональна площади проекции частицы в плоскости, перпендикулярной лучу [7].

Исследования проводили с использованием счетчика частиц в жидкости серии HIAC 9703+ и программы PharmSpec 3.2, лицензии на фармакопейные тесты Европейской фармакопее. Испытания проводили согласно методике, описанной в Европейской фармакопее (метод В): в пробе объемом не менее 25 мл определяли число частиц размером, равным или

превышающим 10 и 25 мкм. Проводили 4 измерения. При этом не принимали в расчет результаты определения для первой пробы и рассчитывали среднее число частиц в испытуемом образце [3].

Статистическую обработку проводили, рассчитывая среднеарифметическое значение, выборочную дисперсию (S^2), выборочное стандартное (среднеквадратическое) отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (CV , коэффициент вариации) результатов измерений количества частиц с применением пакета статистических программ Excel.

Однородность полученных результатов оценивали с применением критерия Кохрена (G). Для каждого образца рассчитывали выборочную дисперсию (S^2). Величину $G_{\text{расч}}$ рассчитывали как отношение наибольшей дисперсии для данной выборки к сумме всех дисперсий по формуле:

$$G_{\text{расч}} = \frac{(S^2)_{\text{max}}}{\sum_{i=1}^L S_i^2}$$

и сравнивали ее с критическим значением для критерия Кохрена — $G_{\text{расч}}^*$, который выбирали в зависимости от трех основных параметров:

а) заданной доверительной вероятности $P \geq 0,95$;

б) числа степеней свободы $f = 3 - 1 = 2$;

в) количества измерений (L) в серии, по которым рассчитывают сумму в знаменателе, равного 3 [8].

Оценку правильности определения счетной концентрации частиц размером более 10 мкм разработанной методикой в сравнении со счетно-фотометрическим методом проводили с помощью t -критерия Стьюдента для уровня значимости $p \leq 0,05$, числа степеней свободы $df = 2(n - 1) = 2(6 - 1) = 10$ [8].

Результаты и обсуждение

Разработка методики

Оптимальные для проведения испытаний характеристики электропроводности изотонического раствора обеспечиваются содержанием в нем 0,9 % натрия хлорида. Поэтому для создания условий, при которых возможно проведение испытаний воды для инъекции, необходимо довести содержание натрия хлорида до 0,9 % в исследуемом объеме. Объем пробы приняли равным 20 мл, так как он соответствует стандартному объему кюветы, выпускаемой производителем оборудования.

Имея исходный 9 % раствор натрия хлорида, мы рассчитали, что для создания 0,9 % раствора натрия хлорида в пробе воды для инъекций объемом 20 мл необходимо взять 19 мл воды для инъекций и 1 мл 9 % раствора натрия хлорида. Электрическое сопротивление в апертуре подготовленного таким способом образца составило 27,0 кОм, что соответствует оптимальному для реализации методики диапазону (5–40 кОм) [9]. При анализе результатов необходимо учитывать разведение и пересчитывать количество частиц на исходный объем.

Ранее нами было показано, что оптимальное количество параллельных измерений одной пробы составляет 3 (коэффициент вариации 2,7 %), так как при увеличении количества измерений, например до 14, увеличивается и коэффициент вариации (13,6 %), что объясняется гравитационным оседанием частиц за время проведения анализа [10].

Описание разработанной методики. Общий объем пробы 20 мл; пробоподготовка: к 19 мл воды для инъекций добавляют 1 мл 9 % раствора натрия хлорида. Проводили измерение трех аналитических проб объемом 1 мл, вычисляли среднее значение количества частиц размерами более 10 мкм. Результаты изме-

рения анализировали, учитывая фактор разведения. Для этого в настройках прибора вводили соотношение раствора электролита и пробы (коэффициент предварительного разведения).

Валидационные исследования разработанной методики

Исследования методики определения невидимых механических включений в воде для инъекций (на основе метода Култера) проводили в сравнении со счетно-фотометрическим методом на модельных суспензиях, содержащих частицы размером 20,6 мкм (мода). Учитывали результаты оценки количества частиц размером более 10 мкм. Из каждой модельной смеси для проведения испытаний готовили по три образца.

Аналитический диапазон методики определяется размером используемой апертурной трубки и составляет 2–60 % от ее диаметра. При использовании апертурной трубки 100 мкм, как указано в ГФ XIII издания, аналитический диапазон составляет 10–60 мкм.

В ходе исследований оценивали следующие характеристики методики: правильность, линейность разведений, повторяемость, промежуточную прецизионность по фактору «время». В соответствии с методикой поверки анализаторов размера частиц Multisizer предел допускаемой погрешности при оценке счетной концентрации составляет $\pm 20\%$ [11]. Это значение приняли как критерий приемлемости результатов, получаемых с помощью разработанной методики.

Оценка правильности методики. Правильность разработанной методики оценивали в сравнении с методикой на основе счетно-фотометрического метода. Результаты оценки правильности представлены в таблице 1.

Как следует из данных, приведенных в таблице 1, значения коэффициента Стьюдента, рассчитанные по экспериментальным данным для модельных смесей № 1, 2, 3, составили $t_{\text{эксп1}} = 1,511$, $t_{\text{эксп2}} = 0,780$, $t_{\text{эксп3}} = 0,894$ соответственно, не превышают $t_{\text{табл}}$ ($p \leq 0,05$; $df = 10$) = 2,228. Из этого следует, что различия результатов подсчета количества частиц нормируемого размера, полученных методикой, разработанной на основе метода Култера, и методикой на основе счетно-фотометрического метода, статистически незначимы. Следовательно, правильность методики, оцененная в сравнении с методикой на основе счетно-фотометрического метода, является удовлетворительной.

Оценка линейности разведений. Результаты определения количества частиц при оценке правильности были использованы для определения линейности разведений методики. Результаты представлены на рисунке 1.

Коэффициент детерминации (R^2), рассчитанный по результатам определения количества частиц размером больше 10 мкм в модельных взвешях, приготовленных десятикратным разведением, как разработанной методикой, так и методикой, основанной на счетно-фотометрическом методе, составил 0,999, что свидетельствует о линейности разведений разработанной методики.

Оценка повторяемости методики. Однородность результатов анализа при реализации методики при измерении одного образца оценивали с применением критерия Кохрена, сравнивая результаты измерений отдельных аналитических проб ($n = 3$), полученные в ходе испытания каждого из трех образцов для каждой модельной смеси.

Повторяемость характеризовали значением относительного стандартного отклонения (коэффициент вариации), рассчитанного по результатам определения количества частиц в модельных смесях в условиях повторяемости.

Результаты оценки однородности полученных результатов и повторяемости методики представлены в таблице 2.

Таблица 1. Результаты оценки правильности определения невидимых механических включений в воде для инъекций с применением методики на основе метода Култера (электрочувствительных зон) в сравнении с методикой на основе счетно-фотометрического метода

Мо- дельная смесь	Показатель	Методика на основе метода Култера			Методика на основе счетно- фотометрического метода			Значение критерия Стьюдента	
		количество частиц, шт./мл			количество частиц, шт./мл			$t_{\text{расч } i}$	$t_{\text{табл}}$ ($p \leq 0,05$; $df = 10$)
		X	$X_{\text{ср}} (n=6)$	$CV, \%$	X	$X_{\text{ср}} (n=6)$	$CV, \%$		
№ 1	Количество частиц ≥10 мкм	3833	3330	14	3935	3577	13	1,511	2,228
		3200			3753				
		2957			3042				
		4438			3428				
		3884			4201				
		3692			3100				
№ 2	Количество частиц ≥10 мкм	403	453	14	413	431	10	0,780	
		430			399				
		527			482				
		386			457				
		432			373				
		542			460				
№ 3	Количество частиц ≥10 мкм	45	44	11	40	40	1	0,894	
		48			40				
		39			40				
		48			39				
		36			40				
		45			40				

Примечание. $t_{\text{расч } i}$ — значение критерия Стьюдента, рассчитанное по экспериментальным данным для модельных взвесей № 1, 2, 3 соответственно; $t_{\text{табл}}$ — табличное значение критерия Стьюдента.

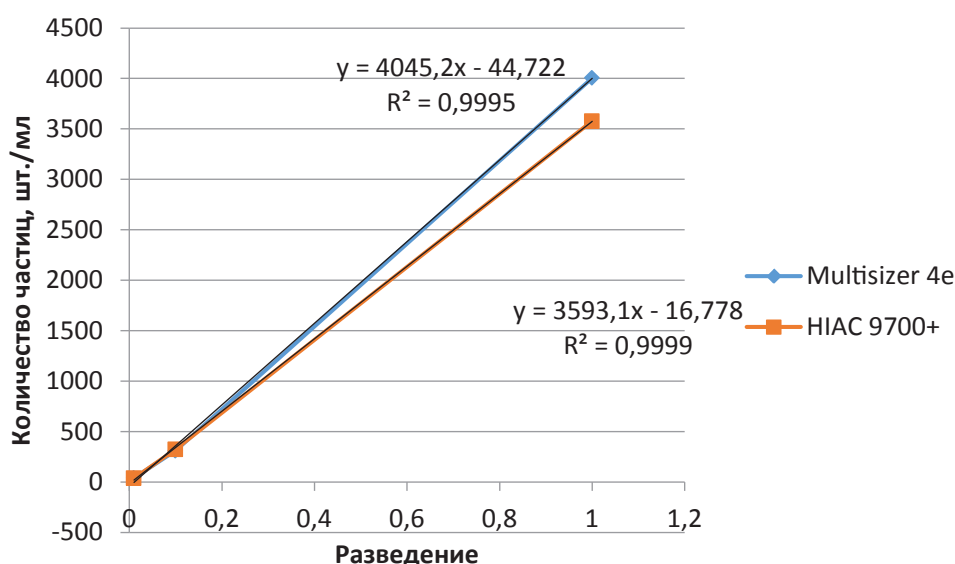


Рис. 1. Результаты определения количества частиц размером более 10 мкм в модельных взвешах в зависимости от разведения. Multisizer 4e — результаты, полученные по разработанной методике, HIAC 9700+ — результаты, полученные с помощью методики на основе счетно-фотометрического метода.

Таблица 2. Результаты подсчета количества частиц размером более 10 мкм с целью оценки однородности результатов и повторяемости методики

Мо- дельная смесь	№ об- разца	№ изме- рения	Количество частиц размером ≥10 мкм в единичном опыте, шт./мл							
			методика на основе метода Култера				методика на основе счётно-фотометрического метода			
			X	X_{cp} ($n = 3$)	SD ($CV, \%$) ($n = 3$)	$CV_{повтК}$ ($n = 3$)	X	X_{cp} ($n = 3$)	SD ($CV, \%$) ($n = 3$)	$CV_{повтСФ}$ ($n = 3$)
№ 1	1	1	4340	4438	87 (1,97)	11,9	3952	3935	17 (0,43)	13,2
		2	4465				3936			
		3	4508				3918			
	2	1	4211	3884	327 (8,42)	3765	3753	43 (1,16)		
		2	3885			3679				
		3	3557			3716				
	3	1	3605	3507	140 (4,00)	3030	3042	12,5 (0,41)		
		2	3557			3041				
		3	3347			3055				
	$G_{табл} = 0,93$		$G_K = 0,80$				$G_{СФ} = 0,81$			
№ 2	1	1	370	372	2,2 (0,59)	15,0	310	292	17,7 (6,05)	8,5
		2	374				275			
		3	373				292			
	2	1	339	347	9 (2,59)	338	334	3,6 (1,08)		
		2	346			330				
		3	357			334				
	3	1	279	276	5,5 (2,98)	340	345	6,1 (1,78)		
		2	280			341				
		3	270			352				
	$G_{табл} = 0,93$		$G_K = 0,70$				$G_{СФ} = 0,86$			
№ 3	1	1	37	38	1,8 (4,88)	10,7	34	34	0,5 (1,36)	7,9
		2	37				34			
		3	40				33			
	2	1	40	46	3,2 (7,59)	45	40	5,1 (12,89)		
		2	57			39				
		3	41			35				
	3	1	41	39	2,8 (7,18)	35	38	4,9 (13,6)		
		2	36			35				
		3	40			44				
	$G_{табл} = 0,93$		$G_K = 0,89$				$G_{СФ} = 0,51$			

Примечание. $G_{табл}$ — табличное значение критерия Кохрена ($f = 2$; $L = 3$); G_K , $G_{СФ}$ — значения критерия Кохрена, рассчитанные по экспериментальным данным для разработанной методики и методики на основе счетно-фотометрического метода; $CV_{повтК}$, $CV_{повтСФ}$ — значение коэффициента вариации, характеризующего повторяемость методики и методики на основе счетно-фотометрического метода, рассчитанного с использованием среднеарифметического значения по трем пробам (значения приведены в столбцах 5 и 9).

Из представленных в таблице 2 данных следует, что значения критерия Кохрена, рассчитанные по экспериментальным данным для методики (G_k) и методики, основанной на счетно-фотометрическом методе ($G_{\text{сф}}$), для всех вариантов модельных смесей не превышают табличного $G_{\text{табл}} = 0,93$. Следовательно, результаты определения количества частиц методиками, основанными на разных методах, являются однородными и все полученные результаты можно использовать для оценки повторяемости.

Относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации), которое характеризует повторяемость методики, составило от 10,7 до 15 %, что не превышает принятый критерий приемлемости (20 %) получаемых с использованием методики результатов и позволяет считать полученные результаты удовлетворительными.

Оценка промежуточной прецизионности методики. Промежуточную прецизионность оценивали по коэффициенту вари-

ации результатов, полученных в разные дни. Проводили по три группы измерений в трех повторностях в образцах модельных смесей, подготовленных, как представлено в разделе «Материалы и методы» (Приготовление модельных суспензий частиц в воде для инъекций). Результаты представлены в таблице 3.

Как следует из приведенных в таблице 3 данных, значения коэффициента вариации, характеризующие внутрилабораторную прецизионность методики, составили от 4 до 15 % и не превышают принятого нами критерия приемлемости результатов (20 %). Целесообразно продолжение исследований промежуточной прецизионности методики.

Значения характеристик методики определения невидимых механических включений на основе метода Култера и методики на основе счетно-фотометрического метода, полученные по результатам статистической обработки данных при $P \geq 0,95$, приведены в таблице 4.

Таблица 3. Результаты подсчета количества частиц размером более 10 мкм с целью оценки промежуточной прецизионности методики

Факторы промежуточной прецизионности		Методика на основе метода Култера			Методика на основе счетно-фотометрического метода		
модельная смесь	№ опыта	количество частиц, шт./мл		CV, %	количество частиц, шт./мл		CV, %
		X	$X_{\text{ср}} \pm SD$		X	$X_{\text{ср}} \pm SD$	
№ 1	1	4438,0	4005 ± 387	9,7	3935,1	3577 ± 472	13
		3884,0			3753,1		
		3692,0			3042,1		
	2	3833,0	3330 ± 452	14	3271,3	3108 ± 143	5
		3200,0			3057,0		
		2957,0			2998,0		
№ 2	1	371,9	332 ± 50	15	344,5	324 ± 28	9
		347,0			334,0		
		276,5			292,3		
	2	402,5	420 ± 15	4	412,5	431 ± 44	10
		430,2			399,7		
		426,7			482,0		
№ 3	1	45,6	40 ± 5	10	39,7	36 ± 3	9
		37,9			33,8		
		39,0			34,6		
	2	44,7	44 ± 5	11	39,7	40 ± 0,23	1
		48,3			39,7		
		38,6			40,1		

Таблица 4. Значения показателей точности методики определения невидимых механических включений в воде для инъекций при оценке количества частиц размером более 10 мкм

Характеристика	Оцениваемый показатель	Методика на основе метода Култера	Методика на основе счетно-фотометрического метода
Промежуточная прецизионность	Коэффициент вариации, %	10–14	1–13
Повторяемость	Коэффициент вариации, %	10,7–15,0	7,9–13,2
Аналитический диапазон	Диапазон измеряемых частиц, мкм	10–60	10–100

Результаты, полученные в ходе валидационных исследований методики, показывают принципиальную возможность применения метода Култера для оценки невидимых механических включений в воде для инъекций.

К недостаткам методики относятся необходимость проведения дополнительной пробоподготовки, длительное время анализа, более высокий коэффициент вариации результатов измерений в сравнении с методикой на основе счетно-фотометрического метода.

Более высокий коэффициент вариации результатов при использовании методики на основе метода Култера можно объяснить более длительным временем анализа, за которое частицы успевают осесть на дно в результате гравитационного воздействия. При анализе трех аналитических проб по 1 мл при небольшом объеме образца (20 мл) достигается приемлемая точность.

Выводы

Разработана методика определения невидимых механических включений в воде для инъекций на основе метода Култера. Общий объем исследуемого образца 20 мл. Пробоподготовка: к 19 мл воды для инъекций добавляют 1 мл 9 % раствора натрия хлорида. Объем аналитической пробы равен 1 мл. Количество аналитических проб равно трем. Расчет среднего результата проводят на основе трех измерений с пересчетом на 1 мл исходного образца.

Результаты валидации методики, основанной на методе Култера, проведенной на модельных смесях, подтверждает возможность ее использования для определения невидимых механических включений в воде для инъекций. Значения показателей точности методики (промежуточной прецизионности, повторяемости) не превышают предел допустимой погрешности прибора для оценки счетной концентрации. Результаты, полученные в ходе валидационных исследований методики, показывают принципиальную возможность применения метода Култера для оценки невидимых механических включений в воде для инъекций.

Информация об отсутствии конфликта интересов.

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

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

Литература / References

1. Пятигорская НВ, Самылина ИА, Сапожникова ЭА, Митькина ЛИ, Лавренчук РА, Багирова ВЛ. Вода для инъекций. *Фармация* 2010;(5):3–7. [Pyatigorskaya NV, Samylina IA, Sapozhnikova EA, Mitkina LI, Lavrenchuk RA, Bagirova VL. Water for Injection. *Pharmacy* 2010;(5):3–7 (In Russ.)]
2. Фармакопейная статья 2.2.0019.15 Вода для инъекций. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3, М.; 2015. [Monograph 2.2.0019.15 Water for Injections. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 3. Moscow; 2015 (In Russ.)] Available from: <http://pharmacopoeia.ru/fs-2-2-0019-15-voda-dlya-inektsij/>
3. 2.9.19. Particulate Contamination: Sub-Visible Particles. *European Pharmacopoeia*. 8th ed. European Directorate for the

Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). 2014. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep800>

4. Общая фармакопейная статья 1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.; 2015. [General Monograph 1.4.2.0006.15 Invisible Mechanical Inclusions in Dosage Forms for Parenteral Use. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (In Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/femb>
5. Новик ЕС, Гунар ОВ. Метод электрочувствительных зон для определения невидимых механических включений в лекарственных препаратах для парентерального применения. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2012;(1):58–61. [Novik ES, Gounar OV. Electrical Sensing Zone Method for Determination of Invisible Particulate Matters in Parenteral Medicines. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medical Products* 2012;(1):58–61 (In Russ.)]
6. Воропаев АА, Фадейкина ОВ, Ермолаева ТН, Давыдов ДС, Кудашева ЭЮ. Оценка возможности применения метода Култера (электрочувствительных зон) для определения невидимых механических включений в лекарственных препаратах крови человека отечественного производства. *Антибиотики и химиотерапия* 2017;62(7–8):36–41 [Voropaev AA, Fadeikina OV, Ermolaeva TN, Davydov DS, Kudashева EYu. The Assessment of the Possibility to Use the Coulter's Method (Electrosensitive Zones) for Identification of Invisible Particulate Matter in Human Blood-Derived Products Produced in Russia. *Antibiotics and Chemotherapy* 2017;62(7–8):36–41 (In Russ.)]
7. Доля ВГ, Товмасын ЕК, Гризодуб АИ, Георгиевский ВП. Контроль невидимых механических включений в лекарственных средствах для парентерального применения: изменения в статье Государственной Фармакопеи Украины. *Фармаком* 1-2005;39–46 [Dolya VG, Tovmasyan EK, Gryzodub AI, Georgiyevskiy VP. The Control of Sub-Visible Particulate Contamination in Parenteral Preparations: Changes in the General Monograph of the State Pharmacopoeia of Ukraine. *Pharmacom* 1-2005:39–46 (In Russ.)]
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1998. [Glantz S. Biomedical Statistics. Moscow: Praktika; 1998 (In Russ.)]
9. Coulter Principle Short Course. Available from: <http://molbiol.ru/forums/index.php?act=Attach&type=post&id=238647>
10. Научное обоснование и разработка методологии экспертизы качества, эффективности и безопасности препаратов крови. Отчет о НИР (заключительный). ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; рук.: Бондарев ВП, Борисевич ИВ; отв. исполн.: Иванов ВБ, Кудашева ЭЮ и др. М.; 2017. 1260 с. № ГР 115111740010. Деп. в ЦИТИС 18.01.2018, № ИКРБС АААА-Б18-218011890074-9. [Scientific Substantiation and Development of a Methodology for the Examination of the Quality, Efficacy and Safety of Blood Products. Research Report (Final). FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia; Advisors Bondarev VP, Borisevich IV; Prepared by: Ivanov VB, Kudashева EYu. Moscow; 2017. 1260 p. No SR 115111740010. Deposited in CITIS on 18.01.2018, No IKRBS АААА-Б18-218011890074-9 (In Russ.)]
11. МН-242-1382-2013 «Анализаторы размеров частиц Multisizer. Методика поверки», утв. ГЦИ СИ ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева» 30 мая 2013 г.

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

Воропаев Андрей Андреевич. Эксперт 2 категории лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Фадеекина Ольга Васильевна. Главный технолог Испытательного Центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Ермолаева Татьяна Николаевна. Эксперт 1 категории лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Давыдов Дмитрий Сергеевич. Начальник лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

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

Шведов Дмитрий Владимирович. Заместитель начальника Испытательного Центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук

Поступила 14.03.2018

Принята к публикации 26.04.2018

Authors

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

Andrey A. Voropaev. 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Bacteriophages and Normal Flora Preparations with a Collection of Microorganisms of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality

Olga V. Fadeikina. Chief Technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Tatyana N. Ermolaeva. 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Bacteriophages and Normal Flora Preparations with a Collection of Microorganisms of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality

Dmitriy S. Davydov. Head of the Laboratory of Bacteriophages and Normal Flora Preparations with a Collection of Microorganisms of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Rauza A. Volkova. Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Testing Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Biological Sciences

Dmitriy V. Shvedov. Deputy Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences

Received 14 March 2018

Accepted 26 April 2018

Трипсин. Свойства и применение в производстве биологических лекарственных препаратов

С. М. Суханова*, Е. М. Петручук, А. А. Генералов

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

Производство биологических лекарственных препаратов, применяемых в профилактических, диагностических и лечебных целях, включает в себя использование биологических процессов и материалов, характеризующихся вариабельностью. Для обеспечения качества готового биопрепарата необходимо определять источник, происхождение и пригодность исходного сырья и материалов для последующего их использования, включая реагенты, питательные среды, буферные растворы, сыворотки, ферменты. В работе обобщены данные литературы о строении, свойствах и механизме действия трипсина, фермента животного происхождения, широко используемого при производстве биологических лекарственных препаратов. Представлены материалы по источникам, способам получения, требованиям к свойствам препаратов трипсина различной степени очистки, предназначенных для медицинского и ветеринарного применения, а также для использования в качестве реагента при производстве вакцин, лекарственных средств передовой терапии и генно-инженерных препаратов. Показана роль трипсина в системе пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта животных и человека, в диссоциации клеток в культуре при использовании его в процессе клеточного пассирования, в механизме протеолитической активации и инактивации широкого спектра вирусов, а также изучении первичной структуры белков.

Ключевые слова: трипсин; биологические лекарственные препараты; культура клеток; активация вирусов; производство вакцин

Для цитирования: Суханова СМ, Петручук ЕМ, Генералов АА. Трипсин. Свойства и применение в производстве биологических лекарственных препаратов. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2018;18(2):106–113. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-106-113>

* **Контактное лицо:** Суханова Светлана Михайловна; SuhanovaSM@expmed.ru

Trypsin. Properties and Use in the Production of Biological Medicinal Products

S. M. Sukhanova*, E. M. Petruchuk, A. A. Generalov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

The production of biological medicinal products used for prophylactic, diagnostic and therapeutic purposes includes the use of inherently variable biological processes and materials. In order to ensure the quality of the finished biological product it is necessary to determine the source, nature and fitness for use of the starting materials, including reagents, culture media, buffer solutions, sera, and enzymes. The article summarises literature data on the structure, properties and mode of action of the animal-derived reagent trypsin — proteolytic enzyme widely used in the production of biological medicinal products. The article dwells upon the sources of trypsin, methods of its production, requirements for trypsin products of different purity grades intended for human and veterinary use as well as for use as reagents in the production of vaccines, advanced therapy medicinal products and genetically engineered products. The article describes the role that trypsin plays in the human and animal intestinal digestive enzyme systems, in dissociation of cells in cultures in the process of cell passaging, in the mechanism of proteolytic activation and inactivation of a wide range of viruses, and in the examination of proteins primary structure.

Key words: trypsin; biological medicinal products; cell culture; virus activation; vaccine production

For citation: Sukhanova SM, Petruchuk EM, Generalov AA. Trypsin. Properties and Use in the Production of Biological Medicinal Products. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2018;18(2):106–113. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-106-113>

* **Contact person:** Svetlana M. Sukhanova; SuhanovaSM@expmed.ru

Биологические лекарственные препараты (БЛП) — средства биологического происхождения, применяемые в профилактических, диагностических и лечебных целях. К биологическим лекарственным препаратам относятся иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) (вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки, иммуноглобулины и аллергены), лекарственные препараты, полученные из крови, плазмы крови человека и животных, биотехнологические лекарственные препараты, генотерапевтические лекарственные препараты, применяемые для профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней [1]. Производство биопрепаратов намного сложнее, чем других лекарственных средств, поскольку включает в себя использование биологических процессов и материалов, таких как культивирование клеток или экстрагирование материала из живых организмов. Указанные биологические процессы могут проявлять свойственную им изменчивость, поэтому принципы управления рисками для качества особенно важны для данного класса материалов и должны соблюдаться при разработке методов контроля на всех стадиях производства. Следует четко определять источник, происхождение и пригодность исходного сырья и материалов для последующего их использования, включая реагенты, питательные среды, буферы, сыворотки, ферменты. Одним из широко используемых в производстве БЛП реагентов является фермент трипсин — реагент животного происхождения, требующий тщательного анализа и проверки [2, 3].

Целью настоящей работы является анализ данных литературы об источниках получения, свойствах и механизме действия трипсина, а также требований к его свойствам при использовании в производстве биологических лекарственных препаратов.

Впервые трипсин был открыт Ж. Корвизаром в 1857 г. и спустя 10 лет в 1867 г. описан и назван В. Кюне «трипсином» (от греч. *thrypsis* — разжижение) [4].

Трипсин — эндогенный протеолитический фермент класса гидролаз, синтезируемый экзокринными клетками поджелудочной железы млекопитающих в виде неактивного предшественника — профермента трипсиногена, который в двенадцатиперстной кишке под действием энтеропептидазы, самого трипсина и ионов Ca^{2+} превращается в трипсин. Схема меха-

низма активации на примере трипсиногена быка представлена на рисунке 1 [5].

Трипсин относится к группе сериновых протеаз и характеризуется узкой субстратной специфичностью, обусловленной присутствием в субстратсвязывающем участке активного центра остатка аспарагиновой кислоты. Он избирательно гидролизует связи, образованные карбоксильными ($-\text{COOH}$) группами основных аминокислот аргинина и лизина (рис. 2). Трипсин сохраняет термоустойчивость и стабильность в кислой, слабощелочной среде и после кипячения в 0,01 М соляной кислоте, в щелочной среде необратимо денатурируется.

Трипсин обнаружен у всех позвоночных животных и человека. Свиной трипсин содержит четыре остатка гистидина, трипсин быка, овцы, человека и индюка — 3, трипсин человека и индюка — 8 остатков полицистина, а быка, свиньи и овцы — по 12. Фермент, аналогичный трипсину, выделенный у беспозвоночных, растений и микроорганизмов, имеет сходный аминокислотный состав [6].

Впервые в 1931 г. Д.Х. Нортропом и его коллегами трипсин был получен в кристаллическом виде из неочищенных препаратов пепсина крупного рогатого скота (КРС), а позднее из поджелудочной железы свиньи, овцы, индюка [7].

Трипсин представляет собой бесцветное кристаллическое вещество с температурой плавления около 150 °С. Молекула трипсина 23–25 кДа состоит примерно из 223 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь. Оптимум каталитической активности трипсина лежит в диапазоне значений pH от 7,5 до 8,0.

Роль трипсина в системе пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта животных и человека заключается в катализе расщепления пептидных связей белков и пептидов, поступающих с пищей, активации всех образуемых в поджелудочной железе проферментов, а также гидролизе сложных эфиров амидов гидрофобных и некоторых карбоновых кислот. При попадании в кровяное русло и при недостаточности соответствующих ингибиторов трипсин может активизировать фактор свертывания крови XII (фактор Хагемана), пламиноген, прекалликреин и «запускать» таким образом каскад реакций свертывающей, фибринолитической и калликреин-кининовой систем [5].

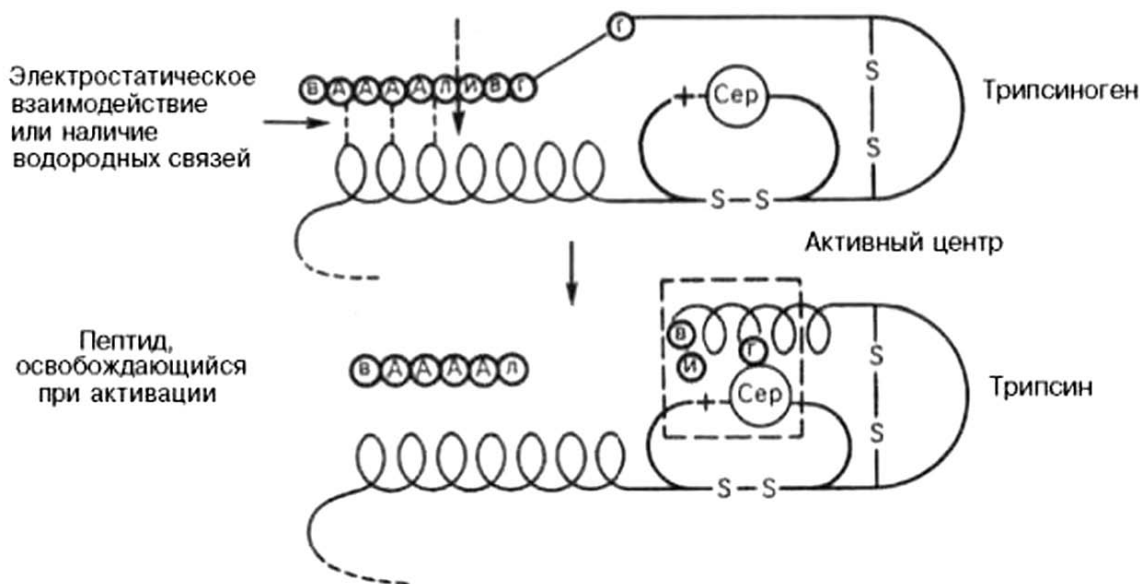


Рис. 1. Механизм активации трипсиногена быка (схема) [5].

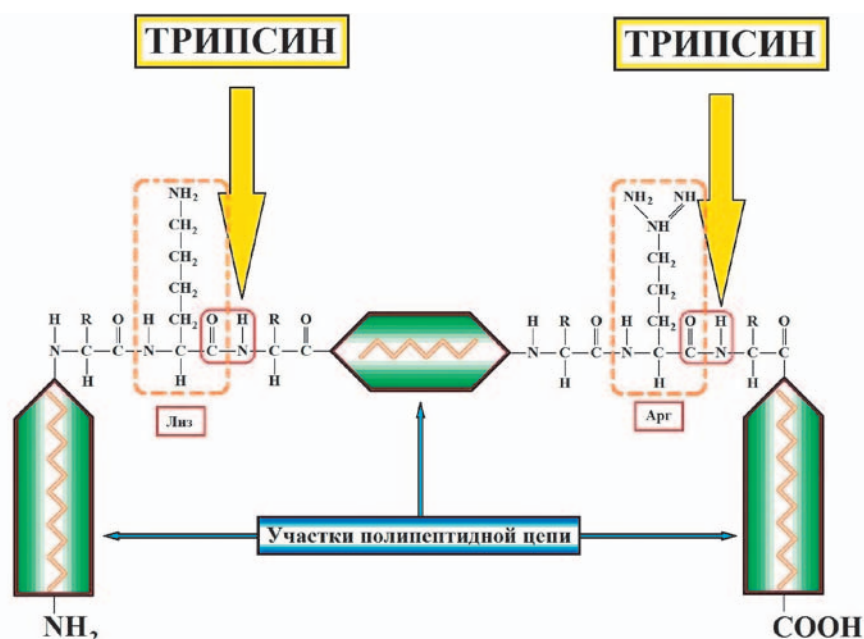


Рис. 2. Расщепление белка трипсином. Гидролиз связей, образованных карбоксильными группами аргинина и лизина.

В настоящее время выпускаются коммерческие препараты трипсина, предназначенные для медицинского и ветеринарного применения, а также для использования в качестве реагента при производстве вакцин, лекарственных средств передовой терапии и генно-инженерных препаратов.

В медицинской практике применяют трипсин кристаллический (для местного и парентерального применения) и трипсин аморфный (только для местного применения), который, выступая в роли биоантисептика, оказывает выраженное противовоспалительное, противоотечное (при внутривенном и внутримышечном введении), регенерирующее и избирательное некротическое действие при воспалительных заболеваниях дыхательных путей, при тромбофлебите, воспалительно-дистрофических формах пародонтоза, при лечении ожогов. Трипсин обладает свойствами расщепления фибриновых образований, омертвевших участков тканей, вязких экссудатов и секретов. Для лечения гнойных ран может быть использован трипсин кристаллический, иммобилизованный на диальдегидцеллюлозе или на активированном трикотажном полиамидном полотне. В офтальмологии трипсин применяют в виде глазных капель и ванночек при кровоизлияниях в камеру глаза, отеках окологлазных тканей, непроходимости слезоотводящих путей, удалении катаракт. При патологическом снижении экзокринной функции поджелудочной железы в составе других ферментных препаратов трипсин используют для заместительной терапии у людей и животных [8, 9].

Трипсин широко применяется в медицине, пищевой и легкой промышленности [10]. Основные области применения препаратов трипсина представлены на рисунке 3.

Внедрение метода клеточных культур в системе *in vitro* в конце 50-х годов прошлого столетия нашло широкое применение в производстве диагностических, лечебных и профилактических лекарственных средств. Для производства и контроля БЛП в качестве субстратов в настоящее время широко применяют первичные и перевиваемые (диплоидные и гетероплоидные) клеточные линии [11]. Большинство нетрансформированных клеток млекопитающих могут расти только прикрепленными к субстрату-подложке. Клетки прикрепляются и образуют монослой с помощью поверхностных гликопротеидов клеточной

мембраны — фибронектина и ламинина, играющих ведущую роль в клеточной адгезии. Фибронектин обнаруживается на поверхности клеток и при остановке клеточной пролиферации. Удаление фибронектина 0,01 % раствором трипсина приводит к откреплению клеток от субстрата и обеспечивает возможность их субкультивирования [12].

Для диспергирования и дезагрегации клеток применяют неочищенные препараты трипсина или химопсина, коллагеназу, эластазу, проназу, диспазу, ДНКазу и гиалуронидазу. Эти препараты можно использовать самостоятельно или в различных комбинациях, например, эластазу с ДНКазой, коллагеназу с диспазой или с гиалуронидазой. Для получения и пассирования первичных, перевиваемых, стволовых клеток используются и другие ферменты неживотного происхождения, такие как TrypZean® (Sigma-Aldrich) — рекомбинантный кукурузный трипсин, TrypLE (Invitrogen) — рекомбинантная грибная трипсин-подобная протеаза и смеси ферментов Accutase™ и Accutax™ (Innovative Cell Technologies) [13]. Учитывая, что альтернативные реагенты нуждаются в тщательном изучении и оценке пригодности, в настоящее время для культивирования клеток чаще используется трипсин животного происхождения.

В качестве исходного сырья для получения препаратов трипсина используют поджелудочные железы КРС, свиней и птиц. Как правило, проводят экстракцию пулов замороженных желез с различными дополнительными стадиями очистки, такими как осаждение и адсорбция с последующей сушкой различными методами [14].

Трипсин высокой чистоты получают хроматографическими методами и используют для специфического расщепления белков и анализа их первичной структуры, вызывая селективный гидролиз связей после остатков положительно заряженных аминокислот лизина и аргинина [15]. Препараты свиного трипсина применяют в качестве катализаторов при производстве человеческого инсулина полусинтетическим способом в процессе ферментного превращения проинсулина с использованием транспептидазной техники [16].

Препараты трипсина, предназначенные для культур клеток, несмотря на жесткие условия обработки, при выделении могут содержать примеси из исходного сырья, например,

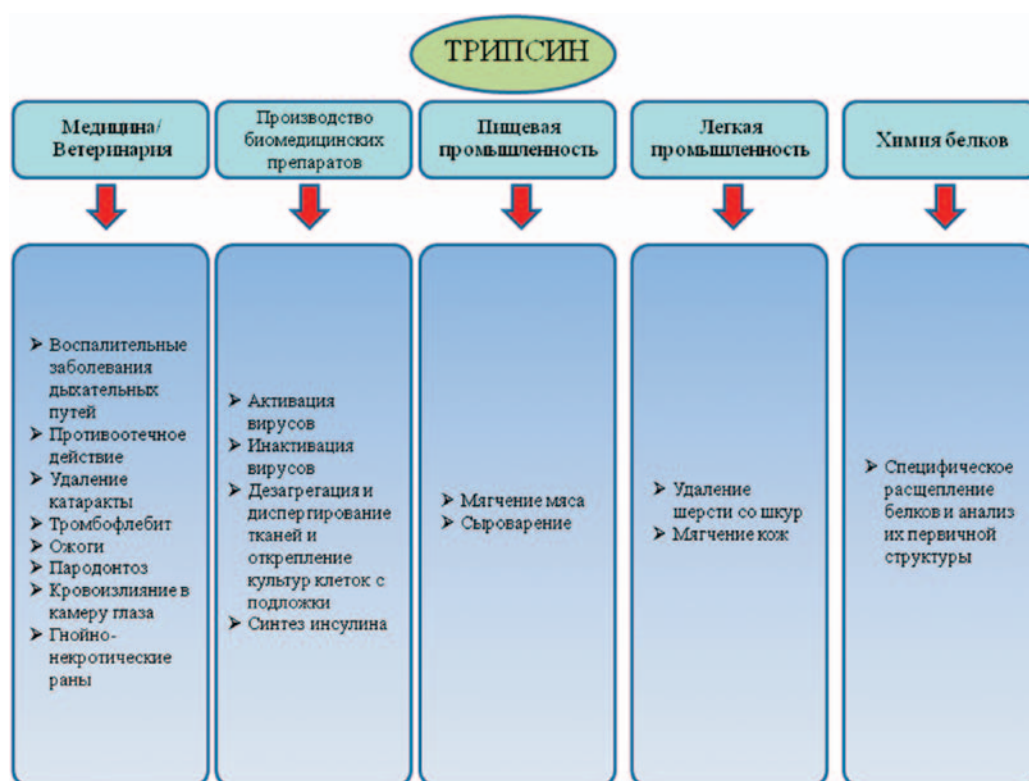


Рис. 3. Применение препаратов трипсина.

химотрипсин, проназу. Содержание примесей в отдельных препаратах бычьего трипсина может достигать 40–50 %, свиного трипсина — около 30 %. Вместе с тем препараты грубой очистки нередко более эффективны. Так, например, обработка трипсином с примесями проназы вызывает более полную дезагрегацию клеток [14]. В течение многих лет для дезагрегации тканей и отделения клеток монослоя от субстрата использовали ацетоновый порошок из надпочечников свиньи или КРС. Эти препараты содержали трипсин, химотрипсин и эластазу. Для получения первично-трипсицизированных клеточных культур применяют обработку различных тканей 0,25 % раствором неочищенного или 0,01–0,05 % раствором очищенного трипсина. Метод холодной трипсицизации обычно дает более высокий выход жизнеспособных клеток и повышает их выживаемость после 24 ч культивирования. Вместе с тем жидкая форма трипсина (0,2–0,25 % раствор) нестабильна при положительных значениях температуры (при 18–20 °C срок хранения не более 10 суток; при 4–6 °C — не более 2 месяцев; в замороженном состоянии — 6 месяцев и один год при температуре минус 20 °C) при pH 7,0–11,0 вследствие автолиза фермента, приводящего к инаktivации или снижению его каталитических свойств и загрязнению неактивными продуктами [17–19].

Как правило, в качестве дезагрегирующего агента используют препараты трипсина в виде нестерильного лиофилизированного порошка, выпускаемые такими фирмами как Difco, Serva, Ferak, Fluka, Sigma-Aldrich, из которого готовят раствор разведением его в физиологическом растворе с последующей фильтрацией через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм. Технология изготовления сухого трипсина отечественного производства освоена в ОАО «Синтез» (г. Курган), на Алма-Атинском и Омском биокOMBинатах [6].

Препараты трипсина могут быть использованы в производстве вирусных вакцин, при диагностике *in vitro* вирусных

инфекций и в вирусологических исследованиях. Важным свойством трипсина является стимуляция репродукции некоторых вирусов, которые не вызывают развития специфических цитопатических изменений и феноменов гемагглютинации и гемадсорбции при диагностике вирусных инфекций в системе *in vitro* в связи с присутствием в ростовых и поддерживающих средах сывороточных ингибиторов. Способы адаптации вирусов к клеточным культурам под действием трипсина известны и применяются достаточно давно, как в научных исследованиях, так и при производстве профилактических препаратов. В присутствии трипсина повышается активность роста и размножения ротавирусов, ортомиксовирусов, парамиксовирусов, парвовирусов, коронавируса и астровирусов (рис. 4). Впервые о влиянии трипсина на выделение бычьего ротавируса из клинического материала сообщили L.A. Babiuk и соавт. в 1977 г. Размножение вируса в культуре клеток почек обезьян (BSC-1) характеризовалось цитопатическими изменениями при культивировании клинического материала в среде Игла при добавлении глутамина, аминокислот, бикарбоната натрия, 10 % инаktivированной телячьей сыворотки и 10 мкг трипсина фирмы Difco [20]. Ротавирусы могут служить классическим примером протеолитической активации, выделение и культивирование которых стало возможным благодаря применению трипсина. При разработке вакцины против ротавирусной инфекции для детей были предприняты попытки размножения ротавируса 2-го типа в первичной культуре почек африканских зеленых мартышек (AGMK). В культуре клеток цитопатические изменения наблюдались только после введения инфекционного вируса в смеси с трипсином, полученного после 11-кратного пассирования в организме гнотобионтов и инкубирования при 37 °C в течение 1 ч [21, 22].

H. Suzuki и соавт. [23] при сравнении скорости проникновения ротавируса человека в культуру клеток почки эмбриона макаки резус (MA-104), активированного и неактивиро-

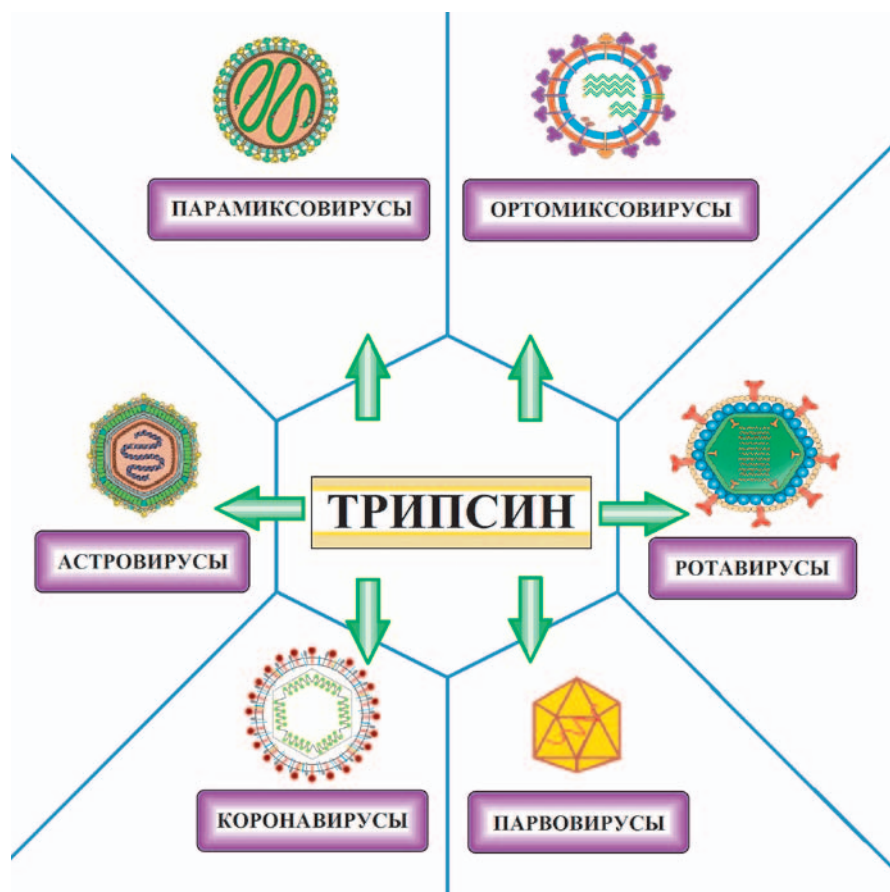


Рис. 4. Примеры семейств вирусов, активируемых трипсином.

ванного трипсином показали, что однокапсидные частицы активированного вируса обнаруживались в цитоплазме уже через 5 мин после заражения, а неактивированные попадали в клетку путем эндоцитоза через 20 мин. После обработки трипсином ротавирус свиней был адаптирован к первичным клеткам почки эмбриона свиньи и к перевиваемой культуре почки поросенка РК-15, применяемой для диагностики вируса классической чумы свиней. Аналогичные результаты были получены при изучении размножения ротавируса обезьян SA-11 в первичных культурах почек африканских зеленых мартышек AGMK, СК, Vero и 455, используемых для разработки методов лабораторной диагностики гастроэнтеритов человека и животных. При внесении 100 мкг/мл трипсина в поддерживающую среду цитопатические изменения в клеточных культурах появлялись уже через 24 ч, в то время как его отсутствие не изменяло инфекционную активность вирусов и увеличивало время их культивирования. Полагают, что при добавлении трипсина происходит диспергирование вируса, в результате чего повышается проницаемость клеточных мембран, вызывая инактивацию интерферона. В составе вириона происходит протеолитическое расщепление крупного полипептида VP3 на полипептиды VP5 и VP8 и повышение инфекционности вируса. Обработка ротавируса КРС трипсином в концентрации 1 мкг/мл приводит к увеличению титра вируса почти в 4 раза. В клетках почек африканской зеленой мартышки BSC-1 и CV-1 при добавлении в агаровую среду 4–10 мкг/мл трипсина и 4 % нормальной сыворотки кур ротавирус КРС вызывал образование бляшек (обесцвеченные участки монослоя). При отсутствии трипсина образование бляшек не наблюдалось [24].

Феномен протеолитической активации характерен для орто- и парамиксовирусов, однако только расщепление трипсином и трипсиноподобными ферментами приводит к образованию высокоинфекционного вируса гриппа А. Обработка вируса гриппа А трипсином до заражения клеток и добавление трипсина в культуральную среду в процессе репликации повышают его инфекционность. Одним из факторов, обуславливающих инфекционность вируса гриппа, является расщепление эндогенными клеточными протеазами гемагглютинина (ГА) на молекулы меньшего размера ГА1 и ГА2. Из более пятисот протеаз, которые участвуют в обмене веществ в организме человека и могут вызывать расщепление ГА-предшественника на фрагменты ГА1 и ГА2, только расщепление трипсином и трипсиноподобными ферментами вызывает образование высокоинфекционного вируса гриппа в некоторых типах клеток, не имеющих подобных протеаз. В исследованиях по совершенствованию инактивированных вакцин против вирусов гриппа птиц было показано действие трипсина на повышение репродукции подтипов H3, H4, H5, H7 в системах *in vitro* и *in vivo*. Эти штаммы активно размножались в клетках почек собаки MDCK и Vero. Максимальный выход вируса гриппа птиц этих подтипов зависит от концентрации трипсина и дозы заражения, которые могут быть различными для отдельных штаммов [25]. При одновременном внесении инфекционного материала с трипсином существенно повышаются как инфекционные титры, так и уровни гемагглютинирующей активности вируса [26, 27].

Повышение инфекционной активности после обработки трипсином установлено для вируса Сендай в перевиваемых линиях клеток мукоэпидермальной карциномы легкого человека (NCL-H 292) в результате расщепления гликопротеина F

(65 кДа) на субъединицы F1 (51 кДа) и F2 (15 кДа) [28]. Гемолизная, геагглютинирующая и нейраминидазная активность вируса Ньюкасла птиц усиливается вследствие протеолиза трипсином предшественников гликопротеинов HN₀ и F₀ [29]. Обработка парвовируса свиней трипсином в конечной концентрации 0,05 % в течение 1 ч при 37 °С приводит к увеличению инфекционности вируса в результате расщепления вирусных агрегатов [30]. Трипсин стимулирует репликацию коронавируса эпидемической диареи свиней (ЭДС), вызывающего острые заболевания, поражающие на фермах до 100 % животных, из которых 50 % погибает [31].

Астровирусы вызывают у людей острый гастроэнтерит, у птиц — энтериты, нефриты и гепатиты и являются вторым-третьим по значимости этиологическим объектом, приводящим к развитию острых кишечных инфекций, преимущественно у детей младшего возраста в основном первого года жизни и у пожилых людей с ослабленным иммунитетом. Они с трудом размножаются в первичных культурах клеток гомологичных видов животных, не вызывая видимых цитопатических изменений. Размножение астровирусов было получено в культуре клеток карциномы толстого кишечника человека Сасо-2, а также в первичной культуре клеток почки эмбриона человека и обезьян только в присутствии 10 мкг/мл трипсина [32].

Трипсин, благодаря собственной ферментативной активности, не только активирует, но и инактивирует многие вирусы, например, ретровирусы. Обработка 0,3 % раствором трипсина, вызывающая инактивацию вирусов катаральной лихорадки овец и инфекционного ринотрахеита КРС, может быть использована при производстве БЛП [33].

В соответствии с требованиями ОФС 1.7.2.0011.15 при производстве ИЛП путем культивирования клеточных культур должен использоваться трипсин, разрешенный в производстве иммунобиологических препаратов. Получение ферментного препарата трипсина для масштабного культивирования клеток должно проводиться в стерильных условиях и требует изучения его физико-химических и диспергирующих свойств, разработки требований к исходному сырью, способам очистки, позволяющих получить квалификацию «для культур клеток» в связи с возможной контаминацией посторонними агентами, представляющими потенциальную опасность для реципиентов препаратов [34]. Исходное сырье должно быть получено из хозяйств, в которых не регистрируются опасные для человека возбудители и прионные заболевания. В соответствии с нормативными правовыми актами в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза реагенты, используемые при производстве профилактических препаратов в медицине и ветеринарии, должны быть свободны от посторонних агентов [35].

В настоящее время на предприятиях Российской Федерации в соответствии с утвержденной нормативно-технической документацией выпускаются препараты трипсина, предназначенные для дезагрегации эмбриональных и постнатальных тканей человека, животных и птиц в процессе получения первичных и перевиваемых культур клеток в виде сухого порошка или раствора. Качество препаратов трипсина оценивается по показателям: pH, буферная емкость, стерильность, токсичность, специфическая активность. Специфическая активность оценивается по способности дезагрегировать и диспергировать ткани. При дезагрегации ткани выход из 1 г должен составлять не менее 30 млн жизнеспособных клеток, при полном отделении монослойных клеток от субстрата в течение 2–3 мин. Срок годности сухого препарата при температуре от 2 до 8 °С составляет 2 года [36]. Препараты жидкого трипсина выпускаются

в виде смеси трипсина (0,25 %) и неорганических солей, растворенных в воде очищенной или для инъекций, стерилизованной методом мембранной фильтрации. Срок годности раствора при температуре от 2 до 8 °С составляет 6 или 12 месяцев при температуре минус 10–20 °С [37–39].

Российские требования к трипсину, используемому в качестве реагента для культур клеток или для активации вирусов, согласуются с требованиями ЕФ и рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Европейского медицинского агентства (ЕМА) в соответствии с которыми трипсин должен быть стерильным, свободным от микоплазм и посторонних агентов [14, 34, 40].

Заключение

Проведенный анализ данных литературы показал, что препараты трипсина, благодаря своим протеолитическим свойствам, нашли широкое применение в различных областях науки и промышленности. В производстве биологических лекарственных препаратов трипсин используется в качестве реагента в процессе клеточного пассирования для диссоциации клеток в культуре и получения первичных культур из тканей, для протеолитической активации и инактивации вирусов, а также для синтеза других ферментов. Учитывая, что альтернативные реагенты нуждаются в тщательном изучении и оценке пригодности, в настоящее время для производства трипсина чаще используется сырье животного происхождения. Для обеспечения качества БЛП препараты трипсина из животного и растительного сырья должны отвечать требованиям безопасности национальных и международных регуляторных органов.

Информация об отсутствии конфликта интересов.

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

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

Литература / References

1. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». [Federal Law of the Russian Federation of April, 12, 2010, No. 61-FZ «On Circulation of Medicines»] (in Russ.) Available from: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350
2. Быковский СН, Василенко ИА, Максимова СВ, ред. Комментарий к Руководству Европейского Союза по надлежащей практике производства лекарственных средств для человека и применения в ветеринарии. М.: Перо; 2014. [Bykovsky SN, Vasilenko IA, Maksimova SV, eds. Comment on the European Union Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Moscow: Pero; 2014 (in Russ.)]
3. Дьяконов ЛП, ред. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии). М.: Спутник+; 2009. [Dyakonov LP, ed. Animal Cell in Culture (Methods and Applications in Biotechnology). Moscow: Sputnik+; 2009 (in Russ.)]
4. Жан-Никола Корвизар. В кн.: БРЭС. М.: Большая Российская энциклопедия; 2003. С. 736. [Jean-Nicolas Corvizar. In: BRES. Moscow: Bolshaya Rossijskaya ehnciklopediya; 2003. P. 736 (in Russ.)]
5. Березов ТТ, Коровкин БФ. Биологическая химия. Учебник. 3-изд. М.: Медицина; 2008. [Berezov TT, Korovkin BF. Biological Chemistry. Textbook. 3rd ed. Moscow: Meditsina; 2008 (in Russ.)]
6. Попова ВМ. Усовершенствование технологии изготовления и изучения свойств трипсина сухого для вирусологических целей: дис. ... канд. биол. наук. М.; 1999. [Popova VM. Improvement of the Technology of Manufacturing and

- Studying the Properties of Dry Trypsin for Virological Purposes. *Cand. Biol. Sci. [dissertation]*. Moscow; 1999 (in Russ.)]
7. Джон Хауард Нортроп. В кн.: БРЭС. М.: Большая Российская энциклопедия; 2003. С. 1065. [John Howard Northrop. In: BRES. Moscow: Bolshaya Rossijskaya ehnciklopediya; 2003. P. 1065 (in Russ.)]
 8. Трипсин (Trypsin). Регистр лекарственных средств России. [Trypsin. Registr lekarstvennykh sredstv Rossii (in Russ.)] Available from: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2130.htm
 9. Экзокринная недостаточность поджелудочной железы у собак и кошек. [Exocrine Pancreatic Insufficiency in Dogs and Cats (in Russ.)] Available from: http://www.bkvet.ru/pancreatic_insufficiency_dog
 10. Чешкова АВ. Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха. Учеб. пособие для вузов. Иваново: ГОУВПО ИГХТУ; 2007. [Cheshkova AV. Enzymes and Technologies for Textiles, Detergents, Leather, Fur. Tutorial. Ivanovo: GOUVPO IGHTU; 2007 (in Russ.)]
 11. Шалунова НВ, Меркулов ВА, Комратов АВ, Петручук ЕМ, Семенова ИС, Волгин АР, Трусов ГА. Требования к клеточным культурам, используемым для производства и контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013;(1):28–32. [Shalunova NV, Merkulov VA, Comratov AV, Petruchuk EM, Semenova IS, Volgin AR, Trousov GA. Requirements for Cell Cultures, Used for Manufacture and Quality Control of Immunobiological Medicines. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2013;(1):28–32 (in Russ.)]
 12. Фрешни Р. Культура животных клеток. М.: Бином, лаборатория знаний; 2014. С. 158–60. [Freshni R. Culture of Animal Cells. Moscow: Binom, knowledge laboratory; 2014. P. 158–60 (in Russ.)]
 13. Дергилев КВ, Рубина КА, Сысоева ВЮ, Акчурин РС, Парфенова ЕВ, Ткачук ВА. Способ получения резидентных стволовых клеток сердца млекопитающего из образцов миокарда. Патент Российской Федерации, № 2505602; 2014. [Dergilev KV, Rubina KA, Sysoeva VYu, Akchurin RS, Parfyonova EV, Tkachuk VA. Method of Obtaining Resident Mammalian Heart Stem Cells From Myocardial Samples. Patent RF, N 2505602; 2014 (in Russ.)]
 14. Guideline on the Use of Porcine Trypsin Used in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products (EMA/CHMP/BWP/814397/2011). European Medicines Agency; 2014.
 15. Овчинников ЮА. Биоорганическая химия. М.: Просвещение; 1987. [Ovchinnikov UA. Bioorganic Chemistry. Moscow: Prosveschenije; 1987 (in Russ.)]
 16. Лазарев АП, Пояркова СА, Луцив ВР, Гавриш ОГ, Мельник ВН, Рыбачук ВН. Способ получения полусинтетического инсулина человека. Патент Российской Федерации, № 2252225; 2005. [Lazarev AP, Poyarkova SA, Lutsiv VR, Gavrish OG, Melnik VN, Rybachuk VN. A Method for Producing Semisynthetic Human Insulin. Patent of the Russian Federation, No. 2252225; 2005 (in Russ.)]
 17. Веремеенко КН. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. Киев: Здоров'я; 1971. [Veremeenko KN. Enzymes of Proteolysis and Their Inhibitors in Medical Practice. Kiev: Zdorov'ya; 1971 (in Russ.)]
 18. Луговой ВИ. Первичные механизмы криоповреждений ферментов. В кн. 2 Всесоюзная конференция по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии. Тезисы докладов. Харьков; 1984. С. 49. [Lugovoi VI. Primary Mechanisms of Cryopreservation of Enzymes. In: 2 All-Union Conference on Theoretical and Applied Problems of Cryobiology. Theses of Reports. Kharkiv; 1984. P. 49 (in Russ.)]
 19. Богрянцева МП, Трошкова ГП, Камший ЛП, Мартынец ЛД, Величко АВ, Ночевный ВТ. Способ получения стерильного раствора трипсина для культур клеток. Патент Российской Федерации, № 214503; 1999. [Bogryantseva MP, Troshkova GP, Kamshy LP, Martynets LD, Velichko AB, Nochevny VT. Method for Obtaining a Sterile Solution of Trypsin for Cell Cultures. Patent of the Russian Federation, No. 214503; 1999 (in Russ.)]
 20. Babiuk LA, Mohammed K, Spence L, Fauvel M, Petro R. Rotavirus Isolation and Cultivation in the Presence of Trypsin. *J Clin Microbiol.* 1977;6(6):610–7.
 21. Wyatt RG, James WD, Bohl EH, Theil KW, Saif LJ, Kalica AR, et al. Human Rotavirus Type 2: Cultivation in vitro. *Science* 1980;207(4427):189–91.
 22. Дроздов СГ, Шекоян ЛА, Королев МБ, Анджапаридзе АГ. Ротавирус человека в культуре клеток: выделение и пассирование. Вопросы вирусологии 1979;(4):389–92. [Drozdov SG, Shekoyan LA, Korolyov MB, Andzhapardize AG. Human Rotavirus in Cell Culture: Allocation and Passaging. *Problems of Virology* 1979;(4):389–92 (in Russ.)]
 23. Suzuki H, Kitaoka S, Konno T, Sato T, Ishida N. Two Modes of Human Rotavirus Entry into MA 104 Cells. *Arch Virol.* 1985;85(1–2):25–34.
 24. Ротавирусная инфекция крупного рогатого скота. [Rotavirus Infection of Cattle (in Russ.)] Available from: <https://goo.gl/1zLDyu>
 25. Васильев ЮМ. Оптимизация размножения вирусов гриппа птиц в различных субстратах и совершенствование вакцин против вирусов гриппа птиц: дис. ... канд. биол. наук. М.; 2010. [Vasilyev YuM. Optimization of the Multiplication of Avian Influenza Viruses in Various Substrates and the Improvement of Vaccines against Avian Influenza Viruses. *Cand. Biol. Sci. [dissertation]*. Moscow; 2010 (in Russ.)]
 26. Васильев ЮМ, Руднева ИА, Коптяева ИБ. Сравнительное изучение размножения вирусов гриппа птиц в культуре клеток и куриных эмбрионах. Вопросы вирусологии 2009;54(4):18–23. [Vasilyev YuM, Rudneva IA, Koptayeva IB. Comparative Study of Avian Influenza Virus Propagation in the Cell Culture and Chick Embryos. *Problems of Virology* 2009;54(4):18–23 (in Russ.)]
 27. Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. Activation of Influenza A Viruses by Trypsin Treatment. *Virology* 1975;68(2):426–39.
 28. Сюрин ВН, Самуйленко АЯ, Соловьев ВБ, Фомина НВ. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП; 2001. [Syurin VN, Samuylenko AY, Soloviev VB, Fomina NV. Viral Diseases of Animals. Moscow: VNIITBP; 2001 (in Russ.)]
 29. Силко НЮ, Шаршов КА, Дурьмалов АГ, Шестопалов АМ, Шестопалова ЛВ. Штамм вируса болезни Ньюкасла для использования при серодиагностике болезни Ньюкасла в РТГА. Патент Российской Федерации, № 2482184; 2013. [Silko NU, Sharshov KA, Duramalov AG, Shestopalov AM, Shestopalova LV. Strain of the Newcastle Disease Virus for Use in the Serodiagnosis of Newcastle Disease in the RTGA. Patent of the Russian Federation, No. 2482184; 2013 (in Russ.)]
 30. Орлянкин БГ, Сергеев ВА, Седов ВА. Парвовирусная болезнь свиней. Ветеринария 1987;10:72–6. [Orlyankin BG, Sergeev VA, Sedov VA. Parvoviral Disease of Pigs. *Veterinariya* 1987;10:72–6 (in Russ.)]
 31. Сергеев ОВ. Эпизоотическая диарея свиней. Вопросы вирусологии 2009;54(2):4–7. [Sergeev OV Epizootic Diarrhea of Pigs. *Problems of Virology* 2009;54(2):4–7 (in Russ.)]
 32. Тикунов АЮ, Жираковская ЕВ, Юн ТЭ, Боднев СВ, Нестесов СВ, Тикунова НВ. Молекулярно-генетическая характеристика астровирусов, циркулирующих в Новосибирске. Вопросы вирусологии 2010;55(6):19–23. [Tikunov AY, Zhirakovskaya EV, Yun TE, Bodnev SA, Nestsosov SV, Tikunova NV. Molecular Genetic Characteristics of Astroviruses Circulating in Novosibirsk. *Problems of Virology* 2010;55(6):19–23 (in Russ.)]
 33. Бессарабов ВФ, Вашутин АА, Воронин ЕС. Инфекционные болезни животных. М.: КолосС; 2007. [Bessarabov VF, Vashutin AA, Voronin ES. Infectious Diseases of Animals. Moscow: KolosS; 2007 (in Russ.)]
 34. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам — субстратам производ-

- ства иммунобиологических лекарственных препаратов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.; 2015. [General Monograph 1.7.2.0011.15 Requirements for Cell Cultures — Substrates for the Production of Immunobiological Drugs. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 13 ed. V. 2. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
35. Производство и дистрибуция лекарственных средств. Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках евразийского экономического союза 2017;(1):163–80. *Manufacture and Distribution of Medicines. Normative Legal Acts in the Sphere of Medicinal Products Circulation within the Framework of the Eurasian Economic Union 2017;(1):163–80.*
36. Трипсин сухой стерильный для культур клеток, порошок для приготовления раствора. ТУ 9385-004-05664012-07. [Trypsin is Dry Sterile for Cell Cultures, a Powder for Making a Solution. TU 9385-004-05664012-07 (in Russ.)]
37. Трипсина раствор ТУ 9385-006-45171785-2006. [Trypsin Solution TU 9385-006-45171785-2006 (in Russ.)]
38. Инструкция по применению изделия медицинского назначения «Набора реагентов «Трипсина раствор для культур клеток» ФСП РУ 2007/00039 утв. постановлением Правительства Российской Федерации No. 323.2004. [Instructions for the Use of the Medical Device «Reagent Kit» Trypsin Solution for Cell Cultures» FSR RU 2007/00039 (in Russ.)]
39. Трипсина раствор ТУ 9385-005-13175637-2008. [Trypsin Solution TU 9385-005-13175637-2008 (in Russ.)]
40. 5.2.3. Cell Substrates for the Production of Vaccines for Human Use. *European Pharmacopeia. 8th ed. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). 2014. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep800>*

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 126051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2

Суханова Светлана Михайловна. Начальник лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Петручук Елена Мидатовна. Эксперт 1 категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Генералов Александр Андреевич. Инженер-лаборант лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Поступила 13.03.2018

Принята к публикации 26.04.2018

Authors

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

Svetlana M. Sukhanova. Head of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Elena M. Petruchuk. 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Alexander A. Generalov. Laboratory Technician of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Received 13 March 2018

Accepted 26 April 2018



Туберкулезная вакцина БЦЖ: иммунологическая и клиническая эффективность у детей, рожденных от женщин с ВИЧ-инфекцией

Н. И. Клевно*, В. А. Аксенова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Достоевского, д. 4, корп. 2, Москва, 127473, Российская Федерация

В статье приведен анализ результативности вакцинации и ее влияния на характер туберкулезного процесса у детей с перинатальным контактом по ВИЧ. В качестве объекта исследования использовали историю болезни стационарных больных, выписки из историй болезни и амбулаторных карт больных туберкулезом детей до 14 лет: детей с ВИЧ-инфекцией было 109 пациентов, детей из перинатального контакта по ВИЧ-инфекции (экспонированные по ВИЧ, но не заразившиеся ВИЧ) — 97. Состояние поствакцинального иммунитета оценивали по наличию и размерам поствакцинального рубчика и ответной реакции на пробу Манту. Клиническую эффективность вакцинации БЦЖ оценивали по тяжести туберкулезного процесса у вакцинированных и невакцинированных детей. Установлено, что иммунизация детей вакциной туберкулезной БЦЖ (БЦЖ-М) является безопасной и эффективной у детей, рожденных от женщин с ВИЧ-инфекцией, но неинфицированных ВИЧ. У детей с ВИЧ-инфекцией вакцинация туберкулезной вакциной не обладает достаточной иммунологической и клинической эффективностью: реакция на пробу Манту с 2 ТЕ была положительной лишь у трети привитых; доля диссеминированных процессов среди вакцинированных пациентов по сравнению с группой невакцинированных детей, экспонированных по ВИЧ, достоверно не различалась. Сделан вывод, что вакцинацию детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, но не зараженных ВИЧ, необходимо проводить в период новорожденности. Вакцинация ВИЧ-инфицированных детей не является целесообразной, поскольку при ее малой клинической эффективности существует риск развития диссеминированных форм осложнений, в частности генерализованная БЦЖ-инфекция у детей, зараженных ВИЧ, может развиваться в течение 3 лет с момента вакцинации.

Ключевые слова: туберкулез; вакцина БЦЖ; эффективность и безопасность вакцины; ВИЧ-инфекция; дети, экспонированные по ВИЧ; проба Манту

Для цитирования: Клевно НИ, Аксенова ВА. Туберкулезная вакцина БЦЖ: иммунологическая и клиническая эффективность у детей, рожденных от женщин с ВИЧ-инфекцией. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2018;18(2):114–120. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-114-120>

* **Контактное лицо:** Клевно Надежда Ивановна; n.i.klevno@mail.ru

BCG Tuberculosis Vaccine: Immunological and Clinical Efficacy in Children Born to HIV-Infected Women

N. I. Klevno*, V. A. Aksenova

National Medical Research Centre of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, 4/2 Dostoevskogo St, Moscow 127473, Russian Federation

The article analyses the efficacy of vaccination and its influence on the nature of tuberculosis process in children perinatally exposed to HIV. The study analysed hospital records, hospital discharge summaries and outpatient medical records of children under 14 with tuberculosis: there were 109 HIV-infected children and 97 children perinatally exposed to HIV (but not HIV-infected). The postvaccinal immunity status was assessed by the presence and size of the vaccination scar and the response to the Mantoux test. The clinical efficacy of the BCG vaccination was assessed by the severity of tuberculosis in vaccinated and non-vaccinated children. It was shown that immunization with BCG vaccine (BCG-M) was safe and efficacious in children born to HIV-infected women but not infected with HIV. At the same time the vaccine did not demonstrate sufficient immunological and clinical efficacy in HIV-infected children: the response to the Mantoux test, 2 TU, was positive only in one third of all vaccinated children; there was no statistically significant difference in the frequency of disseminated processes in vaccinated children as compared to the non-vaccinated children perinatally exposed to HIV. A conclusion was made that children born to HIV-infected mothers but not infected with HIV must be vaccinated during the neonatal period. The vaccination of HIV-infected children is not advisable due to its low clinical efficacy and the risk of development of disseminated complications, for instance, the generalized BCG infection in HIV-infected children may develop over a period of 3 years after vaccination.

Key words: tuberculosis; BCG vaccine; vaccine efficacy and safety; HIV infection; HIV-exposed children; Mantoux test

For citation: Klevno NI, Aksenova VA. BCG Tuberculosis Vaccine: Immunological and Clinical Efficacy in Children Born to HIV-Infected Women. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2018;18(2):114–120. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-114-120>

* **Contact person:** Nadezhda I. Klevno; n.i.klevno@mail.ru

Туберкулез остается серьезной проблемой общественного здравоохранения. К числу важных профилактических мероприятий в борьбе с туберкулезом относится специфическая профилактика этой инфекции в период новорожденности [1]. В нашей стране вакцинация против туберкулеза в период новорожденности является обязательной: охват иммунизацией БЦЖ (БЦЖ-М) составляет более 88 % [2]. Иммунизация детей препаратом из живых аттенуированных микобактерий вакцинного штамма в ряде случаев может быть причиной развития осложнений как местных (локальных), так и генерализованных [2].

Возникает закономерный вопрос о необходимости вакцинации БЦЖ детей с ВИЧ-инфекцией, когда риск развития осложнений, в том числе генерализованных, значительно повышается [3]. Впервые обратили внимание на безопасность вакцины БЦЖ у ВИЧ-инфицированных детей эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 1987 г., они рекомендовали при отсутствии клинических признаков ВИЧ-инфекции вакцинировать новорожденных от ВИЧ-инфицированных женщин [4, 5]. Однако в 2007 г. ВОЗ пересмотрела эту политику и рекомендовала отказаться от вакцинации БЦЖ ВИЧ-инфицированных младенцев, в том числе при отсутствии симптомов, характерных для ВИЧ-инфекции [3].

Данное решение было основано на полученных результатах исследования, свидетельствовавших о повышенном риске возникновения диссеминированного туберкулеза у детей, больных ВИЧ-инфекцией (включая бессимптомную форму) в момент вакцинации [6, 7].

В нашей стране вакцинопрофилактика проводится в рамках национального календаря профилактических прививок (приказ Минздрава РФ от 21 марта 2014 г. № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям»), в котором предусмотрена возможность иммунизации вакциной БЦЖ детей, рожденных женщинами с ВИЧ-инфекцией и получавших трехэтапную химиопрофилактику перинатальной передачи ВИЧ. Вакцинацию ВИЧ-инфицированных детей против туберкулеза согласно этому документу не проводят.

С одной стороны, дети, рожденные от ВИЧ-инфицированных матерей, относятся к группе риска по развитию заболевания туберкулезом, с другой — ВИЧ-инфицированные младенцы относятся к группе риска по развитию диссеминированных осложнений вакцины БЦЖ, хотя степень риска остается неопределенной [8].

Изучение клинической эффективности БЦЖ у экспонированных младенцев имеет важнейшее значение для принятия решения об иммунизации против туберкулеза таких детей с позиции «польза/риск».

Исследование не носит комплексный характер определения клинической эффективности вакцинации против туберкулеза детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей. Приведены результаты наблюдений в соответствии с целью изучения иммунологической и клинической эффективности вакцины БЦЖ у детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных женщин.

Материалы и методы

Объект исследования — истории болезни стационарных больных, выписки из историй болезни и амбулаторных карт больных туберкулезом детей до 14 лет. Из них: детей с ВИЧ-инфекцией было 109 пациентов, детей из перинатального контакта по ВИЧ-инфекции (экспонированные по ВИЧ, но не заразившиеся ВИЧ) — 97.

Для проведения анализа клинической эффективности вакцины БЦЖ пациенты с туберкулезом, экспонированные по ВИЧ-инфекции, были разделены на 2 группы (табл. 1): дети, больные ВИЧ-инфекцией (по международной классификации болезней десятого пересмотра (МКБ-10) — B23); дети с перинатальным контактом по ВИЧ-инфекции (МКБ-10 — R75). Треть детей (29,1 %) среди пациентов указанных групп были вакцинированы БЦЖ (препаратом вакцины БЦЖ или БЦЖ-М). В группе детей с ВИЧ-инфекцией 41 % были вакцинированы БЦЖ, а в группе детей с перинатальным контактом по ВИЧ-инфекции этот показатель составлял только 15,5 %. До 2011 г. противопоказанием для проведения новорожденным противотуберкулезной вакцинации в родильном доме являлась ВИЧ-инфекция у матери. Возможно, значительная разница вышеуказанных показателей обусловлена тем, что женщины из группы B23 чаще поступали в родильное отделение без установленного диагноза ВИЧ-инфекции, в связи с чем ошибочно чаще под вакцинацию попадали дети с ВИЧ-инфекцией [9, 10].

В большинстве случаев вакцинация новорожденных была проведена в родильных домах на 3–7 сут жизни. Доля таких детей составила 75 % от всех вакцинированных. Остальные дети (25 %) были вакцинированы в условиях детской поликлиники. Количество вакцинированных в возрасте до 1 года составило 8,3 %, с 1 до 1,5 года — 10 % и с 1,5 года до 2 лет — 6,7 %. Среди вакцинированных в период новорожденности несколько меньше (60 %) вакцинировано детей без ВИЧ-инфекции, чем детей с ВИЧ-инфекцией (80 %).

Не было существенных возрастных различий по заболеваемости вакцинированных детей в группе детей, больных ВИЧ-инфекцией (51,1 %) и детей с перинатальным контактом по ВИЧ. Дети в возрасте 3–6 лет составляли 51,1 и 60,0 % соответственно.

Для обработки данных использовали программу Microsoft Office Word Excel версии 2007, а также пакет прикладных программ Statistica 10.0 фирмы StatSoft Inc. с применением методов параметрической и непараметрической статистики. Наблюдаемые частоты явлений оценивали по вычислению отношения шансов (ОШ). Для точности оценки интересующих нас параметров использовали доверительные интервалы (95 % ДИ). Различия считали достоверными, если доверительный интервал не включал ноль. Вероятность достоверности различий зависела от принятого значения вероятности ошибки первого рода.

В современных условиях состояние поствакцинального иммунитета принято оценивать по наличию и размерам поствакцинального рубчика и ответной реакции на пробу Манту. Хотя эти критерии являются условными для характеристики напряженности противотуберкулезного иммунитета, особенно при отсутствии рубчика и отрицательной реакции на туберкулиновые пробы [11, 12], мы использовали их для оценки поствакцинального иммунитета. Клиническую эффективность

Таблица 1. Наличие вакцинации БЦЖ/БЦЖ-М у детей, больных туберкулезом, экспонированных по ВИЧ-инфекции

Вакцинация БЦЖ/ БЦЖ-М	Больные туберкулезом				Всего	
	группа B23		группа R75			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Привиты	45	41	15	15,5	60	29,1
Не привиты	64	59	82	84,5	146	70,9
Всего	109	100	97	100	206	100

вакцинации БЦЖ оценивали по тяжести туберкулезного процесса у вакцинированных и невакцинированных детей.

Результаты и обсуждение

Изучение клинической эффективности вакцинации БЦЖ в группе R75 (дети с перинатальным контактом по ВИЧ-инфекции)

Прежде всего следует отметить, что невакцинированные дети из группы R75 были инфицированы микобактериями туберкулеза в раннем детском возрасте: каждый третий ребенок заразился микобактериями туберкулеза (МБТ) в возрасте до 1 года, а к 2 годам количество зараженных детей составило 89 %. Доля инфицированных МБТ детей в возрасте от 3 до 5 лет составила лишь 11 %. Среди невакцинированных БЦЖ детей количество больных туберкулезом в возрасте 0–2 года было больше, чем среди детей старше 3 лет: 61 % (50 из 82 пациентов) и 39 % (32 ребенка из 82) соответственно (ОШ = 2,57; 95 % ДИ 1,02–4,7).

Практически все (96,9 %) заболевшие туберкулезом пациенты находились в тесном контакте с источником туберкулезной инфекции до выявления заболевания, что подтверждает постулат: дети раннего возраста, находясь в постоянном контакте с источником инфекции, как правило, в результате инфицирования заболевают туберкулезом. Вакцинированные БЦЖ дети с перинатальным контактом по ВИЧ-инфекции также чаще инфицировались МБТ в течение первых 2 лет жизни (66,7 %), так как находились в постоянном контакте с ис-

точником туберкулезной инфекции в 100 % случаев. Однако этот показатель ниже, чем в группе невакцинированных детей (89 и 66,7 %), а для детей старше 3 лет, наоборот, выше (11 и 33,3 % соответственно). В возрасте до 1 года был инфицирован каждый четвертый ребенок. Доля больных туберкулезом в возрасте 0–2 года была меньше по сравнению с детьми старше 3 лет.

Таким образом, вакцинация БЦЖ в период новорожденности в определенной мере предохраняла детей этой группы от туберкулезной инфекции по сравнению с детьми, не получившими прививку БЦЖ. Среди непривитых детей 9 из 10 инфицировались МБТ в течение первых 2 лет, а вакцинированные БЦЖ — 6 из 10 детей (ОШ = 4,07; 95 % ДИ 1,19–8,09). Туберкулезом чаще заболевали дети в раннем возрасте: 61,0 % против 33,3 % (ОШ = 3,16; 95 % ДИ 1,06–5,97).

У детей группы R75 исследовали влияние вакцинации БЦЖ на течение туберкулеза и возможность предупреждения гематогенно-диссеминированных форм заболевания (табл. 2). Отмечено, что у вакцинированных детей туберкулез протекал в основном «гладко» — в 86,6 % случаев (у 13 пациентов из 15); осложненное течение туберкулезного процесса (ателектаз легочного сегмента) наблюдалось у одного ребенка в возрасте 1,5 лет и одного — в возрасте 6 лет, что составило 13,4 % случаев. Среди привитых БЦЖ диссеминация процессов и внелегочная локализация процесса не выявлены. В структуре клинических форм туберкулеза чаще диагностировали туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ) — 73,3 %. Первичный туберкулезный комплекс (ПТК) выявлен у 4 детей

Таблица 2. Формы туберкулеза у детей из перинатального контакта по ВИЧ-инфекции, вакцинированных и не вакцинированных БЦЖ (группа R75)

Форма туберкулеза	Больные туберкулезом			
	Возраст (лет)			Всего 97 (100 %)
	0–2	3–6	7–14	
Вакцинированные				
	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)
ТВГЛУ + ПТК «гладкое» течение	4 (26,6)	8 (53,3)	1 (6,7)	13 (86,6)
ТВГЛУ + ПТК осложненное течение	1 (6,7)	1 (6,7)	—	2 (13,4)
Диссеминированный	—	—	—	—
Внелегочной	—	—	—	—
Всего	5 (33,3)	9 (60,0)	1 (6,7)	15 (100)
Невакцинированные				
	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)
ТВГЛУ + ПТК «гладкое» течение	26 (31,8)	23 (28)	1 (1,2)	50 (61)
ТВГЛУ + ПТК осложненное течение	21 (25,6)	7 (8,6)	—	28 (34,2)
Диссеминированный	1 (1,2)	1 (1,2)	—	2 (2,4)
Внелегочный	2 (2,4)	0	0	2 (2,4)
Всего абс. (%)	50 (61,0)	31 (37,8)	1 (1,2)	82 (100)

Примечание. ТВГЛУ — туберкулез внутригрудных лимфатических узлов; ПТК — первичный туберкулезный комплекс.

из 15 (26,7 %). Следует подчеркнуть, что у детей дошкольного возраста в 40 % случаев выявлен туберкулез в фазе обратного развития (уплотнения и кальцинации).

У пациентов, не привитых БЦЖ, «гладкое» течение туберкулеза отмечено более чем у половины заболевших (61,0 %), и почти у 40 % больных туберкулез был осложненным, а в отдельных случаях с гематогенным распространением инфекции. Осложнения первичного туберкулеза (ателектаз, бронхолегочное поражение, очаги обсеменения) диагностированы в 34,2 % случаев, причем осложненное течение заболевания встречалось значительно чаще (в 3 раза) у детей в возрасте 0–2 года по сравнению с детьми старше 3 лет (25,6 и 8,6 % соответственно; ОШ = 3,82; 95 % ДИ 1,07–7,85). У двух пациентов, не вакцинированных БЦЖ, в возрасте 3 года 8 мес. и 1 год 10 мес. был диагностирован генерализованный туберкулез: множественная локализация, в том числе с поражением мозговых оболочек. В 2 случаях диагностирован туберкулез внелегочной локализации: туберкулезный менингит у ребенка в возрасте 8 мес. и туберкулезный спондилит — в возрасте 2 лет.

В целом у детей, не получивших БЦЖ-вакцинацию в период новорожденности, так же как и у вакцинированных, преобладал ТВГЛУ (74,5 %); ПТК обнаружен у 17 детей из 82 (20,7 %); у 4 (4,8 %) — туберкулез с гематогенным распространением МБТ. Туберкулезный процесс в фазе обратного развития был выявлен в 28,5 % случаев.

Таким образом, проведенное изучение в группе R75 клинической эффективности противотуберкулезной вакцинации показал, что вакцинация БЦЖ детей, не заразившихся ВИЧ в перинатальном периоде, снижает риск раннего инфицирования и заболевания туберкулезом и предполагает более благоприятное течение туберкулезного процесса по сравнению с не вакцинированными БЦЖ (86,6 и 61 %; ОШ = 1,83; $p < 0,05$). Вакцинация БЦЖ также снижает риск развития диссеминации процесса.

Изучение клинической эффективности вакцинации БЦЖ в группе В23 (ВИЧ-инфицированные дети)

Из 45 ВИЧ-инфицированных детей 36 были привиты от туберкулеза в родильных домах. Остальные 9 детей привиты в амбулаторных условиях в возрасте 1–2 года. Трое из этих 9 детей вакцинированы после снятия с учета, а ВИЧ-инфекция установлена у них после выявления туберкулеза; ВИЧ-статус 5 вакцинированных детей был неизвестен, так как они не наблюдались по этой инфекции до заболевания туберкулезом; один ребенок с ВИЧ-инфекцией привит ошибочно в возрасте двух лет.

Мы изучили течение туберкулезного процесса у детей с ВИЧ-инфекцией, привитых и не привитых против туберкулеза.

В группе детей, больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией (В23), среди вакцинированных и невакцинированных более чем у половины детей (63,8 %) был установлен контакт с источником туберкулеза. В группе детей, больных ВИЧ-инфекцией, сложно было установить сроки инфицирования МБТ у привитых и не привитых БЦЖ, поскольку туберкулиновые пробы часто были отрицательными в момент выявления заболевания, а динамика их в анамнезе практически не отражена.

Мы провели анализ методов выявления туберкулеза у вакцинированных и не вакцинированных, считая, что в какой-то степени метод выявления отражает течение туберкулезного процесса.

В половине случаев туберкулез у вакцинированных и невакцинированных пациентов был выявлен по жалобам, а так-

же по клиническим проявлениям заболевания (по обращаемости) — в 51,1 и 46,9 % случаев соответственно ($p > 0,05$). По контакту были выявлены треть пациентов среди вакцинированных и невакцинированных против туберкулеза (31,1 и 31,3 % соответственно).

Доля больных, выявленных по туберкулиновым пробам (основной метод выявления туберкулеза у детей в популяции), в целом составила 18,3 % (20 человек из 109). Реакция на туберкулиновые пробы чаще была отрицательной у невакцинированных детей: 42,2 % против 26,75 % у вакцинированных БЦЖ (ОШ = 2,0; 95 % ДИ 1,12–3,45). Предположительно, наслоение инфицирования микобактериями туберкулеза на поствакцинный (БЦЖ) ответ усиливает чувствительность к туберкулину, что проявляется положительным результатом на пробу Манту. В двух случаях туберкулез выявлен при рентгенологическом исследовании органов грудной клетки по поводу низкого содержания CD4-лимфоцитов.

Таким образом, туберкулез у каждого второго ребенка с ВИЧ-инфекцией как среди вакцинированных, так и среди невакцинированных, выявляли по обращаемости, что предполагает наличие распространенных процессов у детей в независимости от вакцинации БЦЖ.

Общепризнано, что вакцина БЦЖ обладает наибольшим протективным действием в раннем возрасте, однако при анализе методов выявления туберкулеза у детей в различных возрастных группах особых различий мы не выявили. Тем не менее туберкулез у привитых детей в возрасте 0–2 года реже выявляли при обращении с симптомами заболевания (8,8 %) по сравнению с непривитыми (17,2 %; ОШ = 0,45; ДИ 0,33–0,73) и с возрастом 3–6 лет (18,8 и 31,1 %; ОШ = 2,95; ДИ 0,5–1,2). Вероятно, у инфицированных ВИЧ детей раннего возраста вакцинация БЦЖ снижает риск возникновения тяжелых форм туберкулеза, но из-за небольшой выборки о достоверности результатов судить сложно (12 детей привитых и 23 непривитых). В половине случаев у детей в возрасте 7–14 лет заболевание туберкулезом установлено по обращению с жалобами. Количество случаев не зависело от наличия или отсутствия вакцинации.

По структуре клинических форм туберкулеза не было значимых различий у вакцинированных и невакцинированных (табл. 3).

Как следует из данных, представленных в таблице 3, «гладкое» течение туберкулеза встречалось примерно с одинаковой частотой у вакцинированных и невакцинированных: в 46,6 и 40,6 % случаев соответственно ($p > 0,05$). Не доказана также достоверность различий при сравнении частоты выявления больных с диссеминированными процессами в этих группах (28,9 и 20,3 %; $p > 0,05$). Милиарный туберкулез у детей раннего возраста регистрировался с одинаковой частотой (4,4 и 4,7 %) независимо от наличия или отсутствия вакцинации БЦЖ. Несколько чаще, чем у детей раннего возраста, диссеминированный туберкулез выявляли в возрастной группе 7–14 лет (8,9 и 6,3 % случаев), но реже, чем в группе 5–6 лет (15,6 и 9,4 % случаев) у вакцинированных и невакцинированных соответственно. Риск развития диссеминированных процессов увеличивался с возрастом пациентов: у вакцинированных в возрасте 0–2 года диссеминированный туберкулез встречался в 16,6 %, в возрасте 3–6 лет — в 30,4 % и в возрасте 7–14 лет — в 40 % случаев (ОШ = 1,74; 95 % ДИ 1,12–3,96; ОШ = 1,92; 95 % ДИ 1,04–5,1). Такая же стойкая тенденция выявлена у невакцинированных пациентов: в возрасте 0–2 года — в 13,0 %, в возрасте 3–6 лет — в 18,8 %, в возрасте 7–14 лет — в 44,4 % случаев (ОШ = 1,54; 95 % ДИ 1,02–3,76; ОШ = 3,47; 95 % ДИ 1,14–6,7).

Таблица 3. Формы туберкулеза у детей с ВИЧ-инфекцией, вакцинированных и не вакцинированных БЦЖ (группа В23)

Форма туберкулеза	Количество больных туберкулезом			
	Возраст (лет)			Всего 109 (100 %)
	0–2	3–6	7–14	
Вакцинированные				
	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)
ТВГЛУ + ПТК «гладкое» течение	6 (13,3)	9 (20,0)	6 (13,3)	21 (46,6)
ТВГЛУ + ПТК осложненное течение	3 (6,7)	7 (15,6)	—	10 (22,3)
Диссеминированный (генерализованный)	2 (4,4)	7 (15,6)	4 (8,9)	13 (28,9)
ТВЛ	1 (2,2)	—	—	1 (2,2)
Всего	12 (26,7)	23 (51,1)	10 (22,2)	45 (100)
Невакцинированные				
	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)
ТВГЛУ + ПТК «гладкое» течение	8 (12,5)	16 (25,0)	2 (3,1)	26 (40,6)
ТВГЛУ + ПТК осложненное течение	12 (17,2)	9 (14,1)	3 (4,6)	24 (37,5)
Диссеминированный (милиарный)	3 (4,7)	6 (9,4)	4 (6,3)	13 (20,3)
ТВЛ	—	1 (1,6)	—	1(1,6)
Всего абс. (%)	23 (35,9)	32 (50)	9 (14,1)	64 (100)

Примечание. ТВГЛУ — туберкулез внутригрудных лимфатических узлов; ПТК — первичный туберкулезный комплекс; ТВЛ — туберкулез внелюточной локализации.

Проведенное исследование показало различную эффективность вакцинации против туберкулеза у детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей, не заразившихся ВИЧ и инфицированных ВИЧ в результате перинатальной трансмиссии.

Клиническая эффективность вакцинации БЦЖ в родильном доме подтверждена у детей, не инфицированных ВИЧ (группа R75): вакцинация БЦЖ способствует более благоприятному (неосложненному) течению туберкулезного процесса, предотвращает диссеминацию туберкулеза, включая туберкулезный менингит. У невакцинированных детей этой группы установлены как случаи диссеминированного туберкулеза, так и отдельно туберкулезного менингита, риск развития которых выше у детей раннего возраста относительно детей старше 3 лет (ОШ = 3,08; 95 % ДИ 1,5–7,3).

Показан недостаточный уровень эффективности вакцинации БЦЖ у инфицированных ВИЧ детей (группа В23): доля больных с диссеминированными (включая менингит) процессами не зависела от противотуберкулезной прививки, как в общем по группе (28,9 и 20,3 % соответственно при $p > 0,05$), так и в раннем возрасте (в 4,4 и 4,7 % случаев соответственно при $p > 0,05$).

У ВИЧ-инфицированных детей риск развития диссеминированных процессов в большей степени был связан не с вакцинацией против туберкулеза, а с длительностью течения самой ВИЧ-инфекции, приводящей к снижению иммунного статуса ребенка.

Наши исследования подтверждают, что в связи с риском развития диссеминированной БЦЖ-инфекции вакцинация

против туберкулеза ВИЧ-инфицированных детей нецелесообразна.

Для оценки напряженности поствакцинального иммунитета использовали традиционные критерии результативности вакцинации, а именно: формирование рубчика в месте введения вакцины БЦЖ и гиперчувствительности замедленного типа по стандартной пробе Манту. О безопасности вакцинации БЦЖ судили по возникновению общих реакций (повышение температуры тела выше 38 °С, появление симптомов интоксикации) и осложнений в ответ на введение препарата.

Результативность и безопасность противотуберкулезной вакцинации у детей, рожденных от больных ВИЧ-инфекцией женщин

Состояние специфического поствакцинального иммунитета и безопасность вакцинации БЦЖ исследована у 376 детей. Из них:

- с установленным диагнозом ВИЧ-инфекции — 131 ребенок (В23);
- с перинатальным контактом по ВИЧ-инфекции — 141 ребенок (R75);
- рожденные женщинами с ВИЧ-негативным статусом — 104 ребенка (условно ГС — группа сравнения).

Сроки вакцинации детей варьировали от нескольких дней (в родильном доме) до нескольких лет.

Доля вакцинированных в срок до 18 месяцев (включая родильный дом) составила 47,3 % среди ВИЧ-инфицированных детей и 97,9 % — среди контактных по ВИЧ-инфекции.

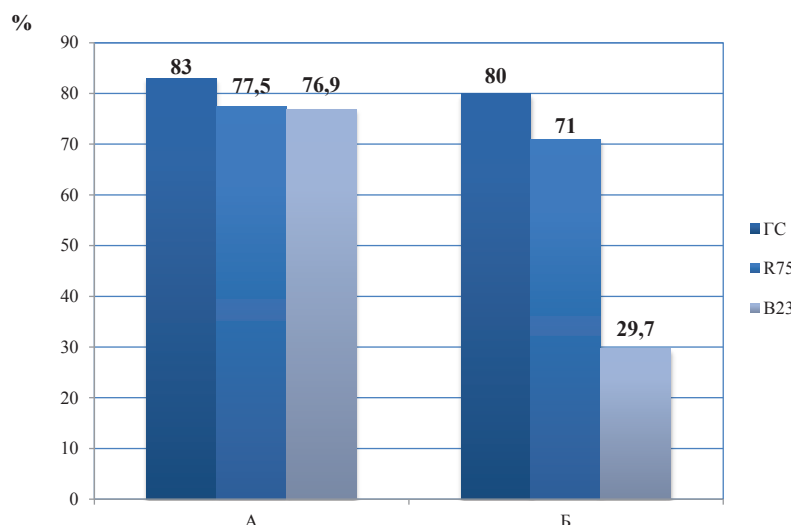


Рис. 1. Характеристика специфического иммунного ответа на введение БЦЖ у детей с ВИЧ-инфекцией и без ВИЧ-инфекции: А — наличие поствакцинального рубчика, Б — положительная проба Манту (ГС — группа сравнения; B23 — дети, больные ВИЧ-инфекцией; R75 — дети с перинатальным контактом по ВИЧ-инфекции).

Практически все дети группы сравнения были привиты в родильных домах (90,4 %).

Наличие поствакцинального иммунитета оценивали по результатам вакцинации спустя год после прививки. К этому сроку иммунитет ребенка полностью сформирован, а детям впервые проводят туберкулиновую пробу для оценки реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Рубчик в месте введения БЦЖ размером 3 мм и более отмечен у большинства детей во всех группах; в группе сравнения — в 83 %, несколько реже в группе R75 — 77,5 % и в группе B23 — в 76,9 % случаев (рис. 1) при незначимых различиях между показателями. В то же время результаты ответных реакций на туберкулиновую пробу значительно различались у детей с ВИЧ-инфекцией и без ВИЧ-инфекции. Реакции на внутрикожное введение 2 ТЕ очищенного туберкулина в стандартном разведении у детей группы R75, привитых БЦЖ (71 %) практически не отличались от результатов пробы у здоровых детей ГС (80 %); $p > 0,05$.

У детей с ВИЧ-инфекцией положительную реакцию на пробу Манту регистрировали только в 29,7 % случаев, что в 2,7 раза реже, чем в ГС, и в 2,4 раза реже, чем в группе R75 (ОШ = 0,15; 95 % ДИ 0,10–0,77).

Таким образом, анализ результативности проведенной противотуберкулезной вакцинации, по которой оценивали ее эффективность, позволяет утверждать, что ВИЧ-статус матери при отсутствии инфицирования ВИЧ у ребенка (R75) не оказывает заметного иммуносупрессивного влияния на постнатальное развитие иммунной системы ребенка. По клинико-иммунологическим реакциям на вакцинацию БЦЖ (наличие кожного знака и положительная реакция на пробу Манту) данная группа детей не отличается от группы здоровых детей (ГС). В то же время у детей с ВИЧ-инфекцией не формируется специфический иммунный ответ на том же уровне, что у детей без ВИЧ-инфекции. Образование рубчика происходит в основном за счет воспалительных изменений в коже, что связано с введением внутрикожно взвеси живой культуры микобактерий БЦЖ. Поэтому его наличие не может служить критерием эффективности вакцинации у детей с ВИЧ-инфекцией, у которых специфический иммунный ответ не формируется на том же уровне, что у детей без ВИЧ-инфекции. Хотя В-лимфоциты способны продуцировать антитела, функция Т-лимфоцитов подавлена,

что, видимо, взаимосвязано с подавлением хелперной функции CD4-клеток. По мнению многих авторов, индуцированный БЦЖ иммунный ответ на уровне Т-лимфоцитов у детей с ВИЧ-инфекцией значительно снижен [3, 4]. Туберкулезная вакцина — препарат из живых микобактерий вакцинного штамма БЦЖ, поэтому поствакцинальные осложнения неизбежны даже у здоровых детей. Однако риск их возникновения значительно меньше при соблюдении критериев отбора детей для вакцинации и правильном введении вакцины. Наиболее опасными являются генерализованные осложнения вакцинации, в частности диссеминированная БЦЖ-инфекция, которая развивается у детей с недостаточностью клеточного иммунитета, в частности при ВИЧ-инфекции [13].

Исходя из данных анамнеза детей, привитых туберкулезной вакциной, клинические проявления на введение вакцины БЦЖ, такие как симптомы интоксикации, повышение температуры тела, не были выявлены ни в одной группе. Локальные осложнения в виде холодного абсцесса зарегистрированы у 3 детей из группы ВИЧ-инфицированных и 2 детей — из группы перинатального контакта по ВИЧ-инфекции, регионарного подмышечного лимфаденита — по одному ребенку той и другой группы. В одном случае зарегистрирована генерализованная БЦЖ-инфекция. Мальчик был вакцинирован в возрасте 1,5 лет после снятия диагноза ВИЧ-инфекции, а через месяц после вакцинации у него была диагностирована генерализованная БЦЖ-инфекция на фоне тяжелого иммунодефицита и высокой вирусной нагрузки.

В группе здоровых детей (ГС) поствакцинальных осложнений не было.

Заключение

Вакцинация против туберкулеза детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, но не зараженных ВИЧ, является безопасной и результативной. Клиническая эффективность БЦЖ у детей с перинатальным контактом по ВИЧ проявляется в предотвращении диссеминированных и осложненных туберкулезных процессов, особенно у детей раннего возраста.

У детей с ВИЧ-инфекцией вакцинация туберкулезной вакциной не обладает достаточной иммунологической и клинической эффективностью: реакция на пробу Манту с 2 ТЕ положительная в трети случаев, отсутствуют достоверные различия

в частоте диссеминированных (включая менингит) процессов у больных туберкулезом вакцинированных БЦЖ или невакцинированных детей.

Таким образом, вакцинацию детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, но не зараженных ВИЧ, необходимо проводить в период новорожденности. Вакцинация ВИЧ-инфицированных детей не является целесообразной, поскольку при ее малой клинической эффективности существует риск развития диссеминированных форм осложнений. Причем, генерализованная БЦЖ-инфекция у детей, зараженных ВИЧ, может развиваться в течение 3 лет с момента вакцинации.

Информация об отсутствии конфликта интересов.

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

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

Литература / References

1. Аксенова ВА, Леви ДТ. Туберкулез у детей и подростков. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2012;(1):22–7. [Aksenova VA, Levi DT. Tuberculosis in Children and Adolescents. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2012;(1):22–7 (In Russ.)]
2. Клевно НИ, Аксенова ВА. Проблемы туберкулеза у детей, больных ВИЧ-инфекцией. Первый Конгресс Национальной ассоциации фтизиатров. 18–20 октября 2012. СПб; 2012. С. 398–400. [Klevno NI, Aksenova VA. Problems of Tuberculosis in Children with HIV Infection. First Congress of the National Association of Phthisiologists. 18–20 October 2012. St. Petersburg; 2012. P. 398–400 (In Russ.)]
3. Revised BCG Vaccination Guidelines for Infants at Risk for HIV Infection. Wkly Epidemiol Rec. 2007;82(21):193–6.
4. BCG vaccines: WHO position paper — February 2018. Wkly Epidemiol Rec. 2018;93(8):73–96.
5. von Reyn CF, Clements CJ, Mann JM. Human Immunodeficiency Virus Infection and Routine Childhood Immunisation. Lancet 1987;2(8560):669–72.
6. Hesselting AC, Johnson LF, Jaspan H, Cotton MF, White-law A, Schaaf HS, et al. Disseminated Bacille Calmette-Guérin Disease in HIV-Infected South African Infants. Bull World Health Organ. 2009;87(7):505–11. DOI: 10.2471/BLT.08.055657
7. Hesselting AC, Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Fine PE, Godfrey-Faussett P, Beyers N. The Risk of Disseminated

Bacille Calmette-Guerin (BCG) Disease in HIV-infected Children. Vaccine 2007;25(1):14–8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.07.020

8. Azzopardi P, Bennett CM, Graham SM, Duke T. Bacille Calmette-Guérin vaccine-related disease in HIV-infected children: a systematic review. Int J Tuberc Lung Dis. 2009;13(11):1331–44.
9. Приказ Минздрава России от 21.03.2003 № 109 (ред. от 05.06.2017) «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of March 21, 2003 No. 109 (as Amended on 05.06.2017) «On the Improvement of Anti-tuberculosis Measures in the Russian Federation» (In Russ.)]
10. Приказ Минздравсоцразвития России от 11.01.2007 № 14 «О внесении изменений в приказ Минздрава России от 27 июня 2001 г. № 229 «О Национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям» и утверждении отчетной формы № 68 «Сведения о контингентах детей и взрослых, дополнительно иммунизированных против гепатита В, полиомиелита, гриппа, краснухи, и о движении вакцин для иммунизации» (вместе с «Инструкцией по заполнению отчетной формы № 68»). [Order of the Ministry of Health and Social Development of Russia from 11.01.2007 No. 14 «On Amendments to Order No. 229 of the Ministry of Health of the Russian Federation of June 27, 2001, «On the National Calendar of Prophylactic Vaccinations and the Calendar of Preventive Vaccinations for Epidemic Evidence», and Approval of Reporting Form No. 68 «Information on Contingents of Children and Adults Additionally Immunized against Hepatitis B, Poliomyelitis, Influenza, Rubella, and the Movement of Vaccines for Immunization» (together with the «Instruction for Completing the Report form No. 68») (In Russ.)]
11. Fine PEM, Carneiro IAM, Milstien JB, Clements CJ. Issues Relating to the Use of BCG in Immunization Programmes. A Discussion Document. WHO/V&B/99.23. Geneva: WHO; 1999. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66120/WHO_V_B_99.23.pdf?sequence=1
12. Nuttall JJ, Eley BS. BCG Vaccination in HIV-Infected Children. Tuberc Res Treat. 2011;2011:712736. DOI: 10.1155/2011/712736
13. Hesselting AC, Rabie H, Marais BJ, Manders M, Lips M, Schaaf HS, et al. Bacilli Calmette-Guerin Vaccine-Induced Disease in HIV-Infected and HIV-Uninfected Children. Clin Infect Dis. 2006;42(4):548–58. DOI: 10.1086/499953

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127473, Москва, ул. Достоевского, д. 4, корп. 2

Клевно Надежда Ивановна. Ведущий научный сотрудник лаборатории туберкулеза у детей и подростков, д-р мед. наук

Аксенова Валентина Александровна. Заведующая лабораторией туберкулеза у детей и подростков, д-р мед. наук, профессор

Поступила 22.03.2018

Принята к публикации 26.04.2018

Authors

Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Centre of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 4/2 Dostoevskogo street, Moscow 127473, Russian Federation

Nadezhda I. Klevno. Leading Researcher of the Laboratory of Tuberculosis in Children and Adolescents. Doctor of Medical Sciences

Valentina A. Aksenova. Head of the Laboratory of Tuberculosis in Children and Adolescents. Doctor of Medical Sciences, Professor

Received 22 March 2018

Accepted 26 April 2018

Оценка стабильности показателей качества отечественной вакцины против гриппа, предназначенной для иммунизации населения в течение эпидемического сезона 2017–2018 гг.

П. В. Демидова, К. М. Мефед*, Д. С. Давыдов, К. А. Саркисян, А. А. Мовсесянц, В. А. Меркулов

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

Вопрос об эффективности вакцин против гриппа продолжает быть актуальным и широко обсуждаемым со времен применения первой противогриппозной вакцины. Эффективность современных вакцин зависит от многих факторов, в том числе от штаммового состава, степени гомологии производственных и эпидемических вирусов гриппа, охвата населения профилактическими прививками, других аспектов. Вопрос оценки качества, выражающийся в определении соответствия показателей качества требованиям спецификации нормативной документации, как и вопрос оценки рисков при использовании вакцин против гриппа, рассматривался лишь в контексте общих требований к качеству иммунобиологических препаратов. В настоящей статье приведены результаты анализа стабильности показателей качества на примере серий вакцины гриппозной инактивированной полимер-субъединичной. Проведена ретроспективная оценка данных выпускающего контроля препарата и результатов испытаний, проведенных в аккредитованном испытательном центре, в рамках обязательной сертификации. Полученные данные могут быть использованы при совершенствовании технологии производства и системы статистического управления производственного процесса, для оценки рисков, сопровождающих процесс приготовления гриппозной вакцины на каждом из его этапов.

Ключевые слова: вакцины гриппозные; управление качеством; контрольные карты; национальный календарь профилактических прививок

Для цитирования: Демидова ПВ, Мефед КМ, Давыдов ДС, Саркисян КА, Мовсесянц АА, Меркулов ВА. Оценка стабильности показателей качества отечественной вакцины против гриппа, предназначенной для иммунизации населения в течение эпидемического сезона 2017–2018 гг. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2018;18(2):121–132. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-121-132>

* Контактное лицо: Мефед Кирилл Михайлович; Mefed@expmed.ru

Analysis of Batch to Batch Consistency of a Locally Produced Influenza Vaccine for the 2017–2018 Influenza Season

P. V. Demidova, K. M. Mefed*, D. S. Davydov, K. A. Sarkisyan, A. A. Movsesyants, V. A. Merkulov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

The efficacy of influenza vaccines has been a matter of considerable debate ever since the development of the first influenza vaccine. The efficacy of currently used influenza vaccines depends on many factors, including the strain composition, the degree of homology between the produced and epidemic influenza viruses, the vaccination coverage, and many other factors. Assessment of quality, i.e. determination of compliance of the product's quality characteristics with the specification requirements, and assessment of risks associated with the use of the product were considered only in the context of general requirements for the quality of biologicals. The article summarises the results of analysis of batch to batch consistency of the influenza inactivated polymer-subunit vaccine. The study included a retrospective assessment of the data obtained during the product release control and testing performed by an accredited testing centre as part of mandatory certification. The data obtained may be used to improve the production method and the system of statistical management of the production process, as well as to assess the risks accompanying the production of influenza vaccine at each of the stages.

Key words: influenza vaccines; quality management; control charts; national vaccination schedule

For citation: Demidova PV, Mefed KM, Davydov DS, Sarkisyan KA, Movsesyants AA, Merkulov VA. Analysis of Batch to Batch Consistency of a Locally Produced Influenza Vaccine for the 2017–2018 Influenza Season. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2018;18(2):121–132. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-121-132>

* Contact person: Kirill M. Mefed; Mefed@expmed.ru

Традиционный подход изготовителя, вне зависимости от вида продукции, — это производство и контроль качества для проверки готовой продукции и отбраковка единиц, не соответствующих установленным требованиям по отдельному(-ым) показателю(-ям). Такая стратегия часто приводит к потерям и не экономична, поскольку построена на проверке постфактум, когда бракованная продукция уже создана, а в некоторых случаях и реализована.

Опережающий подход к обеспечению контроля качества продукции подразумевает использование так называемого метода статистического управления процессами производства, основной задачей которого является поддержание производственных процессов на приемлемом стабильном уровне, обеспечение гарантий соответствия продукции установленным требованиям [1, 2].

Статистические методы контроля качества — широко распространенный инструмент управления качеством в различных областях промышленности. Они используются для обеспечения уверенности в том, что производимая продукция обладает требуемым качеством. При правильном применении статистических методов управления качеством, предприятия приобретают возможность системного подхода к анализу процессов и выработке управленческих решений, направленных на системное повышение качества продукции, т.е. получают возможность реализовывать такие принципы международных серий стандартов ИСО 9000, как «принятие решений, основанное на фактах» и «постоянное совершенствование» [1].

Термин «статистическое управление процессами» (Statistical Process Control, SPC) часто используется как синоним выражения «статистическое управление качеством» (Statistical Quality Control, SQC). Статистическое управление процессами, основываясь на анализе обычных (случайных) и особых (неслучайных) причин, позволяет не только обнаруживать отклонения от установленных требований, но и использовать полученную информацию для управления и совершенствования процессов, в частности для улучшения их показателей и предотвращения появления брака [3, 4].

Для установления стабильности производственных процессов с идентификацией и последовательным устранением особых причин используются контрольные карты, представляющие графическое средство, использующее статистические подходы, важность которых для управления производственными процессами была впервые показана доктором У. Шухартом в 1924 г. Теория контрольных карт различает два вида изменчивости.

Первый вид — изменчивость из-за случайных (обычных) причин, обусловленная бесчисленным набором разнообразных причин, присутствующих постоянно, которые нелегко или невозможно выявить. Каждая из таких причин составляет очень малую долю общей изменчивости, и ни одна из них не значима сама по себе. Тем не менее сумма всех этих причин измерима и предполагается, что она внутренне присуща процессу. Исключение или уменьшение влияния обычных причин требует управленческих решений и выделения ресурсов на улучшение процесса и системы [5].

Второй вид — реальные перемены в процессе. Они могут быть следствием некоторых определяемых причин, не присущих процессу внутренне, и могут быть устранены, по крайней мере, теоретически. Эти выявляемые причины рассматриваются как «неслучайные» или «особые» причины изменения. К ним могут быть отнесены поломка инструмента, недостаточная однородность материала, производственного или контрольного оборудования, квалификация персонала, невыполнение процедур и т.д. [1, 2].

Цель контрольных карт — обнаружить неестественные изменения в данных из повторяющихся процессов и дать критерии для обнаружения отсутствия статистической управляемости. Процесс находится в статистически управляемом состоянии, если изменчивость вызвана только случайными причинами. При определении этого приемлемого уровня изменчивости любое отклонение от него считают результатом действия особых причин, которые следует выявить, исключить или ослабить [6].

Задача статистического управления процессами — обеспечение и поддержание процессов на приемлемом и стабильном уровне, гарантируя соответствие продукции и услуг установленным требованиям. Главный статистический инструмент, используемый для этого — контрольная карта, графический способ представления и сопоставления информации, основанной на последовательности выборок, отражающих текущее состояние процесса, с границами, установленными на основе внутренне присущей процессу изменчивости. Метод контрольных карт помогает определить, действительно ли процесс достиг статистически управляемого состояния на правильно заданном уровне или остается в этом состоянии, а затем поддерживать управление и высокую степень однородности важнейших характеристик продукции или услуги посредством непрерывной записи информации о качестве продукции в процессе производства. Использование контрольных карт и их тщательный анализ ведут к лучшему пониманию и совершенствованию процессов производства [1, 3, 4].

Принимая во внимание значимость обеспечения качества гриппозных вакцин как важнейшего инструмента борьбы с одной из глобальных биологических угроз, учитывая сложность стандартизации биологических лекарственных препаратов в целом и гриппозных вакцин как особенно сложных препаратов в частности, несомненно актуальной является задача по оценке эффективности применения такого элемента управления качеством, как контрольные карты. При этом анализ и управление качеством с использованием контрольных карт может осуществляться непрерывно, как в рамках процедуры выпуска серий (lot release), в соответствии с руководящими документами Всемирной организации здравоохранения [7, 8], при подтверждении соответствия в форме обязательной сертификации, так и после реализации.

Целью настоящего исследования является оценка стабильности показателей качества отечественной вакцины против гриппа на основе их ретроспективного анализа и оценка необходимости внедрения метода статистической управляемости процесса производства указанной вакцины.

В ходе проведенной работы решались следующие задачи:

- сбор и систематизация данных, полученных в ходе определения количественных показателей при проведении выпускающего контроля препарата на предприятии-изготовителе и в ходе испытаний, проведенных в аккредитованном испытательном центре;
- проведение анализа данных количественных показателей, включенных в спецификацию нормативной документации на вакцину, с помощью метода статистического управления производственного процесса;
- ретроспективный анализ наличия факторов риска, оценка трендов выхода процессов производства и контроля качества из состояния статистической управляемости.

Материалы и методы

Испытания образцов лекарственного препарата при выпускающем контроле на предприятии-производителе и в аккредитованном испытательном центре (ИЦ) проводили в соответ-

ствии с методиками, изложенными в фармакопейной статье предприятия и Государственной фармакопее Российской Федерации XIII издания.

Оценку стабильности показателей качества лекарственного препарата проводили ретроспективно и в режиме реального времени по результатам испытаний, выполненных в рамках обязательной сертификации, а также по результатам испытаний при выпускающем контроле на предприятии-производителе. Оценку стабильности показателей качества проводили в соответствии с методиками, определенными требованиями ГОСТ Р ИСО 7870-1–2011 и ГОСТ Р ИСО 7870-2–2015 [2, 9]. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics версии 20 и надстройки «Пакет анализа» MS Excel 2016.

Оценку стабильности данных проводили для результатов испытаний по 8 количественным показателям, включенным в спецификацию фармакопейной статьи предприятия (табл. 1).

Определение соответствия значений выборки нормальному распределению осуществляли с применением одновыборочного критерия Колмогорова—Смирнова и коэффициента аппроксимации линейной зависимости при сортировке значений выборки.

Проводили оценку наличия корреляционной связи между результатами испытаний по каждому показателю, проведенных при выпускающем контроле на предприятии-производителе и в аккредитованном ИЦ. Для выборок, характеризующихся нормальным распределением, рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона, при необходимости использования непараметрических методов — коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Условную силу корреляционных связей оценивали по шкале Чеддока (табл. 2). Чем больше абсолютное значение коэффициента r_{xy} , тем выше теснота связи между двумя величинами. Коэффициент $r_{xy} = 0$ свидетельствует о полном отсутствии связи; $r_{xy} = 1$ свидетельствует о наличии абсолютной (функциональной) связи. Значимой силу корреляционной связи считали при превышении величины коэффициента корреляции (r_{xy}), равной 0,4 [5].

Для полученных выборок были построены стандартные контрольные X-карты первого типа (карты контроля Шухарта по количественному признаку), которые использовали для оценки стабильности показателей качества и процессов производства в целом. Оценивали наличие признаков выхода процессов из состояния статистической управляемости, находится ли процесс под воздействием только случайных причин или имеются признаки воздействия особых, экстраординарных, неожиданных, специальных причин изменений [2, 10].

При оценке наличия признаков выхода результатов из статистически управляемого состояния коэффициент, равный ± 3 стандартных отклонения (σ), считали эмпирически применимым в целях определения контрольных границ также и для выборок, характеризующихся незначительными отклонениями от нормального распределения [11].

Оценку признаков выхода результатов из статистически управляемого состояния и наличия особых причин проводили по 8 критериям в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 7870-2–2015 (Приложение В) (рис. 1) [9].

Результаты и обсуждение

В ИЦ были проведены испытания образцов 122 серий вакцины гриппозной полимер-субъединичной инактивированной (№ 2–6, 13–129), произведенной для иммунизации населения против гриппа в течение эпидемического сезона 2017–2018 гг.,

по 8 количественным показателям, включенным в спецификацию фармакопейной статьи предприятия (табл. 1). Также проводили анализ данных производителя о результатах выпускающего контроля на предприятии, которые были представлены в паспортах на данные серии (табл. 3). Результаты испытаний образцов всех 122 серий, проведенных как на производстве, так и в ИЦ, указывают на соответствие всех показателей качества нормативным требованиям.

При оценке корреляции между результатами испытаний, полученными при выпускающем контроле на предприятии-производителе и в ИЦ, установлено, что условную значимость корреляционных связей следует оценивать как слабую (табл. 4), за исключением показателей «Белок», «Овальбумин» и «рН», для которых характерно наличие умеренной корреляции.

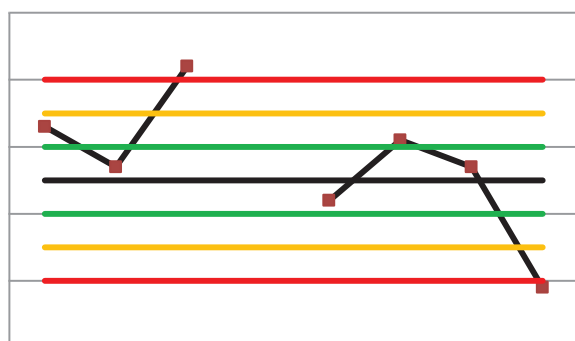
При оценке корреляции между результатами испытаний по различным показателям установлено следующее. Данные, полученные при проведении испытаний в ИЦ, позволяют оценивать значимость корреляционных связей как слабую для 12 пар показателей, как среднюю — для 14 пар, как заметную — для 2 пар показателей («Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H_1N_1)») и «Содержание антигена вируса гриппа типа В»; «Овальбумин» и «ТДАБ»), тогда как по данным, полученным производителем, слабые корреляционные связи обнаружены для 24 пар показателей, умеренные — для 3. Показатели только 1 пары показателей, «Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H_1N_1)» и «Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H_3N_2)», характеризуются наличием корреляционной связи заметной силы (табл. 5).

Таблица 1. Количественные показатели качества, включенные в спецификацию фармакопейной статьи предприятия

№ п/п	Наименование показателя	Метод
1	Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H_1N_1)	Одиночная реакция иммунодиффузии
2	Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H_3N_2)	Одиночная реакция иммунодиффузии
3	Содержание антигена вируса гриппа типа В	Одиночная реакция иммунодиффузии
4	Белок	Метод Лоури
5	Овальбумин	Иммуноферментный анализ
6	рН	Потенциометрический
7	Тиомерсал	Колориметрический
8	Тетрадецилтриметиламмония бромид (ТДАБ)	Колориметрический

Таблица 2. Шкала оценки силы корреляционных связей

Абсолютное значение коэффициента r_{xy}	Теснота (сила) корреляционной связи
<0,30	Слабая
0,31...0,50	Умеренная
0,51...0,70	Заметная
0,71...0,90	Высокая
>0,91	Весьма высокая



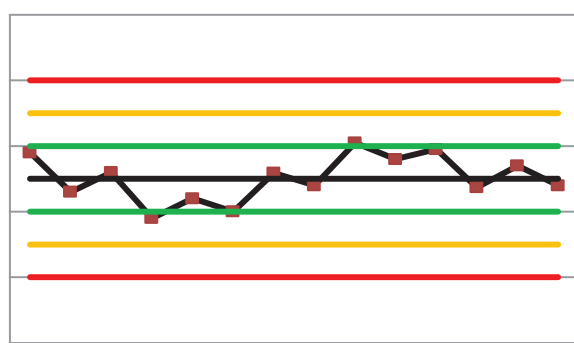
Критерий 1 (одна точка вне зоны A ($\pm 3\sigma$))



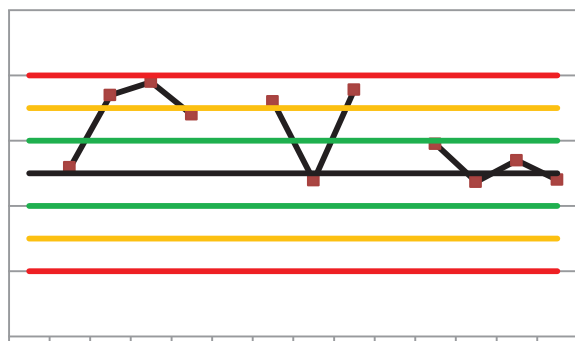
Критерий 2 (9 точек подряд в зоне C ($\pm 1\sigma$) или по одну сторону от центральной линии)



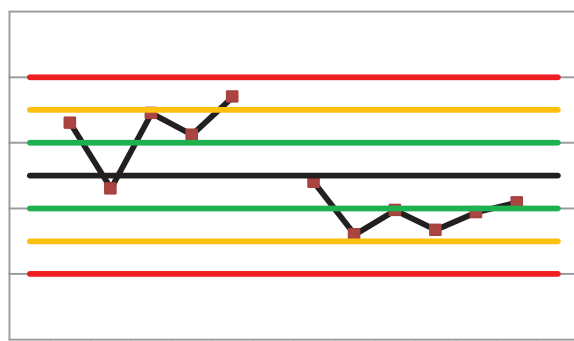
Критерий 3 (6 возрастающих или убывающих точек подряд)



Критерий 4 (14 попеременно возрастающих и убывающих точек)



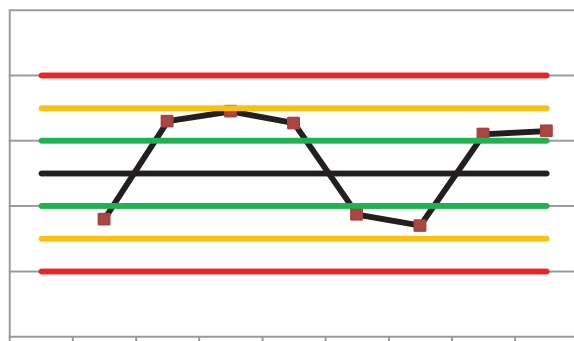
Критерий 5 (2 из 3 последовательных точек в зоне A ($\pm 3\sigma$) или вне ее)



Критерий 6 (4 из 5 последовательных точек в зоне B ($\pm 2\sigma$) или вне ее)



Критерий 7 (15 последовательных точек в зоне C ($\pm 1\sigma$), выше и ниже центральной линии)



Критерий 8 (8 последовательных точек по обеим сторонам центральной линии и ни одной в зоне C)

— $\pm \sigma$ — $\pm 2\sigma$ — $\pm 3\sigma$

Рис. 1. Критерии возможного наличия неслучайных причин изменчивости процессов.

Таблица 3. Сравнительные результаты оценки качества

№ п/п	Наименование показателя, ед. изм.	Нормативные требования	Результаты производителя			Результаты ИЦ		
			min	max	среднее	min	max	среднее
1	Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H ₁ N ₁), мкг/0,5 мл	Должен содержать гемагглютинины вируса гриппа подтипов А(H ₁ N ₁) и А(H ₃ N ₂) от 4,0 до 6,0 мкг/0,5 мл; гемагглютинины вируса гриппа типа В от 9,0 до 13,0 мкг/0,5 мл	4,2	6,0	4,98	4,8	6,0	5,44
2	Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H ₃ N ₂), мкг/0,5 мл		4,2	6,0	4,79	4,8	5,8	5,31
3	Содержание антигена вируса гриппа типа В, мкг/0,5 мл		10,1	13,0	11,35	9,6	12,6	11,36
4	Белок, мкг/мл	Не более 120 мкг/мл	67	105	88,26	60,5	100	88,20
5	Овальбумин, мкг/мл	Не более 0,1 мкг/мл	0,007	0,05	0,02	0,0002	0,015	0,004
6	рН	От 7,0 до 7,6	7,2	7,4	7,34	7,2	7,4	7,30
7	Тиомерсал, мкг/мл	От 85 до 115 мкг/мл	86	114	95,07	85	108,4	92,23
8	Тетрадецилтриметил-аммония бромид (ТДТАБ), мкг/мл	Не более 10 мкг/мл	4	7	5,48	4,3	7,3	5,97

Таблица 4. Оценка силы корреляционной связи между результатами испытаний, проведенных на предприятии и в испытательном центре

№ п/п	Наименование показателя	Коэффициент корреляции	Условная сила корреляционной связи
1	Специфическая активность (содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H ₁ N ₁))	0,14	Слабая
2	Специфическая активность (содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H ₃ N ₂))	–0,11	Слабая отрицательная
3	Специфическая активность (содержание антигена вируса гриппа типа В)	–0,05	Слабая
4	Белок	0,32	Умеренная
5	Овальбумин	–0,31	Умеренная отрицательная
6	рН	0,38	Умеренная
7	Тиомерсал	0,16	Слабая
8	Тетрадецилтриметиламмония бромид (ТДТАБ)	0,13	Слабая

Статистическую значимость различий между средними значениями оценивали с помощью t -критерия Стьюдента и U -критерия Манна—Уитни. Различия между средними значениями результатов испытаний считали статистически значимыми при $t_{\text{крит}} < t_{\text{эмп}}$ и $U_{\text{крит}} > U_{\text{эмп}}$ (табл. 6).

Статистически значимыми стали различия результатов исследований, полученных на предприятии-производителе и в ИЦ, по показателям «Специфическая активность (Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H₁N₁))», «Специфическая активность (Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H₃N₂))», «Овальбумин», «рН». При этом, если для показателя «рН» относительная величина различия среднего для выборок незначительна и не превышает 0,5 %, то для показателей «Специфическая активность (Содержание антигена вируса гриппа подтипа А

(H₁N₁))», «Специфическая активность (Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H₃N₂))» эта величина равна 9,2 и 10,8 % соответственно, а результаты по показателю «Овальбумин» отличаются более чем в 5 раз (табл. 6).

Также при сравнении результатов испытаний по показателю «Овальбумин» необходимо отметить, что для серий, выпущенных в период август–октябрь, в данных, полученных при выпускающем контроле на предприятии, отмечается устойчивый тренд на повышение среднего количества овальбумина. Подтверждением наличия повышающего тренда является величина коэффициента аппроксимации линейной зависимости, который для выборки серий, выпущенных в указанный период (август–октябрь), равен 0,49, тогда как для результатов периода начала производственного цикла, т.е. апрель–июль, не превышает 0,01 (рис. 2).

Таблица 5. Оценка силы корреляционной связи между показателями спецификации

Показатели		ДАННЫЕ ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА							
		Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H ₁ N ₁)	Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H ₃ N ₂)	Содержание антигена вируса гриппа типа В	Белок	Овальбумин	рН	Тиомерсал	Тетрадецил-триметил-аммония бромид (ТДТАБ)
ДАННЫЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H ₁ N ₁)		0,33	0,52	−0,04	0,00	0,29	0,46	0,21
	Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H ₃ N ₂)	0,57		0,22	−0,25	0,43	−0,19	0,35	0,46
	Содержание антигена вируса гриппа типа В	0,12	0,19		−0,26	−0,16	0,08	0,21	0,35
	Белок	−0,24	−0,32	0,34		0,40	−0,39	0,19	−0,40
	Овальбумин	−0,27	−0,13	−0,19	−0,09		−0,49	0,35	0,51
	рН	−0,06	0,11	−0,21	−0,06	0,33		−0,10	−0,16
	Тиомерсал	0,16	0,06	0,18	−0,06	−0,24	−0,23		0,36
	Тетрадецил-триметил-аммония бромид (ТДТАБ)	0,07	0,10	−0,09	−0,22	0,25	0,04	0,14	

Таблица 6. Статистическая значимость различий результатов испытаний

№ п/п	Наименование показателя	Результат		α	t-критерий		U-критерий	
		ИЦ	ОКК производителя		t _{крит}	t _{эмп}	U _{крит}	U _{эмп}
1	Специфическая активность (содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H ₁ N ₁))	5,44	4,98	0,01	2,81	4,13	174	112,5
2	Специфическая активность (содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H ₃ N ₂))	5,31	4,79	0,01	2,68	4,91	174	87
3	Специфическая активность (содержание антигена вируса гриппа типа В)	11,36	11,35	0,01	2,69	0,33	174	281,5
4	Белок	88,20	88,26	0,01	2,61	0,32	1307	1569,5
5	Овальбумин	0,004	0,021	0,01	2,59	19,9	1356	242,5
6	рН	7,30	7,34	0,01	2,59	6,48	1078	946,5
7	Тиомерсал	92,23	95,07	0,05	2,61	2,44	1333	1246,5
8	Тетрадецилтриметиламмония бромид (ТДТАБ)	5,97	5,48	0,05	2,01	1,57	207	221,5

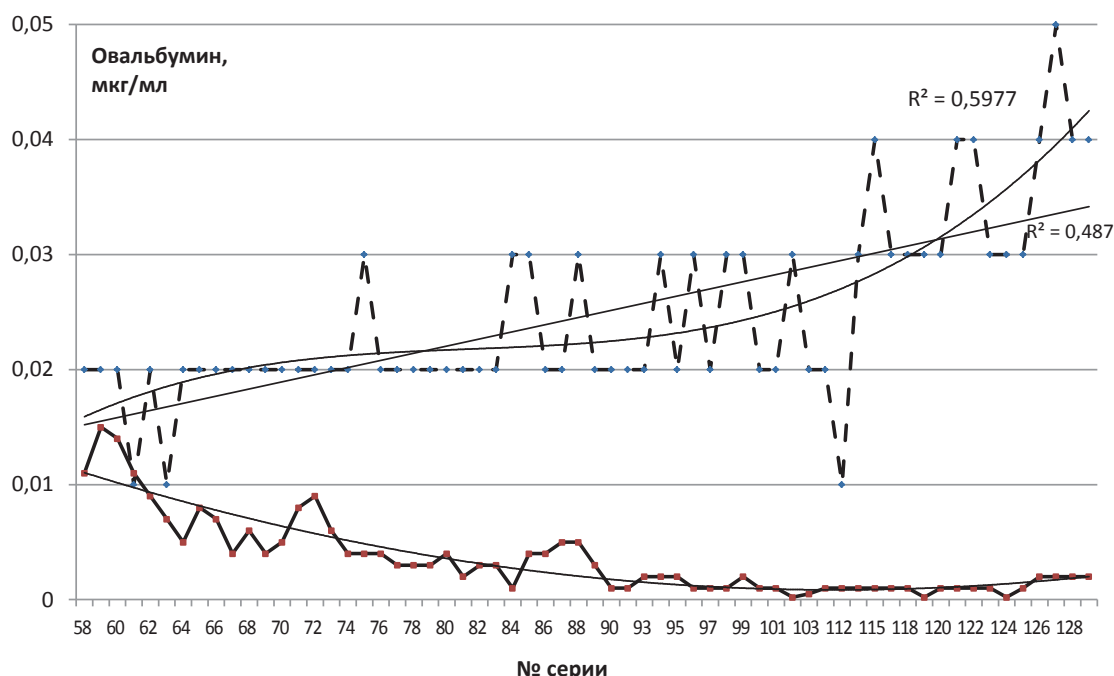


Рис. 2. Сравнительные результаты испытаний по показателю «Овальбумин» серий препарата, выпущенных в период август–октябрь 2017 г.

Таблица 7. Сравнение величины показателя стандартной ошибки (m) при выпускающем контроле и при проведении испытаний в рамках обязательной сертификации

№ п/п	Наименование показателя	Данные производителя		Данные ИЦ	
		$m_{\text{абс}}$	$m_{\text{абс}}, \%$	$m_{\text{абс}}$	$m_{\text{абс}}, \%$
1	Специфическая активность (содержание антигена вируса гриппа подтипа A (H_1N_1))	0,04	0,8	0,07	1,2
2	Специфическая активность (содержание антигена вируса гриппа подтипа A (H_3N_2))	0,04	0,8	0,06	1,0
3	Специфическая активность (содержание антигена вируса гриппа типа B)	0,05	0,5	0,19	1,7
4	Белок	0,7	0,8	1,13	1,3
5	Овальбумин	0,0007	3,5	0,0003	7,5
6	pH	0,0046	0,06	0,0047	0,06
7	Тиомерсал	0,66	0,7	0,58	0,6
8	Тетрадецилтриметиламмония бромид (ТДТАБ)	0,06	1,1	0,20	3,3

Для данной выборки также уместно построение полиномиальной линии тренда. Выбор степени полинома определяется количеством выраженных экстремумов на графике. Приняв за экстремумы (максимальные и минимальные значения) результаты испытаний, полученные для серий 112 и 127, применяли полиномиальную аппроксимацию 3-й степени. Коэффициент аппроксимации в этом случае составляет 0,60, что в еще большей степени подтверждает наличие устойчивой повышающей тенденции содержания овальбумина в препарате. Прогнозируемым результатом этой тенденции стали критические значения для четырех серий подряд (126–129), в том числе для серии 127, содержание овальбумина в которой более чем на 3σ превышает средние показатели, и для серий 126, 128, 129, показатели которых расположены в зоне A (рис. 7).

Необходимо отметить, что только для показателя «Овальбумин» наблюдается наличие отрицательной корреляции уме-

ренной силы между результатами, полученными в ИЦ и ОКК производителя (табл. 4). При этом в период август–октябрь, характеризующийся, по данным ОКК производителя, устойчивой повышающей тенденцией, корреляция усиливается до заметной, величина коэффициента корреляции достигает значения $(-0,51)$. Также примечательно, что, несмотря на максимальные для всех проанализированных показателей значения относительной стандартной ошибки (3,3...7,5 %; табл. 7), данные выборки характеризовались существенными статистически значимыми различиями, а также несовпадением трендов, что отражено на рисунке 1.

После получения и обработки результатов испытаний данные вносились в контрольные карты. Результаты анализа контрольных карт указывают на наличие значительного количества признаков выхода процесса производства готовой лекарственной формы из состояния статистической управля-

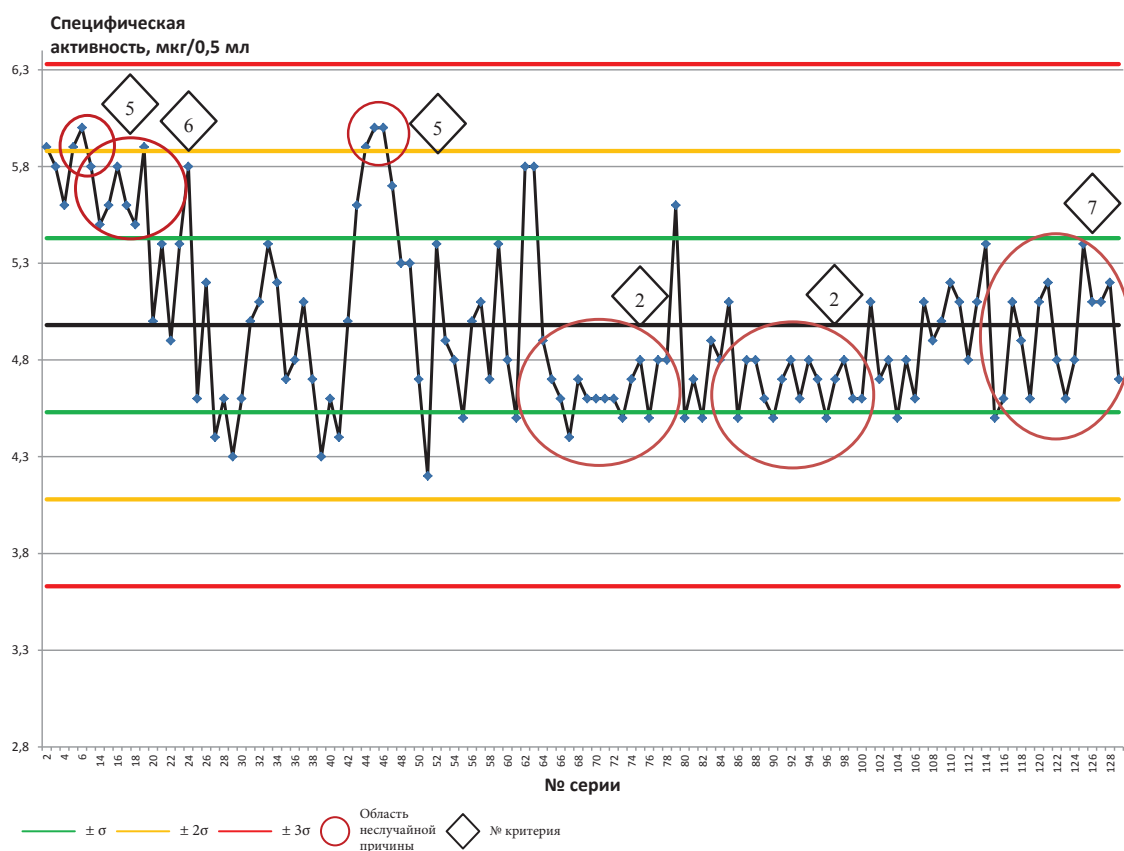


Рис. 3. Оценка стабильности показателя «Специфическая активность» (содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H_1N_1)).

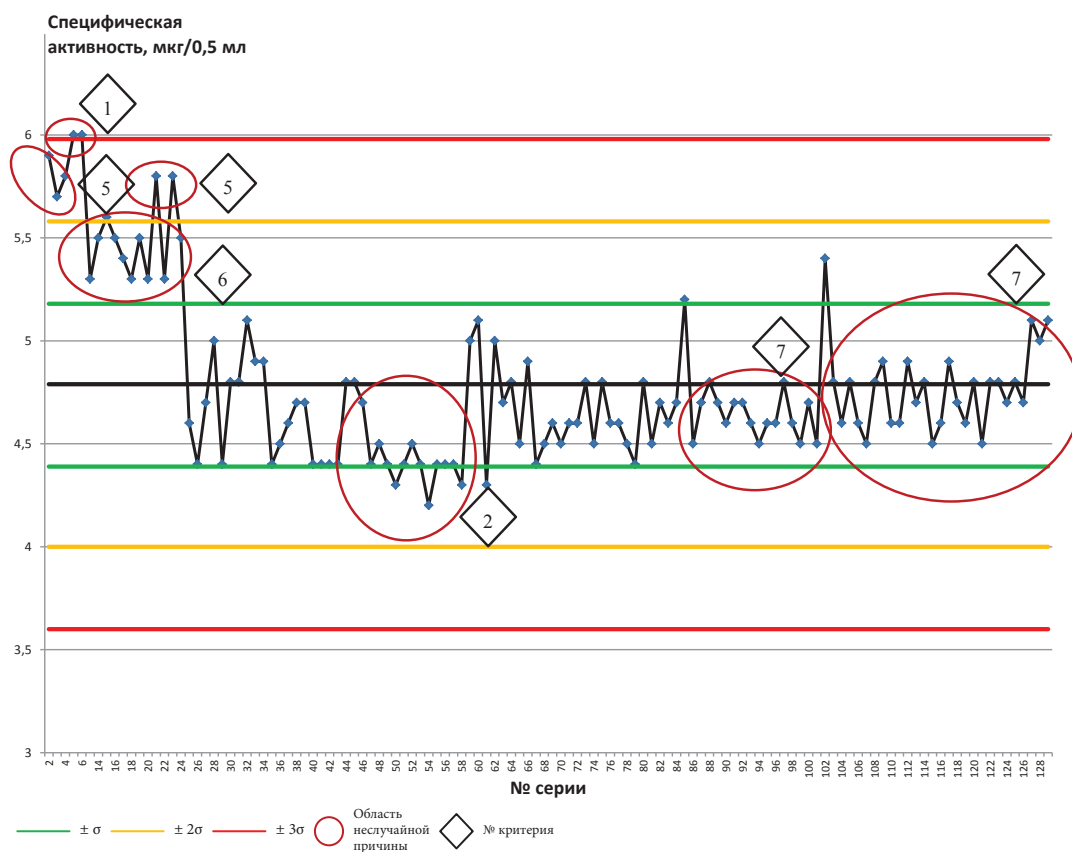


Рис. 4. Оценка стабильности показателя «Специфическая активность» (содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H_3N_2)).

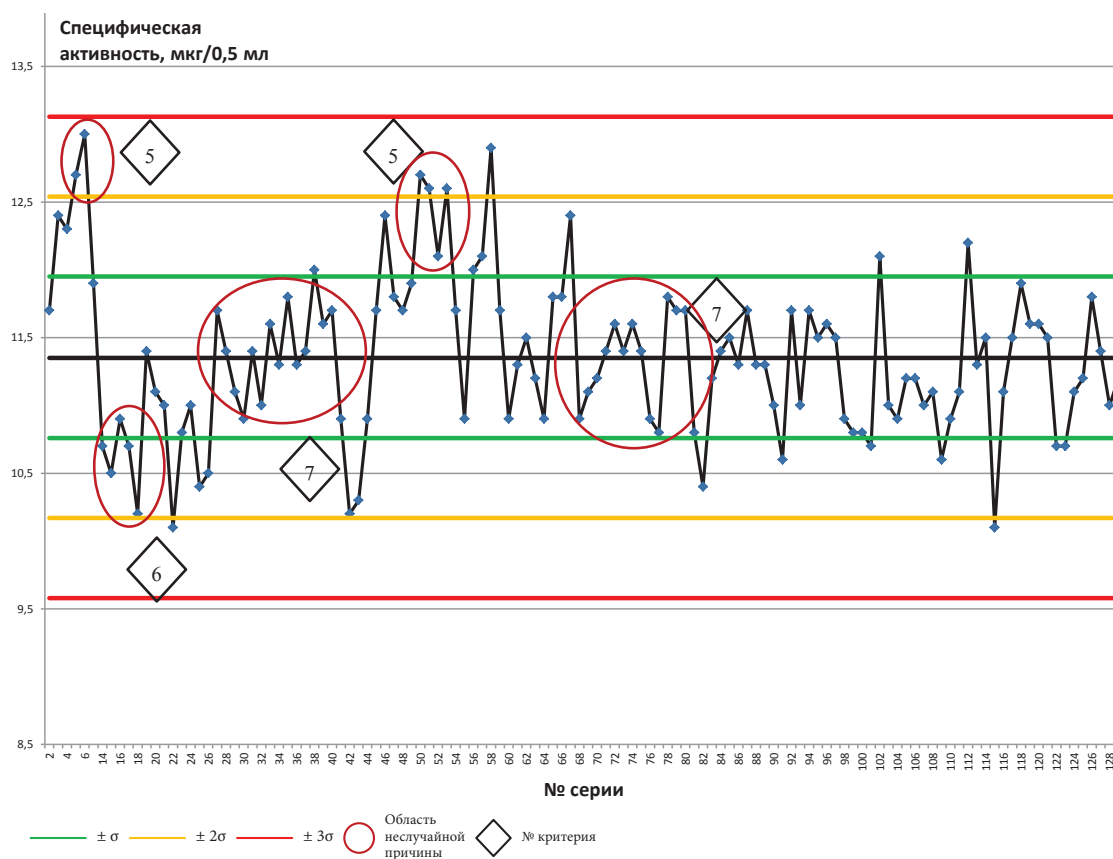


Рис. 5. Оценка стабильности показателя «Специфическая активность» (содержание антигена вируса гриппа типа В).

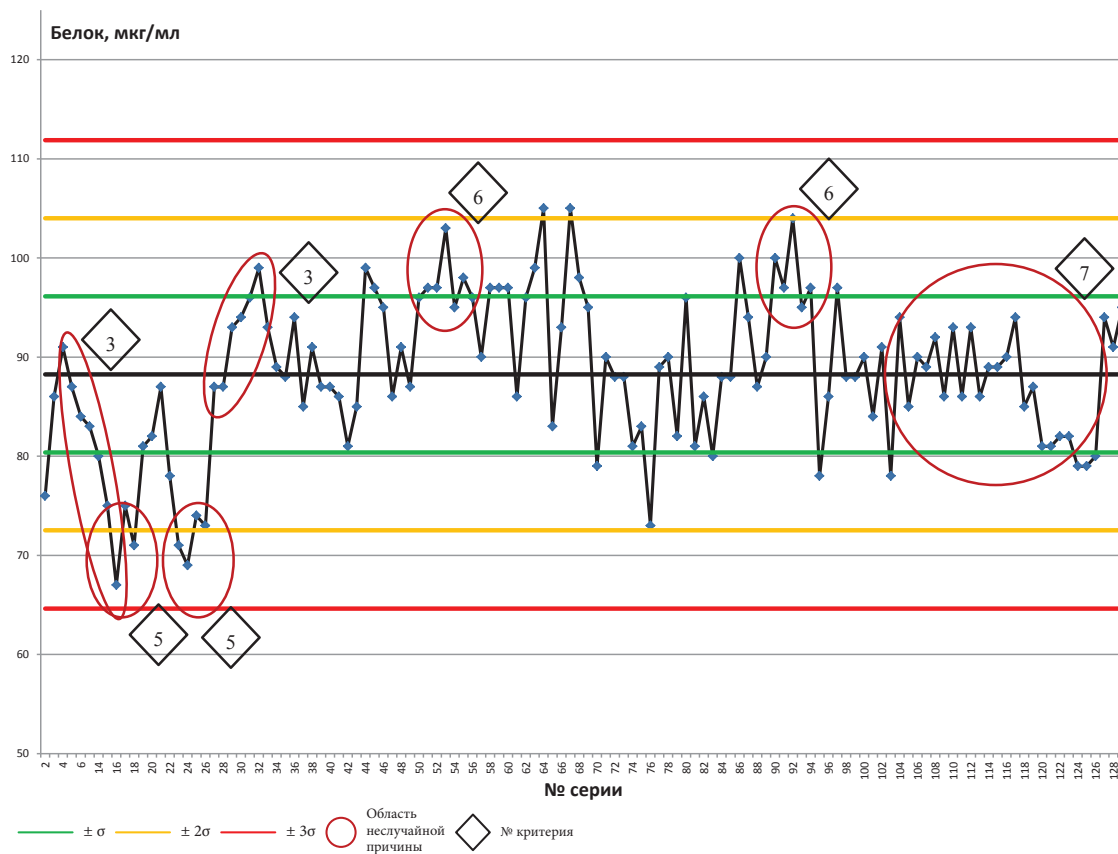


Рис. 6. Оценка стабильности показателя «Белок».

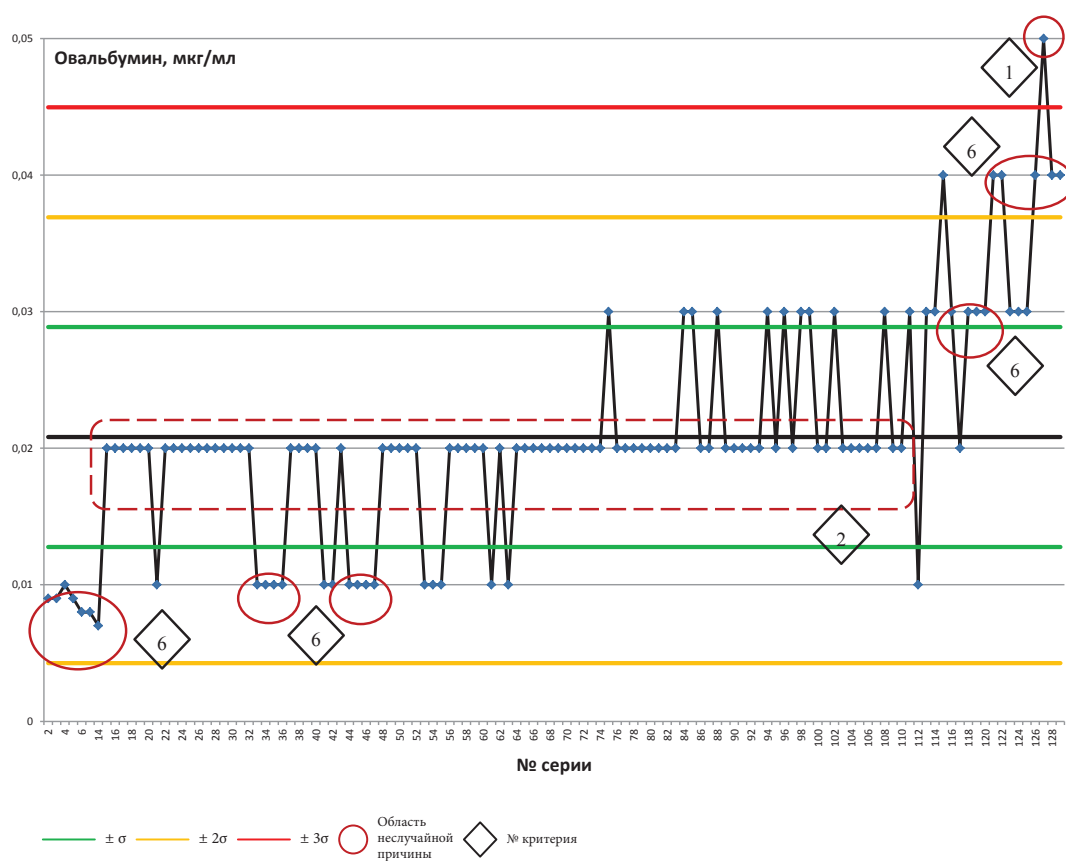


Рис. 7. Оценка стабильности показателя «Овальбумин».

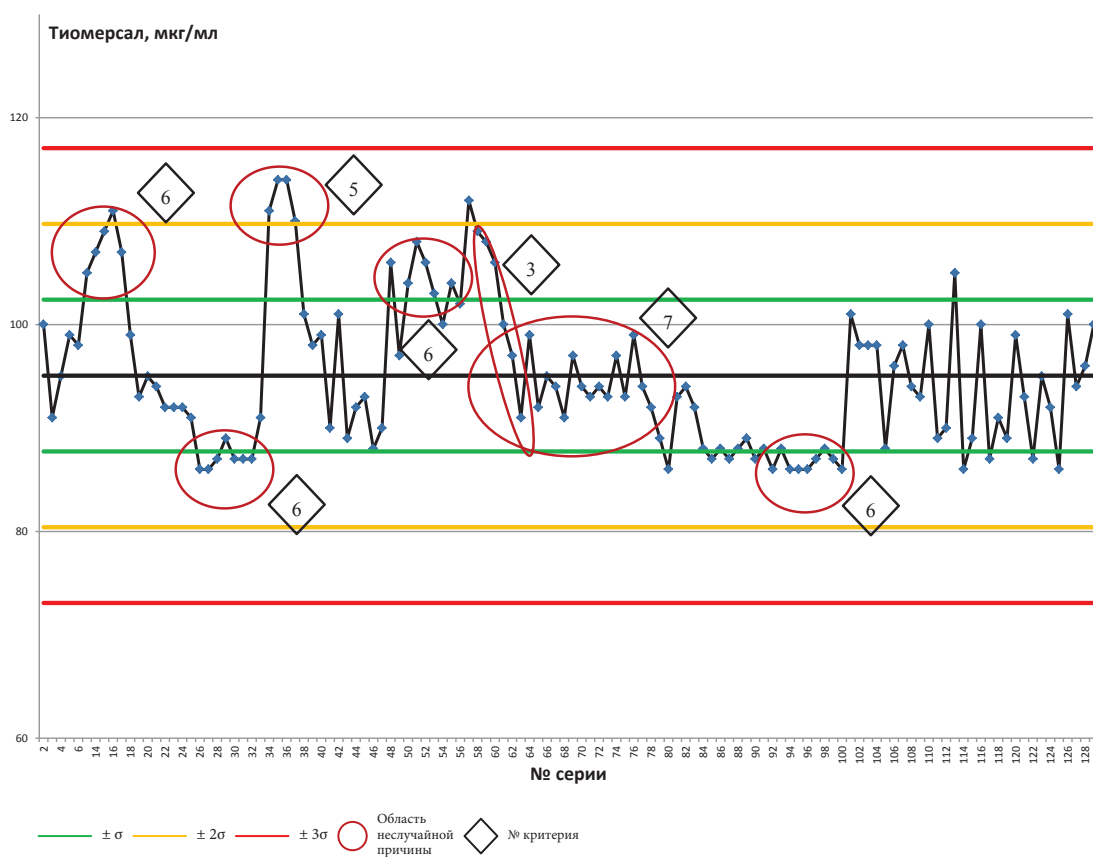


Рис. 8. Оценка стабильности показателя «Тиомерсал».

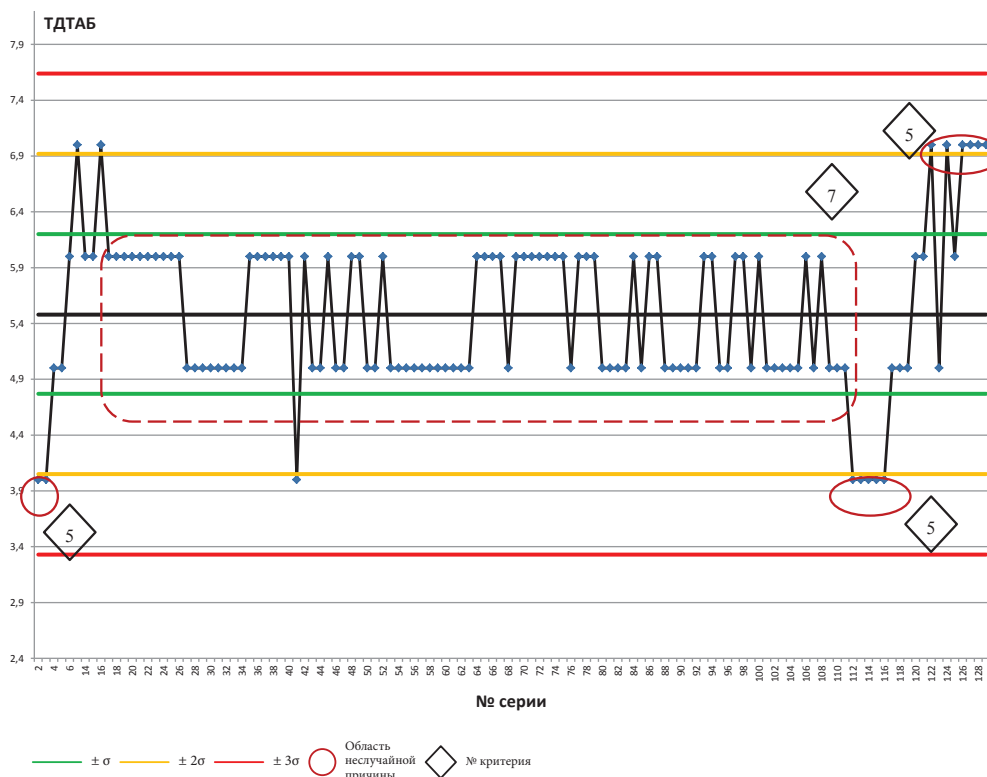


Рис. 9. Оценка стабильности показателя «Тетрадецилтриметиламмония бромид (ТДАБ)».

емости по 7 показателям, несмотря на то что результаты испытаний образцов всех серий, проведенных как на производстве, так и в ИЦ, указывают на соответствие показателей качества нормативным требованиям. Тем не менее из 122 серий, образцы которых были исследованы, наличие подобных признаков отмечалось для большинства серий, в том числе вероятное влияние особых (неслучайных) причин выявлено по следующим показателям:

- 1) «Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H1N1)» — 6 случаев, 4 критерия, 57 серий (рис. 3);
- 2) «Содержание антигена вируса гриппа подтипа А (H3N2)» — 7 случаев, 5 критериев, 73 серии (рис. 4);
- 3) «Содержание антигена вируса гриппа типа В» — 5 случаев, 3 критерия, 40 серий (рис. 5);
- 4) «Белок» — 7 случаев, 4 критерия, 50 серий (рис. 6);
- 5) «Овальбумин» — 6 случаев, 3 критерия, 25 серий (рис. 7);
- 6) «Тиомерсал» — 9 случаев, 5 критериев, 72 серии (рис. 8);
- 7) «ТДАБ» — 4 случая, 2 критерия, 14 серий (рис. 9).

Наиболее часто отмечаемыми признаками наличия особых причин стали критерий 6 (13 случаев, 81 серия), критерий 5 (13 случаев, 44 серии), критерий 7 (8 случаев, 95 серий), критерий 2 (6 случаев, 82 серии).

Также отмечались критерий 3 (3 случая, 18 серий), критерий 1 (2 случая, 3 серии). Признаки по критериям 4, 8 не отмечались.

По показателю «рН» контрольные карты оказались неинформативны. Причин этому несколько. Во-первых, при очень узком диапазоне нормативных значений (7,0...7,6) результаты исследований регистрируются с точностью не более $\pm 0,1$. Во-вторых, результаты исследований, проведенных как при выпускающем контроле на предприятии-производителе, так и в ИЦ, указывают на то, что значения по данному показателю максимально приближены к середине нормативного диапазона 7,34 и 7,30 соответственно. При этом необходимо отметить, что,

учитывая узкий диапазон нормативных требований, для получения релевантных данных для оценки статистической управляемости процессов производства лекарственного препарата данные по результатам испытаний образцов по показателю «рН», рекомендуется регистрировать с точностью не менее $\pm 0,01$. Аналогичный порядок регистрации первичных данных можно рекомендовать для показателя «Тетрадецилтриметиламмония бромид».

Отдельно следует подчеркнуть, что для 97 серий при анализе трендов признаки наличия особых причин отмечались по 2 и более критериям, для 35 серий — по 3 и более критериям. Наибольшее количество таких признаков отмечено для следующих серий:

- 5, 6 — 4 (критерии 1, 3, 5, 6)
- 27–32 — 4 (критерии 2, 3, 6, 7)
- 15, 16 — 3 (критерии 3, 5, 6)
- 21–24, 26, 46, 50–53 — 3 (критерии 2, 5, 6)
- 34–36 — 3 (критерии 5, 6, 7)
- 90–100 — 3 (критерии 2, 6, 7)
- 127 — 3 (критерии 1, 5, 7)

В целом ретроспективный статистический анализ стабильности показателей качества вакцины гриппозной инактивированной полимер-субъединичной указывает на наличие значительного количества признаков выхода процессов производства и/или процессов оценки качества из состояния статистической управляемости. Подтверждены низкие показатели тесноты корреляционных связей между результатами, полученными в ИЦ в рамках обязательной сертификации, и результатами испытаний при выпускающем контроле на предприятии-производителе, статистически значимые различия результатов испытаний по ряду показателей качества, наличие противоположенных трендов. Вероятной причиной этого могут быть различные факторы (или их сочетание), такие как, например, гетерогенность выборок, неоднородность характеристик образцов в каждой выборке и т.д.

Выводы

1. Полученные в ходе анализа данные определения количественных показателей, подтверждают необходимость постоянного мониторинга и статистического анализа тенденций (трендов) несоответствия или изменения результатов оценки качества лекарственного препарата — вакцина гриппозная инактивированная полимер-субъединичная.

2. Результаты статистического анализа должны учитываться при выборе схем подтверждения соответствия и определении показателей спецификации, по которым проводятся испытания в рамках процедуры выпуска серий (lot release), что соответствует рекомендациям Всемирной организации здравоохранения.

3. Необходима координация порядка проведения анализа качества образцов в рамках предрезервационных испытаний между производителем и организацией, уполномоченной на выпуск серий в целях оценки сходимости результатов.

4. Полученные результаты подтверждают необходимость соблюдения правил формирования выборок образцов, предусмотренных в серии технических документов Международной организации по стандартизации (ISO) серии 2859, которым соответствуют государственные стандарты Российской Федерации серии ГОСТ Р 50779, а также ISO 8422.

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

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

Литература / References

1. Акуленок МВ. Статистическое управление процессами. Ч. 2. Индикаторные показатели процессов. М.: МИЭТ; 2012. [Akulenok MV. Statistical Process Management. Part II. Process Indicators. Moscow: MIET; 2012 (in Russ.)]

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

Демидова Полина Васильевна. Микробиолог лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Мефед Кирилл Михайлович. Главный эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Давыдов Дмитрий Сергеевич. Начальник лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Саркисян Каринэ Арташесовна. Начальник лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук

Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного центра экспертизы качества, д-р мед. наук, профессор

Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, профессор

2. ГОСТ Р ИСО 7870-1-2011 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 1. Общие принципы. [State Standard R 7870-1-2011. Statistical Methods. Control Cards. Part 1. General Principles (in Russ.)]
3. ISO 2859-4:2002. Sampling Procedures for Inspection by Attributes — Part 4: Procedures for Assessment of Declared Quality Levels. Available from: <https://www.iso.org/standard/36164.html>
4. ISO 8422:2006. Sequential Sampling Plans for Inspection by Attributes. Available from: <https://www.iso.org/standard/39915.html>
5. ISO 2859-2:1985. Sampling Procedures for Inspection by Attributes — Part 2: Sampling Plans Indexed by Limiting Quality (LQ) for Isolated lot Inspection. Available from: <https://www.iso.org/standard/7867.html>
6. ISO 28590:2017. Sampling Procedures for Inspection by Attributes — Introduction to the ISO 2859 Series of Standards for Sampling for Inspection by Attributes. Available from: <https://www.iso.org/standard/64622.html>
7. Harmonized National Regulatory Authority Assessment Tool—Prototype I Version for Comments (rev. 2014). Geneva, World Health Organization. Available from: http://www.who.int/immunization_standards/national_regulatory_authorities/tools_revision_2014/en
8. Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities. Geneva, World Health Organization, 2010. Available from: http://www.who.int/biologicals/Guidelines_for_Lot_Release_AFTER_ECBS_27.1.2011.pdf
9. ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта. [State Standard R ISO 7870-2-2015. Statistical Methods. Control Charts. Part 2. Shewhart Control Charts (in Russ.)]
10. ISO 2859-3:2005. Sampling Procedures for Inspection by Attributes — Part 3: Skip-lot Sampling Procedures. Available from: <https://www.iso.org/standard/34684.html>
11. ISO 2859-1:1999. Sampling Procedures for Inspection by Attributes — Part 1: Sampling Schemes Indexed by Acceptance Quality Limit (AQL) for Lot-by-Lot Inspection. Available from: <https://www.iso.org/standard/1141.html>

Authors

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

Polina V. Demidova. Microbiologist of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality

Kirill M. Mefed. Chief Expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Dmitry S. Davydov. Head of the Laboratory of Bacteriophages and Normal Flora Preparations with a Collection of Microorganisms of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Karine A. Sarkisyan. Head of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences

Artashes A. Movsesyants. Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Medical Sciences, Professor

Vadim A. Merkulov. Deputy Director-General for Medicinal Products' Evaluation. Doctor of Medical Sciences, Professor

Поступила 20.03.2018

Принята к публикации 26.04.2018

Received 20 March 2018

Accepted 26 April 2018



Вячеслав Дмитриевич Мосягин (к 55-летию со дня рождения)

Vyacheslav Dmitriyevich Mosyagin (on the 55th Anniversary)

21 июня 2018 года исполнилось 55 лет со дня рождения доктора медицинских наук, профессора, начальника управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Вячеслава Дмитриевича Мосягина.

Жизненный путь В.Д. Мосягина неразрывно связан с медициной, образованием и наукой. После окончания Военно-медицинского факультета при Горьковском государственном медицинском институте в 1986 г. он проходил военную службу в частях и учреждениях Минобороны России на офицерских должностях старшего врача-специалиста санитарно-эпидемиологической лаборатории дивизии, врача-специалиста, заместителя начальника, начальника санитарно-эпидемиологического отряда общевойсковой армии, главного государственного санитарного врача общевойсковой армии. Принимал непосредственное участие в медицинском обеспечении войск в районах чрезвычайных ситуаций и боевых действий.

В 2000 г. В.Д. Мосягин с золотой медалью окончил факультет руководящего медицинского состава Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова по специальности «Эпидемиология, военное и административное управление».

Дальнейшая военная служба В.Д. Мосягина была связана с педагогической и научной деятельностью. В Государственном институте усовершенствования врачей Минобороны России в период с 2000 по 2011 г. он последовательно занимал должности старшего преподавателя, доцента, начальника кафедры военной эпидеми-

ологии и военной гигиены. В этот период В.Д. Мосягин активно проводил научные исследования по актуальным проблемам медицинского обеспечения личного состава Вооруженных сил. В 2003 г. он защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, посвященную вопросам совершенствования профилактики внебольничных пневмоний в воинских коллективах. В 2009 г. В.Д. Мосягину присуждена ученая степень доктора медицинских наук по проблеме обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия воинских контингентов при размещении в полевых условиях. В 2006 г. ему было присвоено ученое звание доцента, а в 2010 г. — профессора.

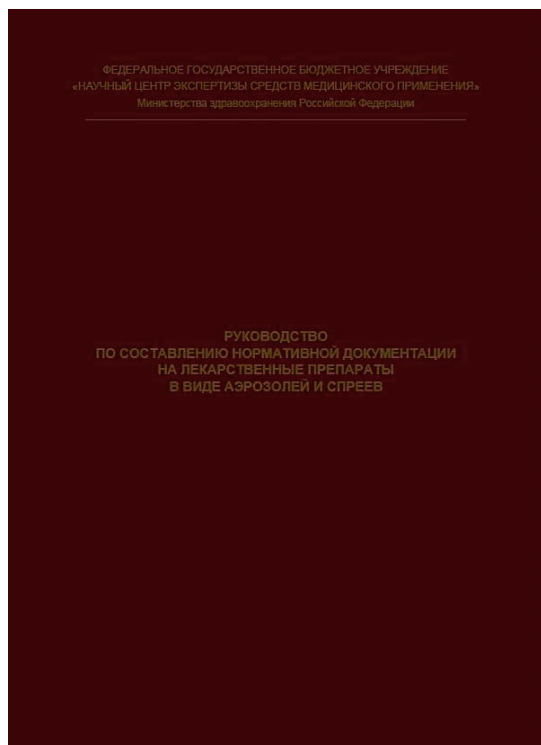
Военную службу В.Д. Мосягин закончил в марте 2011 г. в звании «полковник медицинской службы».

С апреля 2011 г. по настоящее время В.Д. Мосягин работает в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Основными направлениями его деятельности являются экспертиза эффективности и безопасности биологических лекарственных препаратов и участие в проведении научных исследований по обоснованию перспективных направлений совершенствования иммунобиологических лекарственных препаратов.

В.Д. Мосягин — член редколлегии журнала «БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение». Является автором и соавтором более 170 научных работ, в том числе 1 монографии, 12 руководств, 4 учебно-методических пособий, 6 методических рекомендаций.

В.Д. Мосягин — ветеран боевых действий, награжден орденом Почета, медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени (с мечами), а также ведомственными наградами Министерства обороны.

ОПУБЛИКОВАННЫЕ ИЗДАНИЯ ФГБУ «НЦЭСМП» МИНЗДРАВА РОССИИ



Руководство по составлению нормативной документации на лекарственные препараты в виде аэрозолей и спреев. — М.: ООО «Типография «Миттель Пресс», 2017. — 76 с.

Целью разработки настоящего руководства является совершенствование подходов к стандартизации препаратов в лекарственных формах «Спреи» и «Аэрозоли», повышение требований к их качеству, унификация изложения разделов нормативной документации на отечественные и зарубежные лекарственные средства.

В руководстве приведены общие требования к аэрозолям для ингаляции.

Руководство по составлению нормативной документации на препараты в лекарственных формах для парентерального применения. — М.: ООО «Типография «Миттель Пресс», 2017. — 88 с.

Настоящее руководство устанавливает общие требования к составлению, изложению и оформлению нормативной документации на препараты в жидких и твердых лекарственных формах для парентерального применения.

Руководство предназначено для экспертов, осуществляющих экспертизу качества лекарственных средств в рамках государственной регистрации, а также для специалистов, занятых в области производства и регистрации лекарственных средств.



Информацию о порядке приобретения можно получить по телефонам:
+7 (499) 241-90-73, +7 (499) 241-36-85
или на официальном сайте ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России www.regmed.ru



Оформить подписку на журнал
«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»
можно в любом почтовом отделении России.

Подписной индекс издания:
в каталоге Агентства «Роспечать» «Газеты. Журналы» – **25120**

С любого номера в региональных агентствах подписки:

Урал-Пресс (www.ural-press.ru)
Информнаука (www.informnauka.ru)

По объединенному каталогу
«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) – **Ц10588**

