

БИО ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

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

Том 21, № 1
Январь — март 2021



Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment

В НОМЕРЕ

Коклюшные вакцины и роль липоолигосахарида *Bordetella pertussis* в иммунном ответе на коклюшную инфекцию и вакцинацию

Изучение биологических свойств штаммов *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* в качестве кандидатов для включения в состав вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой для людей

Архив журнала размещен в российских и международных реферативных и индексных базах данных: Chemical Abstracts (CAS), Embase, каталог Национальной Медицинской Библиотеки США (NLM каталог), Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), КиберЛенинка, Российская государственная библиотека, Академия Google (Google Scholar) и др.

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

Пятилетний импакт-фактор РИНЦ — 0,520.

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

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

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

Материалы заочных конференций не публикуются.

Воспроизведение или использование другим способом любой части издания без ссылки на журнал является незаконным и влечет за собой ответственность, установленную действующим законодательством Российской Федерации.

ISSN 2221-996X (Print)
ISSN 2619-1156 (Online)

БИО ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

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

Том 21, № 1
Январь — март 2021

BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie
[BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]

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

Volume 21, No. 1
January — March 2021

«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 публикуются статьи по вопросам разработки, стандартизации, контроля качества, производства, регистрации и применения биологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов; профилактики, диагностики и лечения инфекционных, аллергических и иммунопатологических процессов; разработки, совершенствования и применения новых технологий с целью получения медицинских биологических препаратов.

В журнале публикуются обзорные и оригинальные статьи, область исследований которых соответствует медицинской и биологической отраслям науки и научным специальностям: **03.01.00 Физико-химическая биология** (03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.01.07 Молекулярная генетика, 03.01.08 Биоинженерия); **14.01.00 Клиническая медицина** (14.01.08 Педиатрия, 14.01.09 Инфекционные болезни, 14.01.16 Фтизиатрия); **14.03.00 Медико-биологические науки** (14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология, 14.03.07 Химиотерапия и антибиотики, 14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология, 14.03.10 Клиническая лабораторная диагностика).



Л. А. Тарасевич

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Амвросьева Тамара Васильевна, д-р мед. наук, проф., РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Республика Беларусь)

Бакулин Михаил Константинович, д-р мед. наук, проф., филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф., ФМБА России (Москва, Россия)

Дармов Илья Владимирович, д-р мед. наук, проф., филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)

Дегтярев Сергей Харитонович, д-р биол. наук, проф., НПО «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия)

Иванов Вячеслав Борисович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Москва, Россия)

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Мосягин Вячеслав Дмитриевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Пашенко Юрий Иванович, д-р биол. наук, проф., ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Токарев Николай Константинович, д-р мед. наук, проф., ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург, Россия)

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф., ООО «МБЦ «Генериум» (Вольгинский, Владимирская область, Россия)

Чумаков Константин Михайлович, д-р биол. наук, Центр оценки и изучения биологических препаратов, FDA (Силвер-Спринг, Мэриленд, США)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Климов Владимир Иванович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКТОР ПЕРЕВОДА

Губарева Ольга Николаевна, канд. филол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Брико Николай Иванович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Дятлов Иван Алексеевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Московская область, Россия)

Зверев Виталий Васильевич, д-р биол. наук, проф., академик РАН, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Кутырев Владимир Викторович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов, Россия)

Львов Дмитрий Константинович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Медуницын Николай Васильевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Михайлов Михаил Иванович, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва, Россия)

Покровский Валентин Иванович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва, Россия)

Савченко Валерий Григорьевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Учайкин Василий Федорович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, Ассоциация педиатров-инфекционистов (Москва, Россия)

Хайтов Рахим Мусаевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва, Россия)

НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Лебединская Елена Владимировна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКТОР

Шестакова Алина Павловна, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment is a journal published by the Federal State Budgetary Institution Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation. It was founded in 2001 as a scientific journal of L. A. Tarasevich State Scientific Research Institute for Standardisation and Control of Biological Products. The journal covers such issues as development, standardisation, quality control, production, authorisation, and use of biological products and biomedical cell products; prevention, diagnosis, and treatment of infectious diseases, allergic diseases, and immunopathological conditions; development, improvement, and use of new technologies for the production of biological products.

The journal publishes original research articles and reviews pertaining to biological and medical areas of research and one of the following specialist fields: **03.01.00 Physicochemical biology** (03.01.06 Biotechnology (including bionanotechnology), 03.01.07 Molecular genetics, 03.01.08 Bioengineering); **14.01.00 Clinical Medicine** (14.01.08 Pediatrics, 14.01.09 Infectious diseases, 14.01.16 Phthiology); **14.03.00 Medical and Life Sciences** (14.03.06 Pharmacology, clinical pharmacology, 14.03.07 Chemotherapy and antibiotics, 14.03.09 Clinical immunology, allergology, 14.03.10 Clinical pathology).

EDITOR-IN-CHIEF

Yuri V. Olefir, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate,
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITORS-IN-CHIEF

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Zhanna I. Avdeeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Tamara V. Amvrosyeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (Minsk, Republic of Belarus)

Mikhail K. Bakulin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal Medical Biological Agency of Russia (Moscow, Russia)

Ilya V. Darmov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Sergey Kh. Degtyarev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., SibEnzyme Ltd (Novosibirsk, Russia)

Vyacheslav B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Chumakov FSC R&D IBP RAS (Moscow, Russia)

Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vyacheslav D. Mosyagin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Yuri I. Pashchenko, Dr. Sci. (Biol.), Prof., 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Oblast, Russia)

Nikolay K. Tokarevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint-Petersburg Pasteur Institute (Saint-Petersburg, Russia)

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., International Biotechnology Center "Generium" (Volginsky, Vladimir Oblast, Russia)

Konstantin M. Chumakov, Dr. Sci. (Biol.), PhD, Center for Biologics Evaluation and Research, FDA (Silver Spring, Maryland, USA)

EXECUTIVE EDITOR

Vladimir I. Klimov, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

TRANSLATION EDITOR

Olga N. Gubareva, Cand. Sci. (Philology), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Corr. Member of RAS, 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Oblast, Russia)

Nikolay I. Briko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya FRCM (Moscow, Russia)

Ivan A. Dyatlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, FBIS SRCAMB (Obolensk, Moscow Oblast, Russia)

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Vladimir V. Kutyrev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (Saratov, Russia)

Dmitry K. Lvov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya FRCM (Moscow, Russia)

Nikolay V. Medunitsyn, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Mikhail I. Mikhaylov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

Valentin I. Pokrovsky, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Central Research Institute for Epidemiology (Moscow, Russia)

Valery G. Savchenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia)

Vasily F. Uchaykin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Association of Pediatric Infectiologists of Russia (Moscow, Russia)

Rakhim M. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, NRC Institute of Immunology (Moscow, Russia)

SCIENCE EDITORS

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Elena V. Lebedinskaya, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITOR

Alina P. Shestakova, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

СОДЕРЖАНИЕ

Редакционная статья

К 20-летию журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» 6

Обзоры

Коклюшные вакцины и роль липоолигосахарида *Bordetella pertussis* в иммунном ответе на коклюшную инфекцию и вакцинацию
И. А. Алексеева, О. В. Перелыгина, Е. Д. Кольшикина 10

Общая характеристика адъювантов и механизм их действия (часть 2)
Н. А. Алпатова, Ж. И. Авдеева, С. Л. Лысикова, О. В. Головинская, Л. А. Гайдерова, В. П. Бондарев 20

Современная ситуация по заболеваемости отдельными клостридиальными инфекциями: газовая гангрена и столбняк
Е. И. Комаровская, О. В. Перелыгина 31

Лекарственные препараты фактора VIII, актуальные вопросы разработки, клинического исследования и применения (часть 1)
Ж. И. Авдеева, А. А. Солдатов, В. П. Бондарев, В. Д. Мосягин, В. А. Меркулов 39

Оригинальные статьи

Сравнительная оценка использования моно- и поликлональных антител при определении подлинности различных лекарственных средств на основе интерферона альфа-2b
Л. А. Гайдерова, Ю. Н. Лебедева, Т. Н. Лобанова, Е. А. Лукинова 50

Изучение биологических свойств штаммов *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* в качестве кандидатов для включения в состав вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой для людей
А. А. Троценко, М. В. Коврижко, Э. А. Яговкин, В. С. Ванжа, А. А. Решетов 64

Журнал «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций

Свидетельство ПИ № ФС77-53128 от 14 марта 2013 г.

Учредитель: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

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

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» — Т57941,
агентства «Урал-Пресс» — 57941. Тираж 100 экз. Цена свободная

Издатель ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

ООО «Типография Сити Принт»: 129226, Москва, ул. Докукина, д. 10, стр. 41

Подписано в печать: 05.03.2021

<https://www.biopreparations.ru>, e-mail: biopreparaty@expmed.ru

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

CONTENTS

Editorial Article

To the 20th anniversary of the journal *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 6

Reviews

Pertussis vaccines and the role of *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide in the immune response to pertussis infection and vaccination
I. A. Alekseeva, O. V. Perelygina, E. D. Kolyshkina. 10

General characteristics of adjuvants and their mechanisms of action (part 2)
N. A. Alpatova, Zh. I. Avdeeva, S. L. Lysikova, O. V. Golovinskaya, L. A. Gayderova, V. P. Bondarev 20

Current incidence of certain clostridial infections: gas gangrene and tetanus
E. I. Komarovskaya, O. V. Perelygina 31

Factor VIII products: key aspects of development, clinical research and use (part 1)
Zh. I. Avdeeva, A. A. Soldatov, V. P. Bondarev, V. D. Mosyagin, V. A. Merkulov. 39

Original articles

Comparative evaluation of mono- and polyclonal antibodies used in identification of interferon alpha-2b products
L. A. Gayderova, Yu. N. Lebedeva, T. N. Lobanova, E. A. Lukinova. 50

Study of biological properties of *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strains as candidate components of human leptospirosis concentrated inactivated vaccine
A. A. Trotsenko, M. V. Kovrizhko, E. A. Yagovkin, V. S. Vanzha, A. A. Reshetov. 64

Journal *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* is registered
in the Federal Service for Supervision of Communications,
Information Technologies and Mass Communications

Certificate PI No. FS77-53128 dated 14 March 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 of the founder and editorial office: 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

Subscription codes are provided in the catalogues of Pressa Rossii—T57941
and Ural-Press agency—57941. Print run: 100 copies. Free price

Publisher NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114

Printing office City Print LLC: 10/41 Dokukin St., Moscow 129226

Passed for printing: 5 March 2021

<https://www.biopreparations.ru>, e-mail: biopreparaty@expmed.ru

К 20-летию журнала

«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»

To the 20th anniversary of the journal

BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment

В 2021 г. исполняется 20 лет с начала выпуска научно-практического журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», учредителями которого изначально выступали ООО «Центр иммунопрофилактики МЕДЭП» и РПО «Гелла-Принт», а с 2012 г. — ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Журнал «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» был предназначен для публикации результатов научно-исследовательских работ сотрудников ГИСК им. Л. А. Тарасевича, а также представителей производств биологических лекарственных препаратов, специалистов в сфере разработки, испытания, контроля и применения иммунобиологических лекарственных препаратов с целью профилактики, диагностики и лечения заболеваний человека.

В настоящее время в журнале освещаются передовые достижения по вопросам разработки доклинических и клинических исследований, стандартизации, контроля качества, производства, регистрации и применения биологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов; профилактики, диагностики и лечения инфекционных, аллергических и иммунопатологических процессов; разработки, совершенствования и применения новых технологий с целью получения медицинских биологических препаратов. В журнале публикуются статьи, область исследований которых соответствует следующим группам специальностей — физико-химическая биология, клиническая медицина, медико-биологические науки¹. Журнал «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» является одним из профильных российских научных изданий по данным направлениям научно-практической деятельности. Он имеет большое значение не только для субъектов сферы обращения лекарственных средств, но и для широкого круга специалистов, интересующихся данными проблемами.

Со дня организации до 2010 г. главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» был один из ведущих российских специалистов в области иммунологии и аллергологии, директор ГИСК им. Л. А. Тарасевича, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Н. В. Медунин, с 2010 по 2011 г. — директор ГИСК им. Л. А. Тарасевича, доктор медицинских наук, профессор И. В. Борисевич, с 2012 по 2015 г. — генеральный директор ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор А. Н. Миронов, с 2015 г. по настоящее время — исполняющий обязанности генерального директора ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, заслуженный врач Российской Федерации, доктор медицинских наук Ю. В. Олефир.

¹ 03.01.00 Физико-химическая биология: 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) (биологические науки), 03.01.07 Молекулярная генетика (биологические науки), 03.01.08 Биоинженерия (биологические науки); 14.01.00 Клиническая медицина: 14.01.08 Педиатрия (медицинские науки), 14.01.09 Инфекционные болезни (медицинские науки), 14.01.16 Фтизиатрия (медицинские науки); 14.03.00 Медико-биологические науки: 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология (медицинские, биологические науки), 14.03.07 Химиотерапия и антибиотики (медицинские, биологические науки), 14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология (медицинские, биологические науки), 14.03.10 Клиническая лабораторная диагностика (медицинские, биологические науки).



Составы редакционной коллегии и редакционного совета журнала также периодически изменялись. На протяжении 20 лет существования журнала в состав редакционной коллегии неизменно входили доктор медицинских наук, профессор А. А. Мовсесянц, доктор медицинских наук, профессор Г. М. Игнатьев, доктор медицинских наук, профессор М. С. Воробьева, в состав редакционного совета — академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Д. К. Львов, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор В. И. Покровский, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор В. Ф. Учайкин, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Р. М. Хаитов.

В качестве ответственного секретаря редколлегии журнала в разные периоды работали: кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Р. А. Озерецковский (2001–2004 гг.), доктор биологических наук, старший научный сотрудник

Р. А. Волкова (2004–2007 гг.), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Т. И. Немировская (2007–2010 гг.), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник М. В. Супотницкий (2010–2015 гг.). С 2015 г. по настоящее время ответственным секретарем является кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник В. И. Климов.

На протяжении существования журнала менялся его внешний вид и рубрикатор. До 2013 г. в журнале сохранялись такие разделы, как «Обзоры», «Проблемные статьи», «Особое мнение», в которых были представлены результаты анализа состояния научных и практических проблем по актуальным направлениям вакцинологии. Существовали такие рубрики, как «Обмен опытом», «Случаи из практики», «Вопросы и ответы», «Знаменательные даты». В настоящее время основными разделами журнала являются «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Дискуссионные статьи», «Методические материалы», а также «Редакционная статья», «Хроника», «Эратум».

В журнале изменялись и совершенствовались Правила для авторов, отражающие основные требования к содержанию и оформлению рукописей статей. В настоящее время в основе Правил лежат международные нормативные документы², регламентирующие все этапы формирования выпуска научного издания. Соответствие современным требованиям соблюдения биоэтики является основным условием публикации в журнале результатов исследований, объектом которых являлись люди или животные.

В 2010 г. в журнале «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» был разработан и введен порядок процесса рецензирования поступающих в редакцию рукописей, который применяется по настоящее время. Именно наличие процедуры предварительного рецензирования рукописи позволяет считать журнал научным³. Все рукописи проходят обязательное двустороннее анонимное («двойное слепое») рецензирование, то есть оно осуществляется конфиденциально как для авторов, так и для рецензентов. Редакцией разработана и используется по настоящее время установленная форма рецензии, содержащая вопросы, ответы на которые позволяют рецензенту выявить достоинства и недостатки представленной рукописи, отметить основные замечания, предоставить рекомендации авторам. Рецензирование рукописей статей осуществляется членами редакционной коллегии, редакционного совета журнала, а также внешними рецензентами — российскими и зарубежными высококвалифицированными специалистами (экспертами) в соответствующей отрасли (медицинские, биологические науки). К настоящему времени сформирована база рецензентов по соответствующим научным направлениям. Тем не менее редакция продолжает осуществлять поиск новых специалистов для рецензирования в связи с расширением тематики поступающих рукописей. Каждая рукопись, поступившая в редакцию журнала, направляется на рецензирование двум рецензентам. В случае получения противоречивых заключений от рецензентов редакция привлекает дополнительных рецензентов, иногда количество раундов рецензирования достигает 5–6. Важно отметить, что критические замечания рецензентов позволяют повысить научный уровень изначально поступившей в редакцию рукописи. Ежегодно в работе над журналом принимают участие более 80 авторов и свыше 60 рецензентов. С сентября 2019 г. работа рецензентов учи-

тывается Научной электронной библиотекой, поскольку все рецензии загружаются в РИНЦ (в закрытом доступе) и фиксируются в профиле ученого.

В рамках реализации стратегии развития журнал «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» приведен в соответствие с рекомендациями Ассоциации научных редакторов и издателей (АНРИ), European Association of Science Editors (EASE), требованиями международных и российских баз данных и индексов научного цитирования.

С 2010 г. журнал «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» представляется в сети Интернет (www.biopreparaty-magazine.ru, https://www.regmed.ru/content/page/SCIENCE_AcademicJournal_RUS), с 2018 г. — имеет новый двуязычный сайт (www.biopreparations.ru на платформе Elpub). С момента создания журнала редакция придерживается политики открытого доступа. На сайте журнала в свободном доступе размещены метаданные статей, сведения об авторах, а также файлы статей в формате pdf, доступные для скачивания и ознакомления. С начала работы нового сайта активно функционирует система электронной редакции журнала, основанная на международных стандартах работы научных изданий и позволяющая онлайн взаимодействовать с авторами, рецензентами, редактором перевода, управлять подписками, публиковать новые выпуски. Все рукописи, поступающие в редакцию журнала, проходят проверку в системе «Антиплагиат». При обнаружении в тексте неправомерных заимствований и самоплагата рукописи отклоняются редакцией. Сформированы новые разделы политики журнала: политика свободного доступа, архивация, индексирование, этика научных публикаций, политика раскрытия и конфликты интересов, заимствования и плагиат и др. Соответственно изменились требования редакции к структуре и оформлению обзоров и оригинальных статей, а именно в статьях добавлены новые разделы: «Вклад авторов», «Благодарности», «Конфликт интересов», которые представляются на русском и английском языках.

Коллектив редакции, редакционная коллегия журнала постоянно ведут работу по его совершенствованию, развитию и продвижению. Архивы журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещаются в каталоге Национальной медицинской библиотеки США (NLM каталог), с 2013 г. — в Научной электронной библиотеке (eLIBRARY.RU) — крупнейшем российском информационно-аналитическом портале в области науки, технологии, медицины и образования. В настоящее время (по данным 2021 г.) журнал занимает 6-е место в рейтинге Science Index за 2019 г. по тематике «Биотехнология» и 154-е место по тематике «Медицина и здравоохранение».

Важно отметить, что с каждым годом в редакцию журнала поступает все большее количество статей из сторонних организаций (рис. 1). За последние 10 лет наблюдается увеличение количества цитирующих публикаций в 4 раза (рис. 2, 3), что, несомненно, свидетельствует о растущем интересе читателей к тематике публикуемых в журнале статей. По данным РИНЦ, суммарное число цитирований журнала составляет 1423 (на февраль 2021 г.).

С 2018 г. архивы журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещаются в российских и международных реферативных базах научного цитирования — «КиберЛенинке», «Соционете», Российской государственной

² CSE's White Paper on Promotion Integrity in Scientific Journal Publications, 2012 Update.

ICMJE Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals, December 2019.

³ Методические рекомендации по подготовке и оформлению научных статей в журналах, индексируемых в международных наукометрических базах данных, М.: АНРИ; 2017.

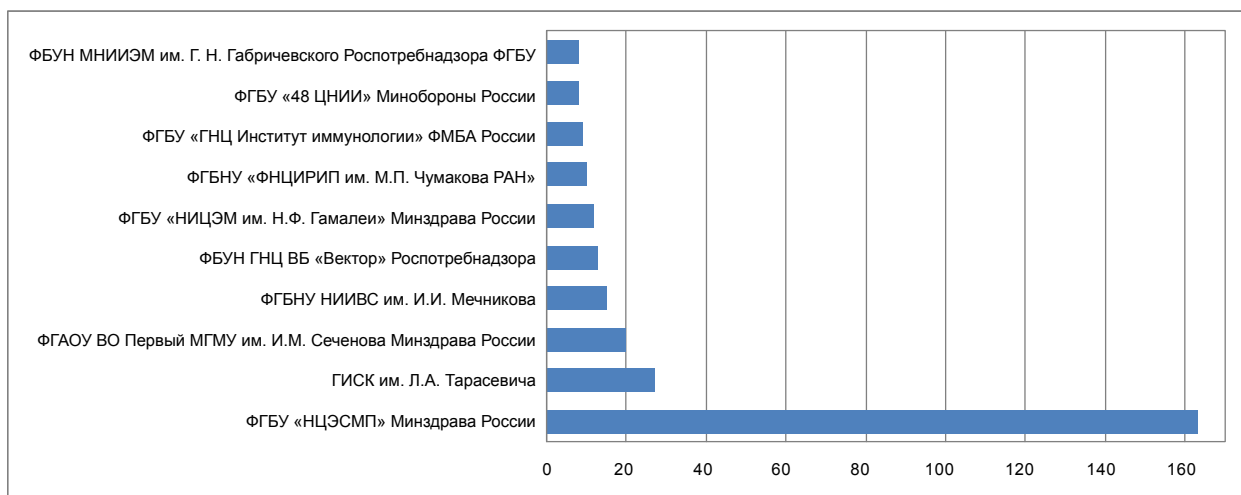


Рис. 1. Распределение публикаций журнала «БИОпрепараты...» по организациям (по данным РИНЦ на февраль 2021 г.).

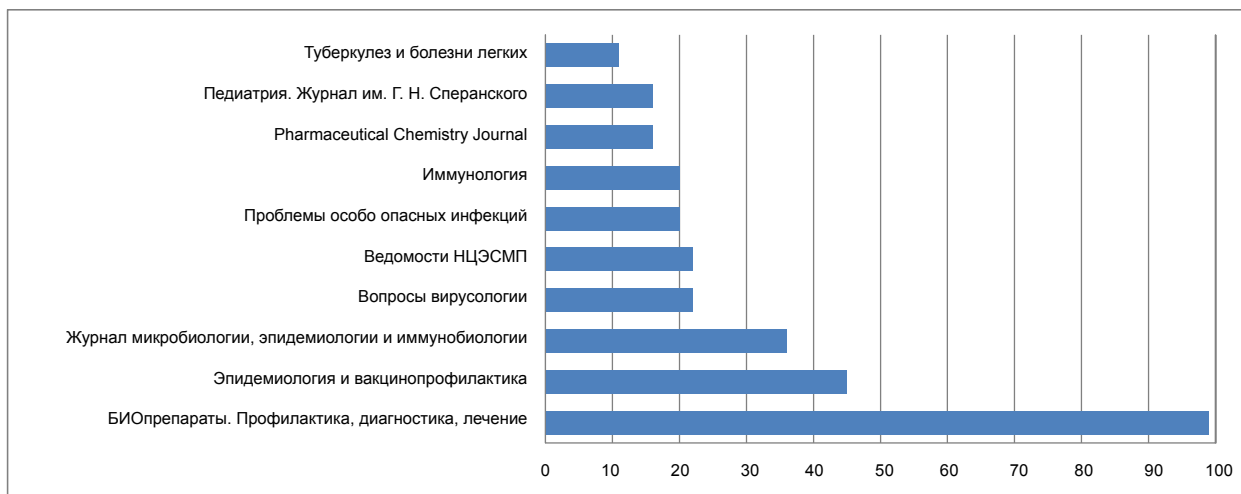


Рис. 2. Распределение цитирующих публикаций по журналам (по данным РИНЦ на февраль 2021 г.).

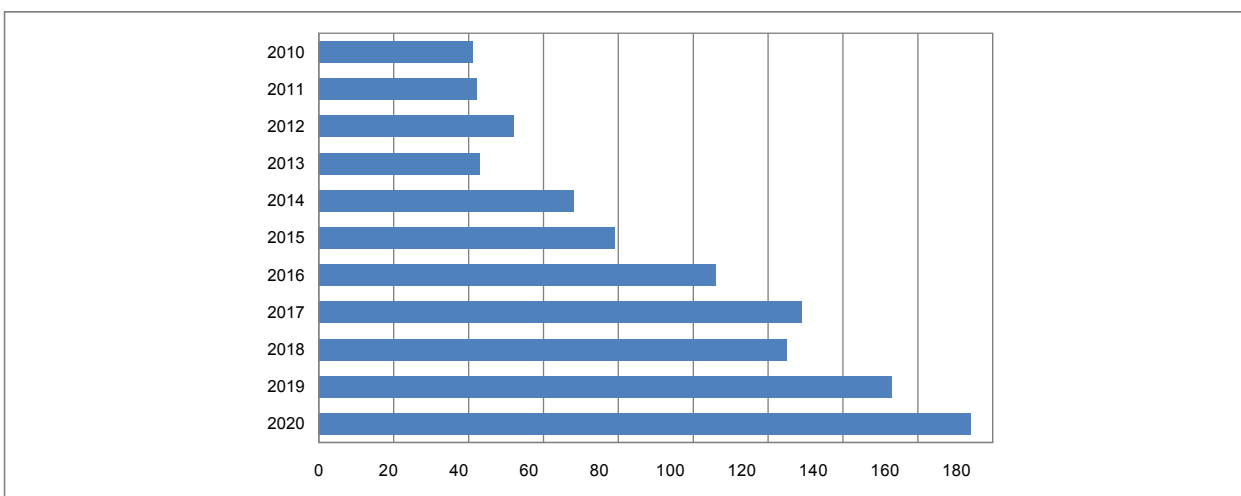


Рис. 3. Распределение цитирующих публикаций по годам (по данным РИНЦ на февраль 2021 г.).

библиотеке, Академии Google (Google Scholar), BASE, Dimensions, Open Archives Initiative, Research Bible, World Cat, Ulrich's, DOAJ, Reaxys. С 2019 г. статьи журнала индексируются в Международной реферативной базе данных Американского химического общества (Chemical Abstracts Service, CAS) — авторитетном и наиболее полном источнике научной информации по химии и смежным темам, включая биомедицинские науки, фармакологию и др. На этом основании журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук. С 2020 г. статьи журнала индексируются в базе данных Embase — медицинской и фармакологической библиографической базе данных компании Elsevier. Индексирование журнала в этих базах данных обеспечивает быстрый и открытый доступ широкой аудитории ученых-специалистов к публикуемым в журнале материалам, а также способствует увеличению читательской аудитории журнала. По состоянию на февраль 2021 г., журнал проходит процедуру экспертизы и оценки для включения в Russian Science Citation Index (RSCI) на платформе Web of Science.

С 2018 г. всем научным публикациям и выпускам журнала присваивается DOI (Digital object identifier), что позволяет оп-

тимизировать и расширить доступ к ним международной академической аудитории. В журнале также предусмотрено обязательное указание DOI для цитируемых авторами источников научной литературы.

Развитие и совершенствование журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» продолжается и в настоящее время. Повышение научного уровня журнала и его авторитетности, постоянное совершенствование в соответствии с международными издательскими стандартами, интеграция в мировое научное сообщество являются основными стратегическими задачами редакционной команды и издательства журнала.

Редакция поздравляет с 20-летним юбилеем журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» и искренне благодарит авторов, рецензентов, членов редколлегии и редсовета, читателей и всех, кто принимает активное участие в подготовке журнала к изданию!

Журнал «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» всегда готов к сотрудничеству и открыт для новых статей, авторов и рецензентов!

Научные редакторы

*О. Ю. Гойкалова, Е. В. Лебединская,
старший редактор А. П. Шестакова*

Коклюшные вакцины и роль липоолигосахарида *Bordetella pertussis* в иммунном ответе на коклюшную инфекцию и вакцинацию

И. А. Алексеева*, О. В. Перельгина, Е. Д. Колышкина

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

В научной литературе опубликованы данные, свидетельствующие о «возвращении», «возрождении» коклюша. Проблема предупреждения и ликвидации заболеваемости коклюшем может быть решена только с помощью активной иммунизации восприимчивых контингентов высокоэффективной вакциной. Цель работы — охарактеризовать используемые в настоящее время цельноклеточные и бесклеточные коклюшные вакцины и оценить перспективу повышения их качества, в частности показать роль липоолигосахарида — антигена клеточной стенки *Bordetella pertussis* — в индуцировании адаптивного иммунитета. В статье кратко изложена схема патогенеза коклюшной инфекции, особенности формирования постинфекционного и поствакцинального противокклюшного иммунитета и рассмотрены способы улучшения коклюшных вакцин. Повышение качества существующих вакцин связано со снижением реактогенности цельноклеточной коклюшной вакцины и повышением иммуногенной активности бесклеточной коклюшной вакцины. Одна из возможностей понижения реактогенности цельноклеточной вакцины заключается в уменьшении количества коклюшных клеток в дозе вакцины при условии, что эти действия не отразятся на иммуногенной активности препарата. Другой возможный путь снижения реактогенности может заключаться в отборе вакцинных штаммов по содержанию в них эндотоксина липоолигосахарида (ЛОС). Для улучшения качества бесклеточных вакцин необходимо решить многие проблемы. Одна из них заключается в поиске и выделении новых протективных антигенов. В результате анализа данных литературы продемонстрировано, что ЛОС является чрезвычайно важным антигеном, участвующим в иммунном ответе организма и обеспечивающим Th1- и Th17-клеточный ответ на коклюшную инфекцию, что является определяющим при борьбе с бактериями *B. pertussis*. Учитывая эволюционную стабильность структуры ЛОС, этот антиген (его нетоксичная олигосахаридная часть) может рассматриваться в качестве кандидата в состав бесклеточной коклюшной вакцины.

Ключевые слова: коклюш; цельноклеточная коклюшная вакцина; бесклеточная коклюшная вакцина; липоолигосахарид *Bordetella pertussis*

Для цитирования: Алексеева ИА, Перельгина ОВ, Колышкина ЕД. Коклюшные вакцины и роль липоолигосахарида *Bordetella pertussis* в иммунном ответе на коклюшную инфекцию и вакцинацию. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(1):10–19. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-10-19>

***Контактное лицо:** Алексеева Ирина Андреевна; Alekseeval@expmed.ru

Pertussis vaccines and the role of *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide in the immune response to pertussis infection and vaccination

I. A. Alekseeva*, O. V. Pereyagina, E. D. Kolyshkina

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

Some scientific publications contain data suggesting the “return” or “resurgence” of pertussis. Prevention and elimination of pertussis can only be achieved by extensive immunisation of susceptible populations with a highly effective vaccine. The aim of the study was to characterise available whole-cell and acellular pertussis vaccines and to assess the feasibility of improving their quality, for instance, to demonstrate the role of lipooligosaccharide (LOS)—*Bordetella pertussis* cell wall antigen—in the induction of adaptive immunity. The paper summarises pathogenesis of pertussis, development of post-infection and post-vaccination immunity, and potential ways of improving pertussis vaccines. Improvement of quality of available vaccines can be achieved by reducing reactogenicity of whole-cell pertussis vaccines and enhancing immunogenic activity of acellular pertussis vaccines. One way to reduce reactogenicity of a whole-cell vaccine is to reduce the number of pertussis cells in the vaccine dose, provided that this does not affect the immunogenic activity of the product. Another possible way of reducing reactogenicity is to select vaccine strains based on the LOS endotoxin content. Improvement of acellular vaccine quality involves addressing many issues, such as identification and isolation of new protective antigens. Literature review demonstrated that LOS is a key antigen, because it is involved in the body’s immune response and ensures Th1 and Th17 cell responses to pertussis, which is crucial for protection from *B. pertussis* bacteria. Considering the evolutionary stability of the LOS structure, this antigen (i.e. its non-toxic oligosaccharide part) can be considered as a candidate for acellular pertussis vaccine.

Key words: pertussis; whole-cell pertussis vaccine; acellular pertussis vaccine; *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide

For citation: Alekseeva IA, Pereyagina OV, Kolyshkina ED. Pertussis vaccines and the role of *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide in the immune response to pertussis infection and vaccination. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(1):10–19. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-10-19>

***Corresponding author:** Irina A. Alekseeva; Alekseeval@expmed.ru

Коклюш — это инфекционное заболевание дыхательных путей, вызываемое грамотрицательной бактерией *Bordetella pertussis*, являющейся строгим патогеном человека, который поражает как детей, так и взрослых [1]. В настоящее время коклюш входит в число 10 инфекций с самыми высокими показателями заболеваемости и смертности во всем мире среди детей в возрасте до 5 лет [2]. У детей грудного возраста (до 1 года) коклюш протекает наиболее тяжело, при этом бактерии распространяются в легкие и вызывают некротизирующий бронхолит, внутриальвеолярное кровотечение, фибринозное воспаление и отек [3]. Инфекция *B. pertussis* может осложниться энцефалопатией и, хотя и редко, кровоизлиянием в мозг¹. В тяжелых случаях возникает выраженный лимфоцитоз, который коррелирует с трудноизлечимой гипертензией, дыхательной недостаточностью и летальным исходом. Почти 90% всех случаев смерти от коклюша приходится на детей в возрасте до 4 месяцев [3].

Для борьбы с коклюшем уже более шести десятилетий используют цельноклеточную коклюшную вакцину (ЦКВ). Со второй половины 1990-х годов в практику здравоохранения введены бесклеточные коклюшные вакцины (БКВ). Однако применение этих вакцин не защищает население от распространения коклюша, которое регистрируется во многих странах мира.

Цель работы — охарактеризовать используемые в настоящее время цельноклеточные и бесклеточные коклюшные вакцины и оценить перспективу повышения качества коклюшных вакцин, в частности показать роль липоолигосахарида — антигена клеточной стенки *B. pertussis* — в индуцировании адаптивного иммунитета.

Введение в США в 1940-е годы ЦКВ привело к резкому снижению заболеваемости и смертности от этой инфекции, и к началу 1970-х годов коклюш был практически искоренен в развитых странах мира [4]. При своей высокой эффективности ЦКВ обладает определенной реактогенностью, что в 1970-х годах послужило поводом для высказывания опасений по поводу ее безопасности [5]. На основании инициированного исследования, проведенного в Великобритании и направленного на оценку острых неврологических заболеваний у детей в возрасте от 2 до 26 месяцев, был сделан вывод, что цельноклеточная вакцина могла индуцировать у вакцинированных энцефалические реакции и энцефалопатию [6]. Позже эта информация была признана необоснованной. Результаты постмаркетингового анализа, проведенного в ответ на «нападки» антипрививочной кампании, не подтвердили взаимосвязь между развитием энцефалопатии, повреждениями головного мозга или тяжелыми неврологическими расстройствами и введением ко-

клюшной вакцины². Тем не менее сомнения в качестве вакцины привели во многих странах мира к резкому сокращению охвата детского населения прививками, что почти сразу же вызвало крупнейшие со времен довакцинального периода эпидемии коклюша и привело к существенному увеличению младенческой смертности — гораздо более тяжелому исходу, чем предполагаемая опасность от ЦКВ [4].

Реактогенность этой вакцины стимулировала исследования по изготовлению препаратов нового поколения — БКВ, состоящих из изолированных антигенов *B. pertussis*³ [1, 5]. БКВ могут содержать от одного до пяти очищенных и детоксифицированных бактериальных белков — коклюшный анатоксин (КА), филаментозный гемагглютинин (ФГА), пертактин (ПРН), фимбрии (агглютиногены) 2 и 3 (ФИМ 2, ФИМ 3)⁴ [5, 7]. Разработанные БКВ по сравнению с ЦКВ более безопасны, несомненно, менее реактогенны и, как уже установлено, менее эффективны⁵ [4, 8, 9]. БКВ является компонентом комбинированного препарата DTapP, в который, помимо коклюшной вакцины, входят дифтерийный и столбнячный анатоксины. БКВ вначале использовали в качестве бустера, а затем быстро заменили ими ЦКВ и распространили на все группы населения. Следствием явилось изменение коллективного иммунитета путем целенаправленного (специфического) воздействия на вирулентность циркулирующих бактерий [4].

В последующие годы, несмотря на высокий уровень охвата населения прививками (более 90%), во многих странах Европы, Северной Америки⁶, а также в Австралии⁷ (страны, которые для профилактики используют исключительно БКВ⁸ [10–13]) стал наблюдаться рост заболеваемости коклюшем. Много вспышек заболевания произошло среди детей, получивших только БКВ, появились сообщения об ослаблении иммунитета после БКВ [9, 14]. В ряде стран были зарегистрированы эпидемии⁹ [2, 13].

Данные, опубликованные в научной литературе, свидетельствуют о «возвращении», «возрождении» коклюша, что, несомненно, является угрозой общественному здоровью [15, 16]. Проблема роста заболеваемости коклюшем после широкого использования БКВ может быть связана с недостаточным и кратковременным иммунитетом, вызванным этими вакцинами¹⁰ [4, 8]. Так, даже 5 прививок БКВ не способны обеспечить такую же длительную защиту от коклюша, как одна прививка ЦКВ [9].

Возможные причины недостаточной эффективности бесклеточных коклюшных вакцин

Исследователи выделяют несколько возможных причин недостаточной эффективности адаптивного иммунитета, индуцированного БКВ. Среди них — несоответствие постав-

¹ Pertussis vaccines: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2010;85(40):385–400.

² Там же.

³ Там же.

⁴ Там же.

⁵ Pertussis vaccines: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2010;85(40):385–400.

⁶ Pertussis vaccines: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2015;90(35):433–60.

Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, April 2014 — conclusions and recommendations. Wkly Epidemiol Rec. 2014;89(21):221–36.

⁷ Provisional 2015 Reports of Notifiable Diseases. 2015 Provisional Pertussis Surveillance Report. 2016;64(52). <http://www.cdc.gov/pertussis/downloads/pertuss-surv-report-2015-provisional.pdf>

⁸ Australian Government Department of Health and Ageing. National Notifiable Diseases Surveillance System (NNDSS). Notification Rate for Pertussis, Australia, in the period of 1991 to 2019 and year-to-date notifications for 2020. (Reports. All diseases by State/Territory). http://www9.health.gov.au/cda/source/rpt_3.cfm

⁹ Pertussis epidemic — Washington, 2012. Centers for Disease Control and Prevention. Morb Mortal Wkly Rep. 2012;61(28):517–22.

¹⁰ Там же.

¹⁰ Pertussis vaccines: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2015;90(35):433–60.

Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, April 2014 — conclusions and recommendations. Wkly Epidemiol Rec. 2014;89(21):221–36.

цинального иммунитета постинфекционному; недостаточно сбалансированный состав антигенов, входящих в вакцину; отсутствие в профилактическом препарате потенциально важных протективных антигенов *B. pertussis*; эволюция патогена, что проявляется различием между антигенами в вакцине и аналогичными антигенами, экспрессируемыми современными циркулирующими штаммами [8, 16, 17].

Как считают исследователи, эволюция патогена, которая проявляется адаптивными мутациями генов *B. pertussis*, берет свое начало с периода использования ЦКВ, а широкое применение БКВ усилило и ускорило изменения в антигенах: коклюшный токсин (КТ), ФГА, ПРН, ФИМ 2, ФИМ 3, входящих (после инактивации) в коклюшные вакцины [17]. Незначительная продолжительность защиты, создаваемой БКВ, способствовала появлению штаммов, способных уклоняться от иммунитета хозяина, индуцированного вакциной с ограниченным содержанием антигенов [18, 19]. Ряд современных циркулирующих штаммов экспрессирует более высокие уровни ряда факторов вирулентности, включая КТ, систему секреции III типа ТЗСС (Type three secretion system) и др., то есть бактерии *B. pertussis*, становясь более вирулентными для человека, способны более эффективно подавлять иммунитет хозяина [10, 20]. Среди циркулирующих штаммов выделены отдельные изоляты, которые не продуцируют поверхностный антиген ПРН. В настоящее время активно оценивается влияние ПРН-отрицательных (ПРН-) штаммов на тяжесть течения заболевания [21]. Появление изолятов ПРН- в Австралии [22], Европе [23], Японии [24] и США [25] отражает лучшую приспособленность бактериального патогена к популяции людей, иммунизированной БКВ и имеющей антитела, направленные против ПРН [22, 23, 25]. Эти изоляты так же вирулентны, как и те, которые экспрессируют все факторы вирулентности, что показано в исследованиях на животных и клеточных моделях инфекции [26], а также по данным врачей клиницистов [27]. Помимо штаммов ПРН- выделены изоляты, не продуцирующие КТ, ФГА, ФИМ 2, ФИМ 3, то есть те антигены, которые также входят в состав БКВ [16, 28]. Эти данные свидетельствуют, что бактерии *B. pertussis* адаптировались к селективному давлению БКВ. В связи с этим актуальны исследования, направленные на выявление новых антигенов из современных циркулирующих штаммов *B. pertussis*, которые могут быть использованы в качестве кандидатов в БКВ.

Возрождение коклюша как глобальной проблемы общественного здравоохранения ставит задачу по разработке вакцины:

- обладающей приемлемым профилем безопасности;
- обеспечивающей длительный иммунитет, по эффективности сравнимый с ЦКВ;
- имеющей состав, позволяющий минимизировать влияние антигенного дрейфа;
- способной индуцировать бактерицидные антитела;
- предотвращающей передачу патогена;
- снижающей тяжесть течения инфекции.

Возможные способы улучшения коклюшных вакцин

По мнению исследователей, возможные способы улучшения коклюшных вакцин включают:

- снижение реактогенности ЦКВ при сохранении ее высокой защитной активности;
- использование в БКВ новых адьювантов, способных направлять иммунный клеточный ответ по типу Th1/Th17;
- применение живых аттенуированных вакцин;
- добавление в БКВ других протективных антигенов *B. pertussis* [15, 29–31].

Выявление и выбор других протективных антигенов требует более глубокого понимания механизмов вирулентности *B. pertussis* и развития иммунных реакций в организме человека в ответ на вакцинацию или естественную инфекцию [32]. Сложность решения поставленных вопросов связана с тем, что до настоящего времени в связи с многофакторностью патогенеза коклюша не установлен соответствующий маркер, отражающий состояние иммунитета при этой инфекции [33]. В связи с этим исследователи продолжают предпринимать усилия для идентификации антигенов *B. pertussis*, ответственных за индукцию защитного противококлюшного иммунитета.

Схема патогенеза коклюшной инфекции

Схематично изложенная в данном разделе картина патогенеза показывает роль отдельных выявленных в настоящее время антигенов *B. pertussis*. Патогенез коклюша до конца не ясен, периодически появляющиеся публикации дополняют информацию о роли факторов вирулентности *B. pertussis* в развитии заболевания [34].

Инфекционный процесс начинается с колонизации бактериями *B. pertussis* дыхательных путей хозяина. Колонизация происходит благодаря факторам вирулентности: адгезинам ФГА, ФИМ 2, ФИМ 3, ПРН, имеющим белковую природу. Адгезины, действуя синергически с коклюшным токсином, позволяют бактериям распространяться через носоглотку в трахею и легкие хозяина и вызывать патологические изменения. Кроме того, эти компоненты вызывают инактивацию движения ресничек клеток эпителия, приводящую к неспособности удаления слизи из дыхательных путей, что препятствует механическому удалению бактерий *B. pertussis* и является одной из причин длительного кашля [32].

Трахеальный цитотоксин (ТЦТ), пептидогликан, высвобождаемый из клеточной стенки *B. pertussis*, и липоолигосахарид (ЛОС) — компонент наружной клеточной мембраны, действуя синергически, разрушают клетки эпителия дыхательной системы путем инициирования высвобождения реактивных форм кислорода, таких как окись азота (NO). ЛОС, взаимодействуя с Toll-подобным рецептором 4 (TLR-4) дендритных клеток (ДК), инициирует синтез и секрецию этими клетками провоспалительных цитокинов. ТЦТ, подавляя синтез ДНК в клетках эпителия трахеи, вызывает в них цитотоксические изменения [32, 35].

Дермонекротический токсин (ДНТ), цитоплазматический полипептид, вызывает воспаление, спазм кровеносных сосудов и некротические поражения в месте колонизации.

Бактерии *B. pertussis* с помощью ФГА способны к прямой инвазии эпителиальных клеток. Кроме того, как и другие патогенные микроорганизмы слизистых оболочек, они создают биопленку на поверхности эпителия дыхательных путей, способствующую бактериальной колонизации и выживанию патогена в дыхательных путях хозяина [34]. Биопленка обладает пространственной и метаболической структурой и обеспечивает для своих членов устойчивость к фагоцитозу и антибиотикам. Кроме того, она способна подавлять иммунный ответ хозяина, что приводит к высокой патогенности такой структуры и необходимости изучать новые «биопленочные» антигены.

Токсин аденилатциклаза (АЦТ) и система секреции III типа (ТЗСС) вместе с эффекторным белком бактерии BteA влияют на пути передачи сигналов в эндотелиальных клетках, вызывая цитотоксичность, которая увеличивает доступность источников железа (Fe²⁺), необходимых для жизнедеятельности бактерий при прикреплении к тканям организма хозяина.

Таким образом, в патогенезе коклюша участвуют многие факторы вирулентности. Очевидно, что для обеспечения оптимального ответа коклюшная вакцина должна быть композицией многих антигенов *B. pertussis*, каждый из которых выполняет определенную функцию в формировании адаптивного иммунитета.

Эффективный иммунитет при коклюшной инфекции обусловлен активностью клеток врожденной иммунной системы, стимулирующих под влиянием факторов патогенности *B. pertussis* развитие как гуморальных, так и клеточных реакций адаптивного иммунитета, и включает в себя защиту как против внеклеточных циркулирующих бактерий, так и против бактерий, которые преодолели механизмы иммунитета хозяина и проникли в клетки.

Постинфекционный и поствакцинальный противококлюшный иммунитет

При естественной инфекции *B. pertussis* индуцирует выработку антител IgG и IgA класса, направленных против антигенов наружной клеточной стенки бактерии: ЛОС, ФГА, ПРН, ФИМ 2, ФИМ 3. Бактерии *B. pertussis*, расположенные внеклеточно, могут быть уничтожены антителами, распознающими и связывающими поверхностные антигены патогена при условии активации комплемента [36]. Такие антитела присутствуют в сыворотке крови пациентов во время заболевания и после выздоровления. Установлено, что антитела IgG3 класса, направленные против ЛОС *B. pertussis*, обладают бактерицидной активностью [32, 36]. Результаты исследований, проведенных среди детей с коклюшной инфекцией, подтвердили, что иммунная система хозяина реагирует на ЛОС *B. pertussis* выработкой антител, направленных против ЛОС и обладающих бактерицидной активностью [32, 37]. Полученные результаты [36, 38] подтвердили, что, несмотря на развитые механизмы адаптации *B. pertussis* к иммунной системе хозяина, бактерицидные антитела преодолевают защитные барьеры бактерий, в частности механизмы резистентности, обусловленные белками наружной мембраны патогена BrkA (*Bordetella resistance to killing, frame A*), что приводит к инaktivации и гибели патогена. Антитела, направленные против токсинов *B. pertussis*, нейтрализуют их и препятствуют связыванию бактерий с клетками дыхательного эпителия, тем самым облегчая абсорбцию и уничтожение патогенных микроорганизмов макрофагами и нейтрофилами.

Необходимо отметить, что в основном все выявленные поверхностные протективные антигены *B. pertussis* являются белками, подверженными антигенному дрейфу, в результате которого появляются новые, измененные формы белков, что позволяет циркулирующим бактериям избегать иммунной реакции хозяина [16, 39]. В отличие от них ЛОС является консервативным молекулярным паттерном (pathogen associated molecular patterns, PAMP), сохраняющим постоянство своей структуры и состава и играющим важную роль в отношениях хозяин–бактерия, в частности приводящим к активации клеток врожденной иммунной системы, таких как макрофаги и дендритные клетки. ДК, в свою очередь, способствуют переводу врожденного иммунитета в адаптивный [40]. ДК и макрофаги экспрессируют широкий спектр рецепторов PRR (pattern recognition receptor), способных распознавать молекулярные паттерны микроорганизма, что позволяет через обнаружение паттерна выявлять и идентифицировать патогены [41]. Так, TLR4 обнаруживает липополисахарид (ЛПС), в случае *B. pertussis* — ЛОС [41]. TLR4 в комплексе с рецептором MD-2 участвует в связывании лиганда, рецептор CD14 контролирует пре-

зентацию ЛОС комплексу TLR4/MD-2. Взаимодействие между ЛОС и рецепторным комплексом CD14/TLR4/MD-2 оказывает решающее влияние на амплитуду клеточных реакций [42].

ЛОС *B. pertussis*, связавшись с TLR4, направляет в дендритную клетку активирующий сигнал, который инициирует этой клеткой синтез и секрецию провоспалительных интерлейкинов (IL) IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IFN- γ (интерферон- γ) [32, 43, 44]. IL-12 способствует дифференцировке наивных Т-клеток в Т-клетки хелперы типа 1 (Th1); IL-1 β и IL-23 — в Th17 [45, 46]. В свою очередь, Т-клетки Th1 и Th17 секретуют цитокины IFN- γ и IL-17, которые усиливают выработку опсонизирующих антител и привлекают макрофаги и нейтрофилы для поглощения и внутриклеточного уничтожения бактерий в результате действия активных форм кислорода и азота [5, 32, 36].

При естественной инфекции индуцируется выработка антител против многочисленных бактериальных токсинов, что препятствует цитотоксическому действию патогена на клетки хозяина. Кроме того, происходит выработка бактерицидных антител, направленных непосредственно на элиминацию бактерий *B. pertussis* [36].

Таким образом, для эффективной защиты коклюшная вакцина, подобно естественной инфекции, должна индуцировать выработку как противотоксичных антител, так и антител с бактерицидной активностью, способствующей прямому устранению бактерий из дыхательных путей.

ЦКВ, состоящая из инактивированных бактерий *B. pertussis*, индуцирует выработку иммунного ответа, аналогичного ответу при естественном инфицировании, только на более низком уровне [47]. ЛОС инактивированных клеток, так же как ЛОС циркулирующих штаммов, являясь основным экспонируемым компонентом на поверхности клетки, активирует дендритные клетки и макрофаги к выработке провоспалительных интерлейкинов IL-12, IL-23 [48]. Под их влиянием образуются опсонизирующие антитела, активируются макрофаги и нейтрофилы, способные поглощать и уничтожать бактерии. Как считают исследователи [49], ЛОС как основной компонент *B. pertussis*, ответственный за производство IL-12 дендритными клетками и макрофагами, обуславливает высокую эффективность ЦКВ.

Значима роль ЛОС как активатора рецептора TLR4, так как на ранней стадии инфекции специфические антимикробные механизмы, запускаемые стимуляцией TLR4, способны препятствовать колонизации *B. pertussis*. У мышей, имеющих точечную мутацию в гене Tlr4, приводящую к дефектной трансдукции сигнала, не происходит элиминации патогенных бактерий после заражения культурой *B. pertussis* [48].

БКВ, в отличие от естественной инфекции *B. pertussis* и ЦКВ, не содержит ЛОС, не активирует ДК и макрофаги, не вызывает выработку опсонизирующих антител IgG2a [43, 49]. Этот тип вакцин индуцирует экспрессию цитокинов, поляризующих клеточный иммунный ответ, в основном в сторону Th2, что при инфицировании задерживает удаление бактерий из организма хозяина [5]. Так, в исследовании A. Gzyl с соавт. [50] установлено, что у иммунизированных БКВ мышей после их заражения патогенной культурой *B. pertussis* элиминация бактерий из легких происходит за 16–27 сут, тогда как у мышей, иммунизированных ЦКВ, — за 3–7 сут. Аналогичная тенденция установлена в экспериментах с обезьянами бабуинами [47].

Таким образом, коклюшные вакцины (ЦКВ и БКВ) стимулируют различные Т-клеточные ответы. Естественная инфекция и ЦКВ индуцируют смешанный Т-клеточный ответ IFN- γ /IL-17 (Th1/Th17), тогда как БКВ индуцируют в основном ответ IL-4,

IL-5/IL-17 (Th2/Th17) и относительно низкие уровни IFN- γ [15, 51]. Важную роль IFN- γ в защите от инфекции *B. pertussis* установили К. Н. Mills с соавт. [52].

Белковые антигены БКВ обеспечивают выработку анти-токсических антител IgG1 класса, направленных на нейтрализацию КТ, и антител, направленных против адгезинов (ФГА, ПРН, ФИМ 2, ФИМ 3), но не вызывают выработку бактерицидных антител, которые необходимы для элиминации бактерий *B. pertussis*. Неспособность БКВ индуцировать бактерицидную активность в организме вакцинированного может быть одной из причин ее низкой эффективности [53].

В связи с этим роль ЛОС, основного компонента клеточной стенки бактерий *B. pertussis*, способного стимулировать выработку бактерицидных антител, чрезвычайно важна в формировании эффективного иммунного ответа. ЛОС следует рассматривать как важный компонент коклюшной вакцины [54].

Значение липоолигосахарида *B. pertussis* в индуцировании иммунитета

ЛОС *B. pertussis* — это молекулярный паттерн, обладающий чрезвычайно важным для протективного антигена свойством — стабильностью структуры. Различные ЛОС, выделенные из клинических изолятов до и после эры вакцинации, были идентичны ЛОС вакцинного штамма. Это подтверждает, что использование на протяжении более 60 лет коклюшных вакцин не привело к каким-либо изменениям в структуре ЛОС [54]. Приведенные данные демонстрируют жизненно важную роль ЛОС для бактериальной клетки. Структура некоторых других антигенов клетки *B. pertussis*, по-видимому, менее значимых для ее жизнедеятельности, в борьбе с селективным давлением вакцин была подвержена изменениям или утрате отдельных генов (например, гена пертактина).

Кроме иммуномодулирующей функции ЛОС играет важную роль в защите от врожденного иммунитета хозяина. В частности, защищает бактерии *B. pertussis* от сурфактантного белка А (Surfactant Protein A, SP-A), который участвует в иммунной защите дыхательных путей хозяина, связываясь с липидом А бактериального ЛОС и вызывая дестабилизацию бактериальной мембраны, что способствует фагоцитозу бактерий нейтрофилами и макрофагами. Бактерии, у которых ЛОС был лишен хотя бы одного моносахарида в терминальном трисахариде, были связаны и агрегированы белком SP-A. Предполагается, что ЛОС *B. pertussis* защищает бактерии от SP-A-опосредованного клиренса, возможно, путем стерического ограничения доступа к области липида А [55]. Иммуностимулирующие свойства ЛОС делают его потенциально важным компонентом вакцины [56]. Являясь основным поверхностным антигеном бактериальной клетки, ЛОС может подвергаться бактерицидной атаке, направленной против *B. pertussis* [57].

ЛПС является важнейшим компонентом наружной части клеточной мембраны всех грамотрицательных бактерий, обладает термостабильными свойствами [58]. Подсчитано, что одна бактериальная клетка содержит миллионы молекул ЛПС, которые занимают три четверти бактериальной поверхности, остальную область занимают белки [59]. Молекулы ЛПС благодаря сильному взаимодействию между собой формируют очень плотный слой. А насыщенные жирные кислоты липида А, входящего в состав ЛПС, обеспечивают гидрофобными свойствами как саму молекулу ЛПС, так и наружную мембрану, в состав которой эти молекулы входят [60, 61]. Молекулы ЛПС обеспечивают структурную целостность бактериальной клетки и защищают мембрану от агрессивных воздействий окружаю-

щей среды, в том числе от действия ряда лекарственных препаратов, используемых в клинической практике [58].

Как правило, молекула ЛПС состоит из трех ковалентно связанных компонентов [60]:

1) липидного, который представлен двумя липидами, так называемыми А и Х. Фракция Х обладает классической активностью эндотоксина. Липид А обладает меньшей токсичностью, является сильным адъювантом и стимулирует выработку интерлейкина 1 [34]. Липид А является наиболее консервативной частью ЛПС и закрепляет молекулу ЛПС в бактериальной мембране. Именно липид А в молекуле ЛПС является молекулярным паттерном, а именно «патогенным штрихкодом», интерпретируемым врожденной иммунной системой млекопитающего как признак инфекции [62]. Липиды А и Х ответственны за эндотоксичность ЛОС [63], которая обуславливает относительно высокую реактогенность ЦКВ и исключает использование ЛОС в нативной форме в качестве вакцинного антигена. При разрушении бактериальной клетки липиды высвобождаются в кровь и могут вызывать тяжелые токсические последствия вплоть до септического шока;

2) центрального олигосахарида — ядра, которое представлено одной молекулой кетодезоксиоктоновой кислоты (KDO) и двумя гептозами, которые, как молекулярный мостик, соединяют ядро с липидом А [55]. Химическая структура ядра достаточно консервативна и не претерпела изменений за весь период использования вакцин. Так, структура олигосахарида *B. pertussis* современных клинических изолятов идентична структуре олигосахарида довакцинальных штаммов [54]. Сравнительно недавно было предложено считать стабильную и консервативную часть внутреннего ядра ЛОС, а именно гептозу-1,7-бисфосфат, молекулярным паттерном [64]. Бактерии-мутанты, у которых в ядре отсутствует молекула гептозы, не способны колонизировать ткани хозяина и чрезвычайно восприимчивы к экологическим стрессам [61]. Это доказывает, что построение полноценной молекулы ЛОС имеет решающее значение для выживания бактерий в организме хозяина. В связи с чем ЛОС является перспективным антигеном для введения в состав БКВ при условии снижения или освобождения от токсичности липида. Ядро и О-антиген экспонированы в окружающую среду;

3) О-антигена, дистальной части молекулы ЛПС, представляющей собой высоковариабельную цепь полисахаридов. Эта часть ЛПС является наиболее иммуногенной и легко распознается иммунной системой хозяина. О-антиген отсутствует у некоторых грамотрицательных бактерий, в частности у *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* [65]. На месте О-боковой цепи у *B. pertussis* имеется нерастворимый трисахарид [63, 65], в связи с чем ЛПС *B. pertussis* называют ЛОС [65]. Особенности структуры ЛОС приводят к более низкому уровню индукции цитокинов, что позволяет (в определенной степени) бактериям избегать ответа иммунной системы организма хозяина [66].

Элиминация бактерий является лучшим исходом при инфицировании, поскольку инфицированные люди с субклиническим заболеванием могут заразить восприимчивых людей, у которых может развиваться фульминантная форма заболевания [36]. На ЛОС, основной поверхностный компонент *B. pertussis*, вырабатываются бактерицидные антитела, которые защищают организм хозяина от проникновения возбудителя в клетки, предотвращая цитотоксическое повреждение и таким образом обеспечивая эффективную защитную противокклюшную устойчивость. Бактерицидная активность не кор-

релировала с наличием антител ни к коклюшному токсину, ни к ФГА [36]. Установлено, что моноклональные антитела к ПРН, белку внешней мембраны, также обладают бактерицидным действием [67]. Но ПРН подвержен антигенному дрейфу и, видимо, не является жизненно необходимой структурой клетки, так как у некоторых современных изолятов этот поверхностный антиген отсутствует.

Важная роль ЛОС в защите от коклюшной инфекции подтверждена исследованиями Т.С. Селезневой. Автор доказала, что в постинфекционном иммунитете к *B. pertussis* основную роль играет бактерицидная активность антител против ЛОС¹¹. В проведенном исследовании были использованы сыворотки крови детей, вакцинированных АКДС-вакциной, вакцинированных АКДС-вакциной и переболевших коклюшем, невакцинированных и переболевших коклюшем, а также сыворотки крови переболевших коклюшем взрослых.

В сыворотках крови методом ИФА определяли уровень антител к экспериментально изготовленным фракциям коклюшного микроба — дезинтегра-ту, белковой фракции, ЛПС. У вакцинированных детей (табл. 1) были выявлены наиболее высокие значения уровней антител к дезинтегра-ту и белковой фракции коклюшного микроба, самый незначительный — к ЛПС. Через 18 месяцев уровни антител к ЛПС у привитых, непривитых, неболевших детей и взрослых практически не различались.

У переболевших коклюшем детей и взрослых наблюдается иная динамика иммунного ответа к использованным антигенам. Дети, ранее полностью привитые АКДС-вакциной, с бак-

териологически подтвержденным диагнозом «коклюш» имели достоверно более низкие титры антител к дезинтегра-ту и белковой фракции по сравнению с вакцинированными. Напротив, уровень антител к ЛПС фракции значительно — в 5,6 раза превосходил уровень у привитых детей и в 24 раза — фоновый уровень. Такая же закономерность была выявлена у непривитых детей, которые переболели коклюшем. Диагноз непривитым детям ставили на основании клинических, эпидемиологических и серологических данных. Уровень антител к дезинтегра-ту и белковой фракции был достоверно ниже по сравнению с уровнем антител у группы вакцинированных детей. Уровень антител к ЛПС фракции значительно — в 4,9 раза превосходил уровень у привитых детей и в 21,2 раза — фоновый уровень. В группе переболевших взрослых была продемонстрирована аналогичная динамика накопления антител к дезинтегра-ту и белковой фракции. Максимальный прирост уровня антител отмечен для ЛПС фракции — в 24,8 раза по сравнению с группой взрослых, непривитых и неболевших коклюшем.

Таким образом, можно отметить, что во всех трех группах детей и взрослых, перенесших коклюшную инфекцию, формируются уровни антител к дезинтегра-ту и белковой фракции *B. pertussis*, сходные (или несколько ниже) с уровнями антител у детей, привитых АКДС-вакциной. Значительные отличия можно отметить для ЛПС фракции: уровень индуцированных антител к ЛПС у перенесших коклюшную инфекцию был значительно выше как фонового уровня, так и уровня антител, сформированного после вакцинации. Полученные результаты могут указывать на то, что, по-видимому, после курса вакци-

Таблица 1. Уровни антител в сыворотке крови людей к различным фракциям коклюшных бактерий¹²
Table 1. Levels of human serum antibodies to various fractions of pertussis bacteria¹²

Антигены <i>B. pertussis</i> <i>B. pertussis</i> antigens	Средняя геометрическая титров антител, ед. ИФА/мл Mean antibody titers, ELISA unit/mL						
	Фоновый уровень Baseline		Вакцинированные Vaccinated		Перенесшие инфекцию <i>B. pertussis</i> With past history of <i>B. pertussis</i> infection		
	Дети неболевшие, непривитые Children with no previous history of the disease, not vaccinated	Взрослые неболевшие, непривитые Adults with no previous history of the disease, not vaccinated	Уровень антител у вакцинированных троекратно Antibody titer after three vaccinations	Уровень антител, определенный через 1–1,5 года Antibody titer 1–1.5 years following vaccination	Дети привитые с лабораторно подтвержденным диагнозом Vaccinated children with a confirmed diagnosis	Дети непривитые Children, not vaccinated	Взрослые Adults
Дезинтегра-т коклюшных бактерий Disintegrated fraction of pertussis bacteria	615,2±11,7	650,1±10,9	4371,0±11,4	2245,0±12,2	4130,0±11,7	3592,0±10,9	3177,0±10,7
Белковая фракция коклюшных бактерий Protein fraction of pertussis bacteria	314,5±11,4	288,1±10,7	3341,0±11,6	1131,0±11,5	2573,0±11,4	2501,0±10,9	2479,0±11,1
ЛПС фракция коклюшных бактерий LPS fraction of pertussis bacteria	152,4±11,3	157,8±11,6	654,0±12,2	236,1±11,5	3676,0±11,4	3225,0±10,0	3908,0±10,7

¹¹ Селезнева Т.С. Научно-эпидемиологическое обоснование снижения антигенной нагрузки АКДС вакцины в условиях нового календаря прививок: дис. ... канд. мед. наук. М.; 1986.

¹² Там же.

нации по сравнению с естественной инфекцией не всегда формируется протективный уровень антител к ЛПС, что, вероятно, является одной из причин, почему вакцинированные дети заболевают коклюшем. Возможно, качественная особенность противокклюшного иммунитета у переболевших по сравнению с вакцинированными характеризовалась высоким уровнем антител к липополисахариду *B. pertussis*.

Полученные результаты позволяют исследователям рассматривать ЛОС как перспективный вакцинный антиген. В настоящее время проводятся исследования, направленные на получение конъюгированного соединения инактивированного (путем удаления липида А) ЛОС с белком для последующего возможного использования в БКВ [68]. Перспективной является комбинация нетоксичного изолированного фрагмента из ЛОС и коклюшного анатоксина, что может позволить получить антиген, вызывающий выработку антител с нейтрализующей и бактерицидной активностью [32]. Для снижения реактогенности ЦКВ предпринимаются попытки проведения экстракции ЛОС из клеточной стенки *B. pertussis* [69]. Перспективным является проведение детоксикации ЛОС с применением генетического метода. Одна из возможностей понижения реактогенности ЦКВ заключается в уменьшении количества коклюшных клеток в дозе вакцины. С этой целью проводят оптимизацию процесса инактивации бактерий *B. pertussis* [70]. Ранее Р. П. Чуприниной с соавт. было показано, что защитная активность ЦКВ коррелирует с содержанием в клетке агглютиногенов 1, 2, 3 [71]. Из этого следует, что если использовать в производстве коклюшной вакцины штаммы с высоким уровнем агглютиногенов 1, 2, 3, то возможно снижение количества бактериальных клеток без потери препаратом иммуногенной активности. Другой возможный путь снижения реактогенности ЦКВ может заключаться в отборе вакцинных штаммов по содержанию в них эндотоксина ЛОС.

Заключение

Распространенность коклюша во многих странах мира подтверждает непродолжительность противокклюшного иммунитета, индуцированного как инфицированием организма хозяина бактериями *B. pertussis*, так и применением вакцин. Проблема предупреждения и ликвидации коклюша может быть решена только с помощью активной иммунизации восприимчивых контингентов высокоэффективной вакциной. Используемые в настоящее время ЦКВ и БКВ требуют своего совершенствования. Так, ЦКВ, обладая высокой эффективностью, характеризуется определенной реактогенностью, что формирует у населения отрицательное отношение к вакцине. Напротив, БКВ, имея сравнительно низкий уровень реактогенности, требует повышения своей эффективности. ЛОС — поверхностный антиген клеточной стенки *B. pertussis* — является тем антигеном, с помощью которого может быть улучшено качество используемых в медицинской практике вакцин. Исследования, направленные на дальнейшее изучение возможности использования ЛОС *B. pertussis* с целью улучшения качества существующих вакцин, являются актуальными и перспективными.

Вклад авторов. И. А. Алексеева — формирование концепции статьи, сбор, анализ и систематизация информации, изложенной в научной литературе, написание текста, редактирование рукописи; О. В. Перельгина — доработка текста, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; Е. Д. Кольшикина — сбор информации, изложенной в научной литературе, работа с табличным материалом, редактирование рукописи.

Authors' contributions. Irina A. Alekseeva—elaboration of the concept of the paper; collection, analysis and systematisation of scientific literature; writing and editing of the paper; Olga V. Perelygina—revision of the text, approval of the final version of the paper for publication; Elena D. Kolyshkina—compilation of data, tabular work, editing of the paper.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

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

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

Литература/References

1. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):326–82. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.326-382.2005>
2. Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet.* 2010;375(9730):1969–87. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60549-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60549-1)
3. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, et al. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis.* 2008;47(3):328–38. <https://doi.org/10.1086/589753>
4. Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(4):274–88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3235>
5. Marzouqi I, Richmond P, Fry S, Wetherall J, Mukkur T. Development of improved vaccines against whooping cough: current status. *Hum Vaccin.* 2010;6(7):543–53. <https://doi.org/10.4161/hv.6.7.11413>
6. Miller D, Madge N, Diamond J, Wadsworth J, Ross E. Pertussis immunisation and serious acute neurological illnesses in children. *BMJ.* 1993;307(6913):1171–6. <https://doi.org/10.1136/bmj.307.6913.1171>
7. Guiso N. *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines. *Clin Infect Dis.* 2009;49(10):1565–9. <https://doi.org/10.1086/644733>
8. Cherry JD. Epidemic pertussis in 2012 — the resurgence of a vaccine-preventable disease. *N Engl J Med.* 2012;367(9):785–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1209051>
9. Witt MA, Arias L, Katz PH, Truong ET, Witt DJ. Reduced risk of pertussis among persons ever vaccinated with whole cell pertussis vaccine compared to recipients of acellular pertussis vaccines in a large US cohort. *Clin Infect Dis.* 2013;56(9):1248–54. <https://doi.org/10.1093/cid/cit046>
10. King AJ, van der Lee S, Mohangoo A, van Gent M, van der Ark A, van de Waterbeemd B. Genome-wide gene expression analysis of *Bordetella pertussis* isolates associated with a resurgence in pertussis: elucidation of factors involved in the increased fitness of epidemic strains. *PLoS One.* 2013;8(6):e66150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066150>

11. Amirthalingam G, Gupta S, Campbell H. Pertussis immunisation and control in England and Wales, 1957 to 2012: a historical review. *Euro Surveill.* 2013;18(38):20587. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.38.20587>
12. Halperin BA, Halperin SA. The reemergence of pertussis and infant deaths: is it time to immunize pregnant women? *Future Microbiol.* 2011;6(4):367–9. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.15>
13. Poland GA. Pertussis outbreaks and pertussis vaccines: new insights, new concerns, new recommendations? *Vaccine.* 2012;30(49):6957–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.09.084>
14. Klein NP, Bartlett J, Fireman B, Baxter R. Waning Tdap effectiveness in adolescents. *Pediatrics.* 2016;137(3):e20153326. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-3326>
15. Gu XX, Plotkin SA, Edwards KM, Sette A, Mills KHG, Levy O, et al. Waning immunity and microbial vaccines — Workshop of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *Clin Vaccine Immunol.* 2017;24(7):e00034–17. <https://doi.org/10.1128/cvi.00034-17>
16. Mooi FR, Van Der Maas NA, De Melker HE. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation — two sides of the same coin. *Epidemiol Infect.* 2014;142(4):685–94. <https://doi.org/10.1017/S0950268813000071>
17. Schmidtko AJ, Boney KO, Martin SW, Skoff TH, Tondella ML, Tatti KM. Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935–2009. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1248–55. <https://doi.org/10.3201/eid1808.120082>
18. Sheridan SL, McCall BJ, Davis CA, Robson JMB, Hull BP, Selvey CE, et al. Acellular pertussis vaccine effectiveness for children during the 2009–2010 pertussis epidemic in Queensland. *Med J Aust.* 2014;200(6):334–8. <https://doi.org/10.5694/mja.13.11069>
19. Tartof SY, Lewis M, Kenyon C, White K, Osborn A, Liko J, et al. Waning immunity to pertussis following 5 doses of DTap. *Pediatrics.* 2013;131(4):e1047–52. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-1928>
20. de Gouw D, Hermans PWM, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K, Diavatopoulos DA, Mooi FR. Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. *PLoS ONE.* 2014;9(1):e84523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084523>
21. Breakwell L, Kelso P, Finley C, Schoenfeld S, Goode B, Misegades LK, et al. Pertussis vaccine effectiveness in the setting of pertactin-deficient pertussis. *Pediatrics.* 2016;137(5):e20153973. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-3973>
22. Lam C, Octavia S, Ricafort L, Sintchenko V, Gilbert GL, Wood N, et al. Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(4):626–33. <https://doi.org/10.3201/eid2004.131478>
23. Zeddeman A, van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Bart MJ, Advaniet A, et al. Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill.* 2014;19(33):20881. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.33.20881>
24. Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e31985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031985>
25. Martin SW, Pawloski L, Williams M, Weening K, DeBolt C, Qin X, et al. Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: evidence for a possible selective advantage. *Clin Infect Dis.* 2015;60(2):223–7. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu788>
26. Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, Dore G, Njamkepo E, Guiso N. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing pertussis toxin or pertactin. *Vaccine.* 2009;27(43):6034–41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.074>
27. Bodilis H, Guiso N. Virulence of pertactin-negative *Bordetella pertussis* isolates from infants, France. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(3):471–4. <https://doi.org/10.3201/1903.121475>
28. Williams MM, Sen K, Weigand MR, Skoff TH, Cunningham VA, Halse TA, et al. *Bordetella pertussis* strain lacking pertactin and pertussis toxin. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(2):319–22. <https://doi.org/10.3201/eid2202.151332>
29. Hozbor D. New pertussis vaccines: a need and a challenge. In: Fedele G, Ausiello C, eds. *Pertussis Infection and Vaccines. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol 1183. Springer, Cham; 2019. P. 115–26. https://doi.org/10.1007/5584_2019_407
30. Loch C, Papin JF, Lecher S, Debrie AS, Thalen M, Solovay K, et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *Bordetella pertussis* disease and infection. *J Infect Dis.* 2017;216(1):117–24. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix254>
31. Li P, Asokanathan C, Liu F, Khaing KK, Kmiec D, Wei X, et al. PLGA nano/micro particles encapsulated with pertussis toxoid (PTd) enhances Th1/Th17 immune response in a murine model. *Int J Pharm.* 2016;513(1–2):183–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.059>
32. Koj S, Ługowski C, Niedziela T. Neoglikokoniugaty lipooligosacharydu *Bordetella pertussis*-nowe potencjalne składniki szczepionki przeciwkrztuścowej. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2015;69:1013–30. [Koj S, Ługowski C, Niedziela T. *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide-derived neoglycoconjugates — new components of pertussis vaccine. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2015;69:1013–30 (In Polish)]
33. Farizo KM, Burns DL, Finn TM, Gruber MF, Pratt RD. Clinical evaluation of pertussis vaccines: US Food and Drug Administration regulatory considerations. *J Infect Dis.* 2014;209(Suppl 1):S28–31. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit532>
34. Cervantes GE. *Bordetella pertussis*: reemergente. *Rev Mex Patol Clin Med Lab.* 2018;65(1):18–21.
35. Flak TA, Goldman WE. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol.* 1999;1(1):51–60. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00004.x>
36. Weiss AA, Moberley PS, Fernandez RC, Mink CM. Characterization of human bactericidal antibodies to *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1999;67(3):1424–31. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.3.1424-1431.1999>
37. Trollfors B, Lagergård T, Taranger J, Bergfors E, Schneerson R, Robbins JB. Serum immunoglobulin G antibody responses to *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide and *B. parapertussis* lipopolysaccharide in children with pertussis and parapertussis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(5):1015–7. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.5.1015-1017.2001>
38. Elder KD, Harvill ET. Strain-dependent role of BrkA during *Bordetella pertussis* infection of the murine respiratory tract. *Infect Immun.* 2004;72(10):5919–24. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5919-5924.2004>
39. Elomaa A, Qiushui He, Nhu Nguyen Tran Minh, Mertsola J. Pertussis before and after the introduction of acellular pertussis vaccines in Finland. *Vaccine.* 2009;27(40):5443–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.010>
40. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic Cells: Translating innate to adaptive immunity. In: Pulendran B, Ahmed R, eds. *From Innate Immunity to Immunological Memory. Current Topics in Microbiology and Immunology.* Vol 311. Springer, Berlin, Heidelberg; 2006. P. 17–58. https://doi.org/10.1007/3-540-32636-7_2
41. Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol.* 2003;74(4):479–85. <https://doi.org/10.1189/jlb.0203082>

42. Triantafilou M, Brandenburg K, Kusumoto S, Fukase K, Mackie A, Seyde U, Triantafilou K. Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *Biochem J*. 2004;381(2):527–36. <https://doi.org/10.1042/BJ20040172>
43. Mills KH, Ross PJ, Allen AC, Wilk MM. Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? *Trends Microbiol*. 2014;22(2):49–52. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.007>
44. Siciliano NA, Skinner JA, Yuk MH. *Bordetella bronchiseptica* modulates macrophage phenotype leading to the inhibition of CD4⁺ T cell proliferation and the initiation of a Th17 immune response. *J Immunol*. 2006;177(10):7131–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7131>
45. Dabbagh K, Lewis DB. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16(3):199–204. <https://doi.org/10.1097/00001432-200306000-00003>
46. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):984–93. <https://doi.org/10.1038/nri1246>
47. Warfel JM, Merkel TJ. The baboon model of pertussis: effective use and lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(10):1241–52. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.946016>
48. Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol*. 2006;177(11):7980–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7980>
49. van den Berg BM, David S, Beekhuizen H, Mooi FR, van Furth R. Protection and humoral immune responses against *Bordetella pertussis* infection in mice immunized with acellular or cellular pertussis immunogens. *Vaccine*. 2000;19(9–10):1118–28. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00329-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00329-7)
50. Gzyl A, Augustynowicz E, Zawadka M, Rabczenko D, Slusarczyk J. Ocena efektywności pełnokomórkowych i bezkomórkowych szczepionek przeciw krztuścowi w eliminacji eksperymentalnego zakażenia myszy *Bordetella pertussis*. *Med Dosw Mikrobiol*. 2007;59(2):123–35. [Gzyl A, Augustynowicz E, Zawadka M, Rabczenko D, Slusarczyk J. Evaluation of whole-cell and acellular pertussis vaccines effectiveness in clearance of experimental *B. pertussis* infection in mice. *Med Dosw Mikrobiol*. 2007;59(2):123–35 (In Polish)]
51. Brummelman J, Helm K, Hamstra HJ, van der Ley P, Boog CJ, Han WG, et al. Modulation of the CD4⁺ T cell response after acellular pertussis vaccination in the presence of TLR4 ligation. *Vaccine*. 2015;33(12):1483–91. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.063>
52. Mahon BP, Sheahan BJ, Griffin F, Murphy G, Mills KH. Atypical disease after *Bordetella pertussis* respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon-gamma receptor or immunoglobulin μ chain genes. *J Exp Med*. 1997;186(11):1843–51. <https://doi.org/10.1084/jem.186.11.1843>
53. Weiss AA, Patton AK, Millen SH, Chang SJ, Ward JI, Bernstein DI. Acellular pertussis vaccines and complement killing of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 2004;72(12):7346–51. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7346-7351.2004>
54. Albitar-Nehme S, Basheer SM, Njamkepo E, Brisson JR, Guiso N, Caroff M. Comparison of lipopolysaccharide structures of *Bordetella pertussis* clinical isolates from pre- and post-vaccine era. *Carbohydr Res*. 2013;378:56–62. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.05.002>
55. Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, Weiss AA. *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A. *J Immunol*. 2004;173(3):1959–65. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1959>
56. Geurtsen J, Vandebriel RJ, Gremmer ER, Kuipers B, Tommassen J, van der Ley P. Consequences of the expression of lipopolysaccharide-modifying enzymes for the efficacy and reactogenicity of whole-cell pertussis vaccines. *Microbios Infect*. 2007;9(9):1096–103. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.04.015>
57. Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res*. 2003;338(23):2431–47. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.07.010>
58. Whitfield C, Trent MS. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem*. 2014;83:99–128. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035600>
59. Nikaido H, Vaara M. Outer membrane. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE, eds. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium — cellular and molecular biology*. Washington DC: ASM; 1987. P. 7–22.
60. Sperandio P, Martorana AM, Polissi A. Lipopolysaccharide biogenesis and transport at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(11):1451–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.10.006>
61. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(4):593–656. <https://doi.org/10.1128/mbr.67.4.593-656.2003>
62. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013;45(12):e66. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.97>
63. Caroff M, Deprun C, Richards JC, Karibian D. Structural characterization of the lipid A of *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *J Bacteriol*. 1994;176(16):5156–9. <https://doi.org/10.1128/jb.176.16.5156-5159.1994>
64. Gaudet RG, Sintsova A, Buckwalter CM, Leung N, Cochran A, Li J, et al. Cytosolic detection of the bacterial metabolite HBP activates TIFA-dependent innate immunity. *Science*. 2015;348(6240):1251–5. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4921>
65. Preston A, Mandrell RE, Gibson BW, Apicella MA. The lipooligosaccharides of pathogenic Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 1996;22(3):139–80. <https://doi.org/10.3109/10408419609106458>
66. Munford RS. Sensing Gram-negative bacterial lipopolysaccharides: a human disease determinant? *Infect Immun*. 2008;76(2):454–65. <https://doi.org/10.1128/IAI.00939-07>
67. Gotto JW, Eckhardt T, Reilly PA, Scott JV, Cowell JL, Metcalf TN, 3rd, et al. Biochemical and immunological properties of two forms of pertactin, the 69,000-molecular-weight outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1993;61(5):2211–5. <https://doi.org/10.1128/IAI.61.5.2211-2215.1993>
68. Jennings HJ, Ługowski C, Ashton FE. Conjugation of meningococcal lipopolysaccharide R-type oligosaccharides to tetanus toxoid as route to a potential vaccine against group B *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*. 1984;43(1):407–12. <https://doi.org/10.1128/IAI.43.1.407-412.1984>
69. Dias WO, van der Ark AA, Sakauchi MA, Kubrusly FS, Prestes AF, Borges MM, et al. An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(2):339–48. <https://doi.org/10.4161/hv.22847>
70. Mohammadpour Dounighi N, Razzaghi-Abyane M, Nofeli M, Zolfagharian H, Shahcheraghi F. Study on toxicity reduction and potency induction in whole-cell pertussis vaccine by developing a new optimal inactivation condition processed on *Bordetella pertussis*. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9(7):e34153. <https://doi.org/10.5812/jjm.34153>
71. Чупринина РП, Алексеева ИА. Возможность повышения иммуногенной активности и стабильности цельноклеточного коклюшного компонента комбинирован-

ных вакцин. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014;2(75):89–95. [Chuprinina RP, Alekseeva IA. The possibility of increasing the potency and stability of

whole-cell pertussis component of combined vaccines. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014;2(75):89–95 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Алексеева Ирина Андреевна, д-р мед. наук. *Irina A. Alekseeva*, Dr. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5586-2933>

Перельгина Ольга Викторовна, канд. мед. наук. *Olga V. Perelygina*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5029-3751>

Кольшикина Елена Дмитриевна. *Elena D. Kolyshkina*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-4976-483X>

Поступила 08.10.2020

После доработки 14.01.2021

Принята к публикации 26.02.2021

Received 8 October 2020

Revised 14 January 2021

Accepted 26 February 2021

Общая характеристика адъювантов и механизм их действия (часть 2)

Н. А. Алпатова*, Ж. И. Авдеева, С. Л. Лысикова, О. В. Головинская, Л. А. Гайдерова, В. П. Бондарев

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

Одна из основных задач здравоохранения в настоящее время заключается в разработке новых вакцин и технологий, которые оптимизируют процесс вакцинации. Растет научный интерес к адъювантам вакцин, усиливающим их иммуногенность. В настоящий момент проводятся многочисленные исследования по разработке вакцин для профилактики COVID-19, в том числе инактивированных и субъединичных вакцин, в состав которых для эффективной индукции иммунного ответа и формирования напряженного иммунитета включаются адъюванты. Цель работы — систематизация данных литературы по анализу структуры, механизмов действия и стимулирующих свойств адъювантов вакцин (синтетические олигодезоксинуклеотиды, виросомы, полиоксидоний, совидон), а также обобщение данных об эффектах адъювантов, используемых в исследованиях по разработке вакцин против коронавирусов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2. Освещены сведения о перспективах усиления стимулирующего действия рассматриваемых адъювантов при их использовании в комбинации с соединениями с иным механизмом действия. Проанализированы выводы по результатам исследований по разработке адъювантных вакцин против вирусов SARS-CoV и MERS-CoV, которые могут быть полезными при выборе адъювантов с оптимальным профилем эффективности и безопасности для разрабатываемых вакцин против SARS-CoV-2. Сделан вывод о том, что понимание механизмов действия адъювантов, опосредующих их стимулирующее влияние на иммунную систему организма, будет способствовать безопасному и эффективному использованию адъювантов для усиления иммуногенности как ранее зарегистрированных, так и новых вакцин.

Ключевые слова: адъювант; иммуногенность вакцин; коронавирусная инфекция; вирус SARS-CoV-2; антиген; антитела; Т-клетки; В-клетки; иммунитет

Для цитирования: Алпатова НА, Авдеева ЖИ, Лысикова СЛ, Головинская ОВ, Гайдерова ЛА, Бондарев ВП. Общая характеристика адъювантов и механизм их действия (часть 2). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(1):20–30. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-20-30>

* **Контактное лицо:** Алпатова Наталья Александровна; alpatova@expmed.ru

General characteristics of adjuvants and their mechanisms of action (part 2)

N. A. Alpatova*, Zh. I. Avdeeva, S. L. Lysikova, O. V. Golovinskaya, L. A. Gayderova, V. P. Bondarev

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

One of the major public health challenges today is development of new vaccines and technologies to optimize the vaccination process. There is a growing scientific interest in vaccine adjuvants that enhance vaccine immunogenicity. At present, numerous studies are underway to develop COVID-19 vaccines, including inactivated and subunit vaccines which contain adjuvants for efficient induction of immune response and solid immunity. The aim of the study was to systematise literature related to the analysis of the structure, mechanisms of action and stimulating properties of vaccine adjuvants (synthetic oligodeoxynucleotides, virosomes, polyoxidonium, sovidone), as well as to summarise data on the effects of adjuvants used in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 vaccine development studies. The paper analyses the prospects for enhancing the stimulating effect of the adjuvants when used in combination with compounds having a different mechanism of action. It also analyses the results of studies of adjuvanted vaccines against SARS-CoV and MERS-CoV, which may be useful when selecting adjuvants with optimal efficacy and safety profiles to be used in SARS-CoV-2 vaccines under development. It was concluded that understanding of the mechanisms of action of adjuvants that mediate their stimulating effect on the body's immune system will contribute to safe and effective use of adjuvants to enhance the immunogenicity of both authorised and new vaccines.

Key words: adjuvant; vaccine immunogenicity; coronavirus infection; SARS-CoV-2 virus; antigen; antibodies; T cells; B cells; immunity

For citation: Alpatova NA, Avdeeva ZhI, Lysikova SL, Golovinskaya OV, Gayderova LA, Bondarev VP. General characteristics of adjuvants and their mechanisms of action (part 2). *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2021;21(1):20–30. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-20-30>

* **Corresponding author:** Natalia A. Alpatova; alpatova@expmed.ru

Окончание. Начало статьи в журнале «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» 2020;20(4):245–56.

Известно, что для инактивированных и субъединичных вакцин важным компонентом состава являются адъюванты, поскольку они способствуют формированию более устойчивого и продолжительного специфического иммунного ответа. Выбор адъюванта для конкретной вакцины основывается на нескольких параметрах, включая физическую и химическую природу антигенного компонента вакцины, оптимальный тип иммунного ответа на вакцину, возраст целевой группы вакцинируемых лиц и способ введения вакцины. Проявлению иммунизирующего эффекта каждой конкретной вакцины может способствовать применение адъювантов с определенными свойствами.

В первой части статьи рассмотрены особенности структуры и механизмов действия адъювантов, входящих в состав ряда зарегистрированных вакцин (адъюванты на основе соединений алюминия, масляных эмульсий, а также адъювантные системы, включающие комбинации из нескольких адъювантов). Кроме указанных адъювантов, вакцины, применяемые в медицинской практике, также содержат в своем составе олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие неметилированные CpG динуклеотиды (CpG-ODNs), виросомы, полиоксидоний, совидон. Некоторые из адъювантов рассматриваются в качестве перспективных кандидатов для включения в вакцины против вируса SARS-CoV-2 и изучаются на разных этапах доклинических и клинических исследований.

Одной из стратегий для борьбы с пандемией новой коронавирусной инфекции 2019 г. (COVID-19) является разработка вакцин с использованием различных технологических платформ, таких как инактивированные вакцины, субъединичные вакцины, живые аттенуированные вакцины, вирусные векторные (аденовирусные) вакцины, ДНК-вакцины и мРНК-вакцины [1, 2].

При вспышке в 2002 г. тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), вызванного вирусом SARS-CoV, отмечено более 8 тыс. подтвержденных случаев инфицирования с общим уровнем летальности 10% [3]. С 2012 г. увеличивается географическое распространение ближневосточного респираторного синдрома, вызываемого вирусом MERS-CoV¹.

По данным ВОЗ, при инфицировании указанным возбудителем инфекции отмечаются смертельные случаи (уровень летальности составляет 34,4%)².

Коронавирусная инфекция COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, распространилась по всему миру, и по состоянию на начало февраля 2021 г. зарегистрировано более 100 млн подтвержденных случаев инфицирования, общий уровень летальности составляет 2,2%³.

Во всем мире прилагаются усилия для разработки эффективной вакцины против SARS-CoV-2. По сведениям на начало февраля 2021 г. не менее 63 вакцин-кандидатов проходят стадии клинических исследований и 175 вакцин находится на этапе доклинического изучения, из которых 80 являются субъединичными и 20 — инактивированными вакцинами против SARS-CoV-2⁴. При этом приведенные данные постоянно обновляются.

Следует отметить, что при разработке вакцин против коронавируса изучались несколько адъювантов, включая соедине-

ния алюминия, эмульсии и агонисты Toll-подобных рецепторов (TLRs), которые входили в состав разрабатываемых вакцин против вирусов SARS-CoV и MERS-CoV. В настоящее время указанные адъюванты используются и в исследованиях по созданию адъювантных вакцин против SARS-CoV-2.

Цель работы — систематизация данных литературы по анализу структуры, механизмов действия и стимулирующих свойств адъювантов вакцин (синтетические олигодезоксирибонуклеотиды, виросомы, полиоксидоний, совидон), а также обобщение данных об эффектах адъювантов, используемых в исследованиях по разработке вакцин против коронавирусов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2.

Характеристика адъювантов и их иммуностимулирующих свойств

Синтетические олигодезоксирибонуклеотиды (CpG-ODNs)

Бактериальная ДНК, как и другие патоген-ассоциированные молекулярные паттерны бактерий, способна активировать систему врожденного, так и адаптивного иммунитета. Это опосредовано наличием в молекуле бактериальной ДНК неметилированных CpG динуклеотидов, которые распознаются TLR9 и инициируют сигнальный каскад реакций, приводящий к синтезу провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками и активации механизмов иммунологической защиты организма [4]. CpG динуклеотиды — это участки ДНК, в которых нуклеотиды G и C соединены фосфатом в линейную последовательность (дезоксцитидин-фосфат-дезоксигуанозин) при помощи фосфодиэстеразной связи. Отмечается, что у позвоночных животных метилированы 70–80% сайтов CpG; сайты CpG бактериальной ДНК метилированию не подвергаются [4]. При этом установлено, что именно неметилированные CpG динуклеотиды бактериальной ДНК вызывают активацию иммунной системы [5].

В синтетических одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидах (ODNs), содержащих неметилированные CpG динуклеотиды, природная фосфодиэфирная межнуклеотидная связь заменена на фосфоротиоатную, которая более устойчива к действию нуклеаз [6]. В зависимости от структуры и биологических функций CpG-содержащие последовательности разделяют на несколько классов (A, B, C, P и S) [7]. Представители класса CpG-B имеют модифицированные фосфоротиоатные нуклеотидные последовательности, а их иммуностимулирующая активность в 10–100 раз превышает активность CpG-ODNs с фосфодиэстеразной связью. Отмечается, что наиболее активные ODNs имеют два или три CpG-мотива [4].

CpG-ODNs, являясь агонистами TLR9, потенцируют развитие иммунного ответа, опосредованного TLR9. В неактивном состоянии указанные рецепторы находятся в виде мономеров, а при активации специфическим лигандом, неметилированной CpG-ODN, димеризуются, что приводит к последующей передаче сигналов внутрь клетки [4]. При этом происходит стимуляция целого ряда факторов врожденного и адаптивного иммунитета, в том числе увеличивается выработка интерферона (IFN) и провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6 (IL-6) и фактор некроза опухолей альфа (TNF α), а также повышается функциональная активность натуральных киллеров (NK-клеток) и усиливается процесс дифференцировки Th1-лимфоцитов [8].

¹ [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov))

² MERS situation update. September 2019. WHO. <https://applications.emro.who.int/docs/EMROPub-MERS-SEP-2019-EN.pdf?ua=1&ua=1>

³ Статистика коронавируса в мире. <https://coronavirus-monitoring.ru/mir/statistika-koronavirusa-v-mire-3-fevralja-2021/>

⁴ Draft landscape and tracker of COVID-19 candidate vaccines. WHO; 2021.

Иммуностимулирующие эффекты CpG-ODNs в большей степени связаны с активацией TLR9 на плазматоидных дендритных клетках (ДК) и В-лимфоцитах, которые конститутивно экспрессируют данный рецептор [5]. Активация TLR9 на В-клетках стимулирует секрецию IL-6, а также IL-10, который обладает противовоспалительной активностью. Увеличивается чувствительность В-клеток к антигенной стимуляции и активируется их дифференцировка в плазматические клетки, секретирующие антитела (АТ) [4]. Активация TLR9 плазматоидных ДК способствует повышению секреции IFN типа 1, который активирует NK-клетки, моноциты и другие антиген-презентирующие клетки (АПК). Кроме того, CpG-ODNs стимулируют созревание плазматоидных ДК в более эффективные АПК, способные активировать Т-клетки. TLR9 рецепторы участвуют в активации MyD88 зависимого сигнального пути, общего для членов семейства TLR [9].

Отмечается, что активация TLR9 с помощью CpG-ODNs усиливает развитие специфического клеточного и гуморального иммунного ответа на антиген (АГ), под их воздействием наблюдается повышение секреции цитокинов IL-6 и IL-12, стимуляция продукции иммуноглобулинов класса G (IgG2a) [5, 10]. Показана способность CpG-ODNs усиливать иммуностимулирующее действие АГ, вызывая инициацию каскадов передачи сигналов, приводящих к активации факторов транскрипции, таких как ядерный фактор каппа В (NF-κB), а также регуляторный фактор IFN3 (IRF3); отмечена способность CpG-ODNs активировать АПК и ускорять развитие иммунного ответа [11]. CpG-ODNs повышают уровень экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС), костимулирующих молекул CD40 и CD86 на плазматоидных ДК и способствуют улучшению процессинга и презентации АГ [12]. Т. Sparwasser с соавт. [13] в своих исследованиях показали, что введение CpG-ODN способствует созреванию ДК. Среди адъювантных свойств CpG-ODNs выделяют способность индуцировать развитие ответов Th1, оказывать влияние на формирование цитотоксических Т-лимфоцитов и секрецию IFNγ [14]. В качестве адъювантов вакцин наиболее изучены и перспективны представители класса CpG-B (например, CpG 1018, 1826, 2007) [7].

В 2017 г. FDA зарегистрирована новая вакцина против гепатита В HEPLISAV-B (Dynavax Technologies), которая является первой вакциной с адъювантом CpG-ODN 1018⁵. По сравнению с Engerix-B[®], вводимой трехкратно, в которой HBsAg адсорбирован на гидроксиде алюминия, двукратная вакцинация HEPLISAV-B способствовала повышению уровня серопротекции и развитию выраженного гуморального иммунного ответа в более короткие сроки. Отмечается, что CpG-ODN 1018 в сочетании с HBsAg значительно усиливает иммуногенность вакцины [15].

Профиль безопасности HBsAg-1018 был аналогичен профилю безопасности HBsAg-Eng (Engerix-B[®]). В связи с этим подчеркивается, что применение вакцины HEPLISAV-B, обладающей более высокой иммуногенностью при введении меньших доз и обеспечивающей формирование иммунного ответа в более короткий срок, будет способствовать повышению показателей серопротекции у лиц в возрасте 18 лет и старше, что принесет значительную пользу для общественного здравоохранения [15].

Проводятся исследования по изучению возможности применения CpG-ODN в комбинации с другими адъювантами с целью повышения их адъювантной активности. Так, E. J. Ко с соавт. [16] изучали адъювантный эффект CpG-ODN в сочетании с монофосфорилированным липидом А (MPL) при им-

мунизации мышей линий C57BL/6 и BALB/c инактивированным расщепленным вирионом, оцениваемый по усилению защиты мышей как от гомологичного, так и от гетеросубтипического вирусов гриппа [16]. Установлено, что комбинация адъювантов способствовала повышению уровня защиты иммунизированных животных при их заражении указанными вирусами, о чем свидетельствуют более высокие титры гомологичных и перекрестно-реагирующих связывающих АТ, а также АТ, подавляющих гемагглютинацию [16].

Таким образом, использование CpG-ODNs в качестве адъюванта стимулирует синтез цитокинов Th1 и провоспалительных цитокинов, непосредственно активирует В-клетки и плазматические ДК. Кроме того, CpG-ODNs, способствуя созреванию плазматических ДК, усиливают процессинг и презентацию АГ, повышают уровень продукции IgG2a АТ и способствуют развитию клеточного иммунного ответа.

В настоящее время адъюванты на основе CpG-ODNs входят в состав находящихся на разных стадиях разработки вакцин-кандидатов против различных инфекций, в том числе и вируса SARS-CoV-2.

Виросомы

Виросомы представляют собой вирусоподобные частицы, состоящие из восстановленных оболочек вирусов, в которых отсутствует генетический материал нативного вируса. Их, как правило, получают путем экстракции мембранных белков и липидов вирусов с помощью процедуры солиubilизации и восстановления при использовании детергентов [17, 18]. Виросомы могут быть получены из различных оболочечных вирусов, включая вирус гриппа, причем полученные частицы сходны с исходным вирусом с точки зрения морфологии и характеристик проникновения в клетки. Основная концепция создания виросом — это контролируемая сборка вирусоподобных частиц из очищенных компонентов *in vitro*.

Функционально восстановленные виросомы гриппа сохраняют рецептор-связывающую и мембрано-связывающую активность вирусного гемагглютинина. Эти характеристики виросом составляют основу их повышенной иммуногенности. Во-первых, повторяющееся расположение молекул гемагглютинина на поверхности виросомы опосредует взаимодействие АГ с рецепторами иммуноглобулина на В-лимфоцитах, стимулируя развитие гуморального иммунного ответа. Виросомы эффективно взаимодействуют с АПК, такими как ДК, что приводит к активации Т-лимфоцитов и индукции сбалансированного ответа Th1/Th2. Кроме того, в результате слияния виросом с эндосомальной мембраной часть виросомальной АГ получает доступ к основному пути презентации с участием молекул МНС класса I, тем самым активируя цитотоксические Т-лимфоциты [17]. Благодаря характерным размерам, виросомы эффективно поглощаются фагоцитарными клетками иммунной системы. Отмечается, что иммунизация виросомами гриппа вызывает формирование специфических АТ в высоких титрах [19].

Предполагается, что виросомы можно использовать в качестве систем презентации неродственных АГ, связанных с поверхностью виросомы. Из-за присущей им адъювантной активности виросомы стимулируют образование АТ и индукцию ответов Т-хелперов против поверхностно-ассоциированных АГ [19].

Виросомы гриппа первого поколения, разработанные два десятилетия назад, успешно применяются в составе лицензированных вакцин, подтверждая клиническую эффективность и безопасность этой технологии. Виросомы гриппа второго

⁵ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/heplisav-b>

поколения рассматриваются как носитель АГ и адъювантная система и применяются при разработке профилактических и терапевтических вакцин [20].

Вакцина против гриппа (Inflexal V), содержащая виросомы в качестве адъюванта, одобрена в Европе и Российской Федерации, а вакцина против гепатита А (Eрахal) одобрена в Азии, Европе и Южной Америке. Вакцина Inflexal V успешно применяется у лиц всех возрастных групп, включая детей, взрослых и пожилых лиц. Вакцина против гепатита А обладает высокой иммуногенностью, отмечен высокий уровень серопротекции (от 88 до 97%) через 2 недели после введения первой дозы, вакцина хорошо переносится. Указанную вакцину можно вводить одновременно с другими вакцинами, не вызывая антигенной конкуренции. При сравнении с вакциной против гепатита А, адсорбированной на гидроксиде алюминия, показано, что иммуногенность вакцин была аналогичной, но при введении Eрахal отмечено меньшее количество местных реакций [21].

К основным преимуществам использования виросом в вакцинах относятся такие как конформационная стабилизация АГ, защита АГ от деградации, приемлемый профиль безопасности, возможность применения у особых групп населения (младенцы, пациенты с ослабленным иммунитетом и пожилые люди).

Виросомы представляют собой платформу для разработки новых адъювантов, включая липофильные адъюванты, с целью улучшения качества иммунного ответа, индуцированного виросомами. Показано, что виросомальная вакцина, содержащая низкую дозу АГ, при добавлении GPI-0100, полусинтетического производного сапонина с амфифильной структурой, обеспечивала полную защиту мышей от летальной дозы вируса гриппа. Авторы подчеркивают, что комбинация GPI-0100 и виросомальной вакцины против гриппа повышает иммуногенность вакцины и позволяет уменьшить дозу АГ без снижения защитного потенциала вакцины [22].

Индукция CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов против консервативных АГ вируса гриппа, таких как нуклеопротеины (NP), является одной из стратегий разработки вакцин против гриппа с перекрестной защитой. Для формирования NP-специфического иммунитета разрабатывается новая вакцина против гриппа, состоящая из виросом, MPL и липида DOGS-NTA-Ni, который хелатирует ионы металлов, встроенных в мембрану. Отмечается, что виросомы с конъюгированным АГ и адъювантом, включенным в мембрану, эффективны при праймировании цитотоксических Т-лимфоцитов и индукции ответа специфических АТ в условиях *in vivo* [23].

Таким образом, виросомы представляют собой перспективный класс адъювантов для инактивированных противогриппозных вакцин, которые индуцируют продукцию вируснейтрализующих АТ в высоких титрах и активируют клеточное звено иммунной системы.

Полиоксидоний

Полиоксидоний (ПО) — азоксимера бромид, представляет собой сополимер N-окисленного 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиил)-1,4-этиленпиперазина бромида с молекулярной массой 60–100 кДа. ПО обладает иммуномодулирующими свойствами и применяется в качестве адъюванта вакцин. Авторы подчеркивают, что для выбора оптимального состава с целью минимизации токсичности, обычно свойственной полиаминам, а также для поддержания иммуностимулирующей активности введение N-окисленных групп является критически важным [24].

Имуностимулирующее действие ПО проявляется в активирующем влиянии на фагоцитоз, продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α и IL-6), процесс образования АТ. Отмечается, что ПО обладает способностью стимулировать как спонтанный, так и индуцированный синтез указанных цитокинов. При этом усиление ПО продукции IL-1 β и TNF α лежит в основе его способности повышать резистентность организма к инфекциям, так как данные цитокины влияют на функциональную активность фагоцитарных клеток [25]. Адъювантные эффекты ПО связаны с активацией миелоидных клеток, ПО увеличивает количество костимулирующих молекул на ДК, которые активируют Т-клетки, способствуя созреванию эффекторных Т-клеток [26]. Помимо иммуномодулирующего эффекта, ПО обладает детоксицирующим, антиоксидантным и мембранопротекторным действием, обусловленным его полимерной природой и рядом особенностей его химической структуры. Отмечается, что ПО как полиэлектролит относится к адъювантам, в отношении которых, как известно, до настоящего времени не показана роль TRLs в их адъювантном действии [27].

Одним из первых клинических применений ПО была коммерческая вакцина против гриппа, в которой адъювант был ковалентно конъюгирован с антигенными компонентами вакцины — гемагглютинином и нейраминидазой вируса. Введение ПО в состав гриппозной субъединичной вакцины Гриппол® позволило в три раза уменьшить вакцинирующую дозу АГ без снижения иммуногенности вакцины [28].

Вакцина против гриппа Гриппол® Квадривалент (Grippol® Quadrivalent, GQ) — это новая вакцина, содержащая адъювант ПО и рекомбинантные гемагглютинины из 4 штаммов вируса гриппа в количестве 5–6 мкг каждого гемагглютинина на дозу для человека. Указанные дозы АГ примерно в 3 раза меньше стандартной дозы, рекомендованной ВОЗ. В исследованиях V. Talayev с соавт. [29] при изучении особенностей развития иммунного ответа на вакцину GQ определяли вклад адъюванта в этот ответ при иммунизации мышей BALB/c вакциной или смесями АГ, не содержащими адъюванта [29]. Отмечается, что вакцина GQ является иммуногенной при использовании низкой дозы АГ, индуцирует Th2-поляризованный Т-клеточный ответ и созревание CD4⁺ Т-клеток памяти, активирует выработку АТ к гемагглютинином четырех штаммов вируса гриппа и увеличивает активность NK-клеток. Показано, что иммунизация вакциной GQ повышала уровень АГ-индуцированной пролиферации и продукции цитокинов Th2 *ex vivo*. Уровни выявленных эффектов были сопоставимы с эффектами, достигаемыми при введении стандартных доз АГ. Авторы отмечают, что выраженного ответа Th1 и ответа CD8⁺ Т-клеток при введении вакцины не наблюдалось. В условиях *in vitro* вакцина стимулировала созревание ДК человека, повышая экспрессию молекул HLA-DR, CD80, CD83, CD86 и ICOSL [29].

В настоящее время результаты международного клинического исследования по предложенному ВОЗ протоколу, запущенному в апреле 2020 г., подтвердили, что лекарственный препарат Полиоксидоний®, производителем которого является НПО «Петровакс Фарм», обладает высоким профилем безопасности при лечении пациентов с COVID-19⁶.

Совидон

Совидон является сополимером N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпирридина, представляет собой водорастворимый нетоксичный полимер, обладающий иммуностимулирующими свойствами. Частицы совидона имеют размер

⁶ <https://pharmvestnik.ru/content/news/Petrovaks-startoval-s-mejdunarodnym-klinicheskim-issledovaniem-preparata-dlya-lecheniya-COVID-19.html>

80–350 нм. Совидон может формировать наночастицы с вирусными субъединицами в составе вакцины [30].

Показано, что данный адъювант обладает широким спектром биологического действия — антибактериальным, противовирусным, противоопухолевым. Отмечается, что сополимер активирует фагоцитоз, стимулирует выработку цитокинов IL-1 α и IL-1 β ⁷. В качестве иммуноадъюванта совидон входит в состав зарегистрированной инактивированной субъединичной вакцины СОВИГРИПП® отечественного производства⁸.

Потенциальные адъюванты вакцин для профилактики COVID-19

Коронавирусы (CoV) — это одноцепочечные РНК-вирусы, характеризующиеся наличием булавовидных шипов; потенциально могут вызывать тяжелые респираторные заболевания у человека [1].

При разработке адъювантной вакцины против вируса SARS-CoV-2 выбор эффективного адъюванта имеет важное значение, учитывая, что эффективная вакцина, защищающая от указанного возбудителя инфекции, должна быстро индуцировать выработку нейтрализующих АТ в высоких титрах, способных предотвратить связывание вируса с рецепторами клеток хозяина, при наименьшем количестве используемого АГ [31].

SARS-CoV-2 является членом семейства *Coronaviridae*, к которому относятся также коронавирусы SARS-CoV и MERS-CoV. При этом SARS-CoV-2 относится к роду *Betacoronavirus*, как и SARS-CoV. Рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2 с высокой аффинностью связывается с рецепторами ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) на поверхности клеток человека [32]. Данные о секвенировании генома SARS-CoV-2 свидетельствуют о том, что он имеет идентичность 79,6% с SARS-CoV на уровне нуклеотидной последовательности [33]. Однако RBD вируса SARS-CoV-2 по сравнению с SARS-CoV имеет другой аминокислотный состав (с отличием в пяти из шести аминокислотных остатков RBD-домена), что имеет решающее значение для повышения аффинитета связывания АГ вируса с рецептором ACE2 [34].

SARS-CoV-2 содержит линейную одноцепочечную РНК, кодирующую белки шипа (S), оболочки (E), мембраны (M) и нуклеокапсида (N). Белок S, который связывается с рецепторами клетки хозяина, имеет примерно 72% сходства на уровне аминокислотной последовательности с аналогичным белком SARS-CoV. Белок S состоит из двух субъединиц S1 и S2, при этом S1 взаимодействует с поверхностным рецептором, а S2 участвует в слиянии вирусной и клеточной мембран и последующем проникновении вируса в клетку хозяина [32, 34].

В исследованиях по созданию вакцин против вируса SARS-CoV были протестированы экспериментальные вакцины на основе инактивированного цельного вируса, препараты рекомбинантного белка S, вирусоподобных частиц (VLP), плазмидной ДНК и несколько вирусных векторов, содержащих гены белков SARS-CoV [35, 36]. В экспериментальных и доклинических исследованиях вакцин-кандидатов против коронавирусов на различных моделях животных использовались такие адъюванты, как соединения алюминия, масляные эмульсии, агонисты TLRs и др. Результаты данных исследований могут быть полезны при выборе адъювантов для разрабатываемых вакцин против SARS-CoV-2.

Адъюванты на основе соединений алюминия

Адъюванты на основе соединений алюминия широко используются в зарегистрированных вакцинах для человека из-за их способности усиливать иммунный ответ и подтвержденного профиля безопасности. Указанные адъюванты применяются и при разработке вакцин против коронавирусных инфекций. L. Tang с соавт. [37], используя инактивированный SARS-CoV и гидроксид алюминия, продемонстрировали, что у мышей линии BALB/c, получивших вакцину с адъювантом, уровень АТ к SARS-CoV был выше по сравнению с группой животных, иммунизированных вакциной без адъюванта. Очищенная инактивированная вакцина против SARS-CoV с гидроксидом алюминия при введении макакам *Cynomolgus* и *Rhesus* защищала обезьян от заражения SARS-CoV, не вызывая каких-либо побочных реакций [37].

Стимуляция гуморального иммунного ответа, в результате которой у мышей наблюдалось повышение титров IgG1 в сыворотке крови, а также повышение аффинности вируснейтрализующих АТ и генерация В-клеток долговременной памяти, отмечена при иммунизации животных вакцинами, содержащими S-белок или рецептор-связывающий домен (RBD) вируса SARS-CoV и гидроксид алюминия в качестве адъюванта [38, 39].

Кроме того, при включении гидроксида алюминия в состав инактивированных вакцин и вакцин на основе вирусоподобных частиц (VLP), содержащих белки E, M и N вируса, отмечено повышение титров IgG1 и нейтрализующих АТ, а также усиление иммунологической памяти [40, 41]. В исследованиях Z. Zhou с соавт. [42] показано, что адъюванты на основе соединений алюминия также способствуют снижению дозы вакцины против SARS-CoV [42].

Однако в нескольких отчетах сообщается о синдроме антителозависимого усиления инфекции (ADE) или возникновении иммунопатологических изменений в легких в ответ на заражение живым вирусом после иммунизации разрабатываемыми инактивированными вакцинами [41, 43]. Отмечается, что возникновение ADE или иммунопатологических изменений может быть связано с наличием анти-N-антител или ненейтрализующих АТ, а также нейтрализующих АТ с низкой аффинностью, индуцированных иммунизацией вакцинами, как содержащими адъювант, так и без адъюванта [31]. Следует отметить, что введение вакцин на основе инактивированного SARS-CoV или S-белка связывают с развитием иммунопатологии Th2-типа, которая характеризуется увеличением эозинофилов и воспалительных инфильтратов. При этом добавление гидроксида алюминия в качестве адъюванта усиливало проявление иммунопатологических реакций [44]. Эти наблюдения вызывают серьезные опасения в отношении безопасности адъювантных вакцин против коронавирусов.

С другой стороны, отмечается, что адъюванты на основе алюминия не способствуют развитию иммунопатологических реакций. В недавних исследованиях было показано, что химически инактивированная вирусная вакцина (PiCoVacc) и вакцина на основе рекомбинантного белка RBD SARS-CoV (CoV-RBD219N1) вызывают высокий уровень защиты нечеловекообразных приматов (макаки-резус) или мышей при их заражении гомологичным вирусом SARS-CoV-2 или SARS-CoV соответственно. У всех макак, которым вводили PiCoVacc, после заражения SARS-CoV-2 не было обнаружено вируса в глот-

⁷ Алексеев КВ, Грицкова ИА, Кедик СА. Полимеры для фармацевтической технологии: учебное пособие. Кедик СА, ред. М.: Институт фармацевтических технологий, 2011.

⁸ <http://grls.rosminzdrav.ru/>

ке или в легких, а в группе мышей, получивших CoV-RBD219N1, отмечена 100% выживаемость после заражения SARS-CoV по сравнению с контрольной группой, иммунизированной только адъювантом, в которой все животные погибли [45, 46].

Потенциальные сомнения в отношении безопасности использования алюминиевых адъювантов основаны на предположении, что развитие иммунного ответа Th2-типа при введении вакцины может способствовать усилению респираторного заболевания (VAERD) [47]. Однако доказательств того, что вакцины против коронавируса, содержащие соединения алюминия, проявляют такой эффект, пока нет.

При использовании соединений алюминия в качестве адъюванта в разрабатываемых вакцинах против коронавируса не наблюдалось развития иммунного ответа типа Th1 (CD4⁺ Т-клеток и цитотоксических CD8⁺ Т-клеток), что характерно для вакцин, содержащих указанные адъюванты [48]. Предполагается, что снизить вероятность развития иммунопатологии типа Th2 можно при включении в состав вакцины адъюванта, который способствует развитию ответа Th1 на вакцину, содержащую цельный инактивированный вирус [49]. Подчеркивается, что это необходимо учитывать при разработке адъювантной вакцины для профилактики COVID-19 с использованием инактивированного вируса.

Адъюванты на основе масляных эмульсий

Адъюванты на основе масляной эмульсии (MF59 и AS03) входят в состав зарегистрированных вакцин [50]. MF59 и AS03 способствуют формированию более выраженного иммунитета по сравнению с соединениями алюминия, возможно, за счет улучшения процессов поглощения АГ, усиления миграции иммунокомпетентных клеток и активированных АПК [51, 52].

Указанные адъюванты использовались в доклинических исследованиях вакцин против коронавируса. MF59, входящий в состав инактивированных вакцин против вирусов, вызывающих заболевания SARS и MERS, а также вакцин, содержащих домен RBD белка S вируса MERS-CoV, продемонстрировал выраженный адъювантный эффект, стимулируя развитие гуморального и клеточного иммунного ответа. При иммунизации мышей указанными вакцинами отмечено формирование нейтрализующих АТ в высоких титрах, а также клеточно-опосредованного иммунитета [42, 53]. Отмечается, что клеточный иммунитет, индуцированный MF59, различается в зависимости от типа АГ вакцины. При введении с белком S вируса MERS-CoV MF59 способствовал развитию эффективного иммунного ответа как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток. А в сочетании с инактивированным вирусом SARS-CoV MF59 индуцировал развитие ответа CD4⁺ Т-клеток, но не влиял на ответ CD8⁺ Т-клеток [54, 55].

Совместное введение MF59 с субъединичными вакцинами на основе белка S1 и эпитопов RBD вируса MERS-CoV значительно повышало иммуногенность вакцин, которая проявлялась в выраженной индукции выработки IgG и нейтрализующих АТ в высоких титрах. Кроме того, введение вакцин способствовало защите мышей при заражении летальной дозой вируса [55]. Повышение протективного эффекта инактивированной вакцины против вируса SARS-CoV наблюдалось также при ее введении мышам в сочетании с MF59. Продукция нейтрализующих АТ в высоких титрах отмечена у экспериментальных животных после введения двух доз вакцины [56].

В исследовании Y. S. Kim с соавт. [57] показано, что гибридный белок на основе белка S MERS-CoV и бактериоферритина в сочетании с MF59 стимулировал процесс образования АТ, в том числе продукцию IgA АТ в высоких титрах, что способствовало выраженному иммунному ответу, который развивался в слизистых оболочках [57].

Показано, что при подкожном или интраназальном введении мышам гликозилированного полипептида, содержащего аминокислоты в позиции 14–762 белка S коронавируса SARS-CoV, совместно с сапонином Q-21, наблюдалась продукция связывающих и нейтрализующих АТ в высоких титрах, что повышало уровень защиты экспериментальных животных от интраназальной инфекции SARS-CoV, обеспечивая полную защиту верхних и нижних дыхательных путей [58].

Адъювантные системы AS01 и AS03 также использовались с вакциной, содержащей инактивированный цельный вирион SARS-CoV (WI-SARS), при иммунизации мышей BALB/c и золотистых сирийских хомячков. Разовая доза вакцины с адъювантом AS03 или без него была слабо иммуногенной для мышей, однако при введении второй дозы вакцины даже без адъюванта наблюдалось повышение уровня АТ. При введении вакцины с адъювантом отмечено формирование АТ в более высоких титрах. Более того, в присутствии AS03 при иммунизации вакциной, содержащей 0,5 или 1,5 мкг белка S SARS-CoV, наблюдалось развитие ответа специфических CD4⁺ Т-клеток одинакового уровня независимо от указанной дозы АГ. Вероятно, добавление AS03 способствует усилению иммунного ответа на меньшую дозу АГ [59].

При введении хомячкам двух доз WI-SARS с AS01 и без него отмечена защита всех животных в случае заражения вирусом дикого типа через 4 недели после иммунизации. Титры АТ снизились во всех группах иммунизированных хомячков через 18 недель после введения второй дозы, но частично животные были защищены от заражения. При этом в группах хомячков, иммунизированных вакциной с адъювантом, уровень защиты был выше, чем при использовании вакцины без адъюванта. Авторы подчеркивают, что после заражения вирусом SARS-CoV у животных не наблюдалось обострения заболевания независимо от уровня нейтрализующих АТ [59].

В исследованиях N. Iwata-Yoshikawa с соавт. [60] установлено, что цельная, инактивированная ультрафиолетовым излучением, вакцина против вируса SARS-CoV (UV-V), содержащая нуклеокапсидный белок, индуцирует инфильтрацию эозинофилов в легкие мышей BALB/c после заражения живым вирусом. Иммунизация взрослых мышей указанной вакциной с гидроксидом алюминия или без него способствовала частичной защите животных в случае заражения летальными дозами SARS-CoV, но при этом наблюдалась обширная инфильтрация эозинофилов в легкие мышей. Напротив, при добавлении к вакцине UV-V агонистов TLRs, таких как липополисахарид и полирибоинозиновая кислота–полирибозитидиловая кислота (Poly I:C), отмечено выраженное снижение уровня инфильтрации эозинофилов в легкие, а также снижение уровня продукции цитокинов IL-4 и IL-13. Авторы подчеркивают, что у мышей, иммунизированных UV-V, наблюдалась активация генов, связанных с хемотаксисом, миграцией эозинофилов, привлечением клеток и поляризацией ответа Th2, в отличие от животных, иммунизированных вакциной UV-V с агонистами TLRs [60]. При интраназальном введении вакцины с Poly I:C, агонистом TLR3, отмечена индукция выработки IFN β и IFN γ , а также проявление протективного эффекта вакцины при заражении животных вирусом SARS-CoV [61].

Адъюванты на основе агонистов TLRs

Известно, что TLRs имеют решающее значение для распознавания возбудителей инфекции. Агонисты TLRs широко изучались в качестве адъювантов вакцин [62]. CpG, Poly I:C, глюкопиранозил липид А (GLA) и резиквимод (R848) являются агонистами TLR9, TLR3, TLR4 и TLR7/8 соответственно. Эти адъюванты были протестированы в кандидатных вакцинах против SARS-CoV.

Предполагается, что для оптимальной защиты от коронавируса необходимо формирование высокоаффинных нейтрализующих АТ, развитие ответа CD4⁺ Т-клеток и цитотоксических CD8⁺ Т-клеток. При этом формирование CD8⁺ Т-клеток памяти способствует увеличению длительности протективного клеточного иммунитета в отличие от нейтрализующих АТ, которые обеспечивают защиту в течение короткого периода времени [63]. Отмечается, что среди агонистов TLRs CpG усиливает иммунный ответ CD8⁺ Т-лимфоцитов в более высокой степени по сравнению с адьювантами Poly I:C и R848 [64].

При иммунизации мышей инактивированным SARS-CoV с адьювантом CpG отмечено присутствие специфических IgA АТ в слизистой оболочке и нейтрализующих АТ в сыворотке крови экспериментальных животных. Это важно в плане формирования защитной иммунной реакции на двух уровнях: в месте проникновения вируса и при попадании вируса в кровотоки [65]. Аналогичные результаты получены другими авторами. При интраназальном введении животным инактивированной вакцины с адьювантом CpG-ODN 2006 в сыворотке крови отмечен высокий уровень IgG АТ, специфических к SARS-CoV, а также обнаруживаемый уровень IgA АТ в сыворотке крови и секретах слизистой оболочки [66].

Отмечается, что CpG способствует развитию как клеточного, так и гуморального иммунного ответа, но при этом преимущественно он индуцирует развитие ответа по типу Th1. Более того, CpG может вызывать поляризацию ответа Th2 на фенотип Th1, что является основанием для возможной комбинации CpG с другими адьювантами, чаще всего гидроксидом алюминия [67].

Комбинация рекомбинантного белка S вируса SARS-CoV или N-концевого домена (rNTD) вируса MERS-CoV с гидроксидом алюминия и CpG при введении мышам способствовала продукции IgG2a АТ в высоких титрах и выработке IFN γ [39, 68]. Отмечается, что включение в состав вакцины лиганда TLR, стимулирующего развитие ответа Th1, является перспективным, поскольку снижает вероятность развития ADE и способствует активации обоих звеньев иммунной системы.

В исследованиях А. N. Zakhartchouk с соавт. [39] и J. Lan с соавт. [69] установлено, что при введении субъединичных вакцин против SARS-CoV или MERS-CoV с комбинацией гидроксида алюминия и CpG наблюдалось формирование нейтрализующих АТ в более высоких титрах и более устойчивого клеточного иммунного ответа по сравнению с группами животных, которым указанные вакцины вводили только с гидроксидом алюминия или с гидроксидом алюминия в сочетании с другими агонистами TLRs [39, 69].

При разработке вакцин против возбудителей коронавирусной инфекции применяются и новые адьюванты. В исследованиях С. М. Coleman с соавт. [38] установлено, что адьювант на основе сапонина Matrix M1 более эффективен, чем гидроксид алюминия, в индукции выработки высокого титра нейтрализующих АТ к белку S SARS-CoV или MERS-CoV [38].

Применение нового полисахаридного адьюванта на основе дельта-инулина (Advax), как показано в исследованиях Y. Honda-Okubo с соавт. [70], в сочетании с вакцинами, содержащими рекомбинантный белок S SARS-CoV или инактивированный цельный вирион SARS-CoV, способствует повышению титров нейтрализующих АТ и защите животных от развития эозинофильной иммунопатологии легких. Кроме того, при введении адьюванта Advax у животных отмечено развитие ответа Т-клеток, опосредованного IFN γ . Авторы подчеркивают, что применение адьювантов на основе дельта-инулина способствует формированию более продолжительного им-

мунитета, что может быть полезным для преодоления естественной тенденции быстрого снижения иммунитета к коронавирусам [70].

Следует отметить, что адьюванты AS03, MF59 и CpG 1018 входят в состав зарегистрированных вакцин и в настоящее время компаниями-производителями указанных адьювантов (GlaxoSmithKline, Seqirus и Dynavax) разрешено их использование для разработки вакцин для профилактики COVID-19 [71].

Разработка инактивированных и субъединичных вакцин для профилактики COVID-19

SARS-CoV-2 — новый штамм коронавируса, об эпидемиологии и патогенезе вызванного им заболевания в настоящее время информации представлено недостаточно. Поэтому проявляется особая осторожность при разработке вакцин, которые могут обеспечить желаемый профиль эффективности и безопасности [1].

При выборе подходящих адьювантов следует учитывать уровень продуцируемых АТ, их аффинность и изотип, а также длительность гуморального иммунитета, которые имеют решающее значение для разработки эффективной вакцины против коронавируса [72]. Следует отметить, что низкий уровень продукции АТ может вызвать усиление ADE, в отличие от высокоаффинных нейтрализующих АТ в высоких титрах [73]. Кроме того, для правильного выбора адьюванта нужно учитывать особенности используемого АГ вакцины. Полноразмерный белок S с большей вероятностью может провоцировать развитие ADE из-за низкого уровня продуцируемых АТ [74]. Для сравнения, белок N обычно является высококонсервативным и способен индуцировать ответ цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако отмечается, что белок N может усиливать выработку провоспалительных цитокинов, что может привести к тяжелой патологии легких [44]. Таким образом, следует выбирать соответствующие адьюванты для АГ, которые будут обеспечивать оптимальные профили их иммуногенности. Доступные в настоящее время исследования продемонстрировали возможность составления рецептур на основе белка S, домена RBD, белка М и белка N со специфическими адьювантами.

Результаты проводимых исследований свидетельствуют о том, что для формирования защитного иммунитета против SARS-CoV-2 необходимы как выработка высокого уровня нейтрализующих АТ, так и ответ SARS-CoV-2-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток [72, 75].

В исследованиях Т. Y. Kuo с соавт. [76] при разработке вакцин против вируса SARS-CoV-2 применили технологию получения белка шипа S-2P, ранее использованную при изучении MERS-CoV. Для повышения иммуногенности вакцины и снижения риска развития вакцино-индуцированной иммунопатологии, в качестве адьюванта был выбран CpG 1018. Установлено, что рекомбинантный белок S-2P в сочетании с CpG 1018 и гидроксидом алюминия индуцирует продукцию нейтрализующих АТ в высоких титрах у иммунизированных мышей. Кроме того, нейтрализующие АТ были способны перекрестно нейтрализовать псевдовирус, содержащий белок шипа варианта D614G, что свидетельствует о наличии потенциала защиты широкого спектра. Кроме того, отмечен выраженный ответ цитокинов Th1, секретируемых спленоцитами иммунизированных мышей [76].

При исследовании диапазона доз вакцины у крыс, которым вводили однократную или двукратную дозу S-2P в сочетании с одним CpG 1018 или с CpG 1018 и гидроксидом алюминия, серьезных побочных эффектов, связанных с введением вак-

цины, не было обнаружено. Эти данные подтверждают возможность разработки вакцины, содержащей белок S-2P, CpG 1018 и гидроксид алюминия, в качестве вакцины-кандидата для предотвращения заболевания COVID-19 [76].

В связи с тем что SARS-CoV-2 поражает поверхность слизистой оболочки верхних дыхательных путей, критически важно стимулировать развитие иммунных реакций в слизистой оболочке. В качестве адъювантов мукозальных вакцин использовались агонисты TLRs, такие как флагеллин и CpG-ODN [77, 78]. Отмечается, что CpG-ODN индуцирует выработку нейтрализующих АТ в слизистой оболочке при использовании в составе вакцины, содержащей инактивированный SARS-CoV [66].

Таким образом, разные адъюванты (соединения алюминия, агонисты TLRs, масляные эмульсии, новые адъюванты), обладают различными физико-химическими и иммуностимулирующими свойствами, которые имеют значение для регулирования типа и выраженности иммунного ответа, а также продолжительности сформированного специфического иммунитета.

Заключение

Обобщая сведения, приведенные в 1-й и 2-й частях обзора, можно заключить, что изучение механизмов, способствующих развитию эффективной защиты от возбудителей инфекции, а также способов стимулирования защитных реакций организма с помощью адъювантов, в первую очередь путем воздействия на систему врожденного иммунитета, является ключевым направлением исследований в области повышения эффективности вакцинации.

Адъюванты, входящие в состав зарегистрированных вакцин (соединения алюминия, MF59, AS01, AS03, AS04, CpG-ODN, виросомы, полиоксидоний), способствуют повышению их иммуногенности, меняют динамику развития иммунного ответа, стимулируют формирование гуморального иммунитета, индуцируют развитие клеточно-опосредованного иммунного ответа, усиливают иммунный ответ у иммунологически незрелых или пожилых лиц, а также лиц с наличием иммунной недостаточности, способствуют развитию выраженного иммунного ответа при снижении дозы вакцины и кратности ее введения.

Однако в настоящее время спектр адъювантов, которые одновременно соответствуют всем требованиям по безопасности и эффективности, чрезвычайно узок. При разработке новых адъювантов следует учитывать, что адъювант не должен вызывать поликлональную стимуляцию, приводящую к гиперактивации иммунной системы; усиливать реактогенность вакцины (развитие местных и общих воспалительных реакций); проявлять тератогенность и вызывать индукцию аутоиммунных процессов и др. В связи с этим понимание потенциальных механизмов действия адъювантов поможет установлению взаимосвязи их структуры и проявляемой активности, что является важным для разработки более эффективных и безопасных адъювантов и вакцин с адъювантами.

Снижение количества АГ в вакцине является крайне важным для удовлетворения повышенного спроса на вакцины против SARS-CoV-2 в условиях пандемии и обеспечения безопасности при сохранении эффективности вводимой дозы АГ. В исследованиях, является ли гуморальный иммунный ответ достаточным для защиты от SARS-CoV-2 или ответ эффекторных Т-клеток может повысить уровень защиты от инфекции, установлено, что в формировании протективного эффекта вакцин Т-клеточный иммунный ответ играет важную роль. Следовательно, включение в вакцину на основе рекомбинантного белка S или рецептор-связывающего домена в качестве адъюванта MF59 или AS03, стимулирующих развитие иммунного

ответа смешанного типа, может быть оправданным. Поскольку CpG 1018, MF59 и AS03 уже одобрены для использования в вакцинах для человека, их применение может ускорить процесс разработки адъювантных вакцин против SARS-CoV-2.

Вклад авторов. *Н. А. Алпатова* — анализ и обобщение данных литературы, касающихся адъювантов, используемых при разработке вакцин против COVID-19, написание текста статьи; *Ж. И. Авдеева* — идея и формулировка выводов исследования, редактирование статьи; *С. Л. Лысикова* — сбор и систематизация данных, касающихся механизмов действия адъювантов вакцин; *О. В. Головинская* — обобщение материала, редактирование текста статьи; *Л. А. Гайдерова* — концепция и дизайн исследования; *В. П. Бондарев* — критический пересмотр материалов по вопросам использования адъювантов при разработке вакцин против COVID-19, окончательное утверждение рукописи для публикации.

Authors' contributions. *Natalia A. Alpatova*—analysis and systematisation of literature on adjuvants used in COVID-19 vaccine development, writing of the text; *Zhanna I. Avdeeva*—elaboration of the study idea, formulation of the study findings, editing of the paper; *Svetlana L. Lysikova*—collection and systematisation of data on mechanisms of action of vaccine adjuvants; *Olga V. Golovinskaya*—systematisation of literature, editing of the text of the paper; *Lidia A. Gayderova*—elaboration of the study concept and design; *Vladimir P. Bondarev*—review of the data on the use of adjuvants in COVID-19 vaccine development to be included in the paper, final approval of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Конфликт интересов. В. П. Бондарев является заместителем главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», Ж. И. Авдеева является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Vladimir P. Bondarev is Deputy Editor-in-Chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. Zhanna I. Avdeeva is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

- Liang Z, Zhu H, Wang X, Jing B, Li Z, Xia X, et al. Adjuvants for coronavirus vaccines. *Front Immunol.* 2020;11:589833. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.589833>
- Онищенко ГГ, Сизикова ТЕ, Лебедев ВН, Борисевич СВ. Анализ перспективных направлений создания вакцин против COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(4):216–27. [Onishchenko GG, Sizikova TE, Lebedev VN, Borisevich SV. Analysis of promising approaches to COVID-19 vaccine development. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020;20(4):216–27 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227>
- Lau EH, Hsiung CA, Cowling BJ, Chen CH, Ho LM, Tsang T, et al. A comparative epidemiologic analysis of SARS in Hong Kong, Beijing and Taiwan. *BMC Infect Dis.* 2010;10:50. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-50>

4. Половинкина ВС, Марков ЕЮ. Структура и иммуноаdjувантные свойства СРG-ДНК. *Медицинская иммунология*. 2010;12(6):469–76. [Polovinkina VS, Markov EYu. Structure and immune adjuvant properties of CPG-D. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2010;12(6):469–76 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2010-6-469-476>
5. Vollmer J, Krieg AM. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(3):195–204. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.12.008>
6. Scheiermann J, Klinman DM. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine*. 2014;32(48):6377–89. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.065>
7. Campbell JD. Development of the CpG adjuvant 1018: a case study. In: Fox C, ed. *Vaccine Adjuvants. Methods in Molecular Biology*. V. 1494. New York: Humana Press; 2017. P. 15–27. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6445-1_2
8. Свитич ОА, Лавров ВФ, Кукина ПИ, Скандарян АА, Ганковская ЛВ, Зверев ВВ. Перспективы использования агонистов рецепторов врожденного иммунитета и дефектных вирусных интерферирующих частиц в качестве адъювантов нового поколения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018;17(1):76–86. [Svitich OA, Lavrov VF, Kukina PI, Iskandaryan AA, Gankovskaya LV, Zverev VV. Agonists of receptors of the innate immunity and defective viral particles as new generation of adjuvants. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018;17(1):76–86 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-1-76-86>
9. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):535–42. <https://doi.org/10.1038/nri2587>
10. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(4):249–59. <https://doi.org/10.1038/nri132>
11. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(4):499–511. <https://doi.org/10.1586/erv.10.174>
12. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:709–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842>
13. Sparwasser T, Vabulas RM, Villmow B, Lipford GB, Wagner H. Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur J Immunol*. 2000;30(12):3591–7. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200012\)30:12%3C3591::aid-immu3591%3E3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200012)30:12%3C3591::aid-immu3591%3E3.0.co;2-j)
14. Lipford GB, Sparwasser T, Zimmermann S, Heeg K, Wagner H. CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses. *J Immunol*. 2000;165(3):1228–35. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.3.1228>
15. Hyer R, McGuire DK, Xing B, Jackson S, Janssen R. Safety of a two-dose investigational hepatitis B vaccine, HBsAg-1018, using a toll-like receptor 9 agonist adjuvant in adults. *Vaccine*. 2018;36(19):2604–11. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.03.067>
16. Ko EJ, Lee Y, Lee YT, Kim YJ, Kim KH, Kang SM. MPL and CpG combination adjuvants promote homologous and heterosubtypic cross protection of inactivated split influenza virus vaccine. *Antiviral Res*. 2018;156:107–15. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.06.004>
17. Huckriede A, Bungener L, Stegmann T, Daemen T, Medema J, Palache AM, Wilschut J. The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine*. 2005;23(Suppl 1):S26–38. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.04.026>
18. Bron R, Ortiz A, Dijkstra J, Stegmann T, Wilschut J. Preparation, properties, and applications of reconstituted influenza virus envelopes (virosomes). *Methods Enzymol*. 1993;220:313–31. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)20091-g](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)20091-g)
19. Wilschut J. Influenza vaccines: the virosome concept. *Immunol Lett*. 2009;122(2):118–21. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.11.006>
20. Moser C, Müller M, Kaeser MD, Weydemann U, Amacker M. Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(7):779–91. <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.811195>
21. Bovier PA. Epaxal®: a virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7(8):1141–50. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.8.1141>
22. Liu H, de Vries-Idema J, Ter Veer W, Wilschut J, Huckriede A. Influenza virosomes supplemented with GPI-0100 adjuvant: a potent vaccine formulation for antigen dose sparing. *Med Microbiol Immunol*. 2014;203(1):47–55. <https://doi.org/10.1007/s00430-013-0313-2>
23. Dong W, Bhide Y, Marsman S, Holtrop M, Meijerhof T, de Vries-Idema J, et al. Monophosphoryl lipid A-adjuvanted virosomes with Ni-chelating lipids for attachment of conserved viral proteins as cross-protective influenza vaccine. *Biotechnol J*. 2018;13(4):e1700645. <https://doi.org/10.1002/biot.201700645>
24. Kabanov VA. From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines. *Pure Appl Chem*. 2004;76(9):1659–77. <https://doi.org/10.1351/pac200476091659>
25. Пинегин БВ, Некрасов АВ, Хаитов РМ. Иммуномодулятор Полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения. *Цитокины и воспаление*. 2004;3(3):41–7. [Pinegin BV, Nekrasov AV, Khaitov RM. Immunomodulator Polyoxidonium: mechanisms of action and aspects of clinical application. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*. 2004;3(3):41–7 (In Russ.)]
26. Alexia C, Cren M, Louis-Pence P, Vo DN, El Ahmadi Y, Dufourcq-Lopez E, et al. Polyoxidonium® activates cytotoxic lymphocyte responses through dendritic cell maturation: clinical effects in breast cancer. *Front Immunol*. 2019;10:2693. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02693>
27. Powell BS, Andrianov AK, Fusco PC. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. *Clin Exp Vaccine Res*. 2015;4(1):23–45. <https://doi.org/10.7774/cevr.2015.4.1.23>
28. Лусс ЛВ. Роль Полиоксидония как иммуномодулятора и иммуноаdjуванта при профилактике гриппа. *Медицинский совет*. 2013;(8):50–5. [Luss LV. The role of Polyoxidonium as immunomodulating and immunoadjuvant agent in flu prevention. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2013;(8):50–5 (In Russ.)]
29. Talayev V, Zaichenko I, Svetlova M, Matveichev A, Babaykina O, Voronina E, Mironov A. Low-dose influenza vaccine Grippol Quadrivalent with adjuvant Polyoxidonium induces a T helper-2 mediated humoral immune response and increases NK cell activity. *Vaccine*. 2020;38(42):6645–55. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.07.053>
30. Никифорова АН, Миронов АН. Вакцинопрофилактика и поиск новых адъювантов. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2011;104(5):15–9. [Nikiforova AN, Mironov AN. Vaccinal prevention and search of new adjuvants. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2011;104(5):15–9 (In Russ.)]
31. Gupta T, Gupta SK. Potential adjuvants for the development of a SARS-CoV-2 vaccine based on experimental results from similar coronaviruses. *Int Immunopharmacol*. 2020;86:106717. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106717>
32. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020;27(3):325–8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>
33. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of

- probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
34. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565–74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
35. Du L, Tai W, Zhou Y, Jiang S. Vaccines for the prevention against the threat of MERS-CoV. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(9):1123–34. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1167603>
36. Jiang S, He Y, Liu S. SARS vaccine development. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(7):1016–20. <https://doi.org/10.3201/1107.050219>
37. Tang L, Zhu Q, Qin E, Yu M, Ding Z, Shi H, et al. Inactivated SARS-CoV vaccine prepared from whole virus induces a high level of neutralizing antibodies in BALB/c mice. *DNA Cell Biol*. 2004;23(6):391–4. <https://doi.org/10.1089/104454904323145272>
38. Coleman CM, Liu YV, Mu H, Taylor JK, Massare M, Flyer DC, et al. Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 2014;32(26):3169–74. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.016>
39. Zakhartchouk AN, Sharon C, Satkunarajah M, Auperin T, Viswanathan S, Mutwiri G, et al. Immunogenicity of a receptor-binding domain of SARS coronavirus spike protein in mice: implications for a subunit vaccine. *Vaccine*. 2007;25(1):136–43. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.084>
40. Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, et al. A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *Int Immunol*. 2004;16(10):1423–30. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh143>
41. Bolles M, Deming D, Long K, Agnihothram S, Whitmore A, Ferris M, et al. A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. *J Virol*. 2011;85(23):12201–15. <https://doi.org/10.1128/jvi.06048-11>
42. Zhou Z, Post P, Chubet R, Holtz K, McPherson C, Petric M, Cox M. A recombinant baculovirus-expressed S glycoprotein vaccine elicits high titers of SARS-associated coronavirus (SARS-CoV) neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 2006;24(17):3624–31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.01.059>
43. Agrawal AS, Tao X, Algaissi A, Garron T, Narayanan K, Peng BH, et al. Immunization with inactivated Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live virus. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(9):2351–6. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1177688>
44. Yasui F, Kai C, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, et al. Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J Immunol*. 2008;181(9):6337–48. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6337>
45. Gao Q, Bao L, Mao H, Wang L, Xu K, Yang M, et al. Development of an inactivated vaccine for SARS-CoV-2. *Science*. 2020;369(6499):77–81. <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.046375>
46. Chen WH, Tao X, Agrawal AS, Algaissi A, Peng BH, Pollet J, et al. Yeast-expressed SARS-CoV recombinant receptor-binding domain (RBD219-N1) formulated with aluminum hydroxide induces protective immunity and reduces immune enhancement. *Vaccine*. 2020;38(47):7533–41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.09.061>
47. Graham BS. Rapid COVID-19 vaccine development. *Science*. 2020;368(6494):945–6. <https://doi.org/10.1126/science.abb8923>
48. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell*. 2020;183(4):996–1012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>
49. Tseng CT, Sbrana E, Iwata-Yoshikawa N, Newman PC, Garron T, Atmar RL, et al. Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS One*. 2012;7(4):e35421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035421>
50. Harandi AM. Systems analysis of human vaccine adjuvants. *Semin Immunol*. 2018;39:30–4. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.08.001>
51. Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*. 2019;37(24):3167–78. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.055>
52. O'Hagan DT, Ott GS, De Gregorio E, Seubert A. The mechanism of action of MF59 — an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine*. 2012;30(29):4341–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.061>
53. Zhang N, Channappanavar R, Ma C, Wang L, Tang J, Garron T, et al. Identification of an ideal adjuvant for receptor-binding domain-based subunit vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(2):180–90. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.03>
54. Kong WP, Xu L, Stadler K, Ulmer JB, Abrignani S, Rappuoli R, Nabel GJ. Modulation of the immune response to the severe acute respiratory syndrome spike glycoprotein by gene-based and inactivated virus immunization. *J Virol*. 2005;79(22):13915–23. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.22.13915-13923.2005>
55. Tang J, Zhang N, Tao X, Zhao G, Guo Y, Tseng CT, et al. Optimization of antigen dose for a receptor-binding domain-based subunit vaccine against MERS coronavirus. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(5):1244–50. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1021527>
56. Stadler K, Roberts A, Becker S, Vogel L, Eickmann M, Kolesnikova L, et al. SARS vaccine protective in mice. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(8):1312–4. <https://doi.org/10.3201/eid1108.041003>
57. Kim YS, Son A, Kim J, Kwon SB, Kim MH, Kim P, et al. Chaperna-Mediated Assembly of ferritin-based Middle East respiratory syndrome-coronavirus nanoparticles. *Front Immunol*. 2018;9:1093. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01093>
58. Bisht H, Roberts A, Vogel L, Subbarao K, Moss B. Neutralizing antibody and protective immunity to SARS coronavirus infection of mice induced by a soluble recombinant polypeptide containing an N-terminal segment of the spike glycoprotein. *Virology*. 2005;334(2):160–5. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2005.01.042>
59. Roberts A, Lamirande EW, Vogel L, Baras B, Goossens G, Knott I, et al. Immunogenicity and protective efficacy in mice and hamsters of a β -propiolactone inactivated whole virus SARS-CoV vaccine. *Viral Immunol*. 2010;23(5):509–19. <https://doi.org/10.1089/vim.2010.0028>
60. Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, et al. Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine. *J Virol*. 2014;88(15):8597–614. <https://doi.org/10.1128/jvi.00983-14>
61. Zhao J, Wohlford-Lenane C, Zhao J, Fleming E, Lane TE, McCray PB Jr, Perlman S. Intranasal treatment with poly(I:C) protects aged mice from lethal respiratory virus infections. *J Virol*. 2012;86(21):11416–24. <https://doi.org/10.1128/jvi.01410-12>
62. Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine*. 2011;29(17):3341–55. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.002>

63. Channappanavar R, Fett C, Zhao J, Meyerholz DK, Perlman S. Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Virol.* 2014;88(19):11034–44. <https://doi.org/10.1128/jvi.01505-14>
64. Zhao K, Wang H, Wu C. The immune responses of HLA-A*0201 restricted SARS-CoV S peptide-specific CD8⁺ T cells are augmented in varying degrees by CpG ODN, PolyI:C and R848. *Vaccine.* 2011;29(38):6670–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.100>
65. Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev.* 2011;239(1):178–96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2010.00978.x>
66. Gai W, Zou W, Lei L, Luo J, Tu H, Zhang Y, et al. Effects of different immunization protocols and adjuvant on antibody responses to inactivated SARS-CoV vaccine. *Viral Immunol.* 2008;21(1):27–37. <https://doi.org/10.1089/vim.2007.0079>
67. Weeratna RD, Brazolot Millan CL, McCluskie MJ, Davis HL. CpG ODN can re-direct the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001;32(1):65–71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2001.tb00535.x>
68. Jiaming L, Yanfeng Y, Yao D, Yawei H, Linlin B, Baoying H, et al. The recombinant N-terminal domain of spike proteins is a potential vaccine against Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection. *Vaccine.* 2017;35(1):10–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.064>
69. Lan J, Deng Y, Chen H, Lu G, Wang W, Guo X, et al. Tailoring subunit vaccine immunity with adjuvant combinations and delivery routes using the Middle East respiratory coronavirus (MERS-CoV) receptor-binding domain as an antigen. *PLoS One.* 2014;9(11):e112602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112602>
70. Honda-Okubo Y, Barnard D, Ong CH, Peng BH, Tseng CT, Petrovsky N. severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus vaccines formulated with delta inulin adjuvants provide enhanced protection while ameliorating lung eosinophilic immunopathology. *J Virol.* 2015;89(6):2995–3007. <https://doi.org/10.1128/jvi.02980-14>
71. Thanh Le T, Andreadakis Z, Kumar A, Gómez Román R, Tollesen S, Saville M, Mayhew S. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(5):305–6. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00073-5>
72. Iwasaki A, Yang Y. The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):339–41. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0321-6>
73. Wang Q, Zhang L, Kuwahara K, Li L, Liu Z, Li T, et al. Immunodominant SARS coronavirus epitopes in humans elicited both enhancing and neutralizing effects on infection in non-human primates. *ACS Infect Dis.* 2016;2(5):361–76. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00006>
74. Wan Y, Shang J, Sun S, Tai W, Chen J, Geng Q, et al. Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of coronavirus entry. *J Virol.* 2020;94(5):e02015–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02015-19>
75. Heaton PM. The Covid-19 vaccine-development multiverse. *N Engl J Med.* 2020;383(20):1986–8. <https://doi.org/10.1056/nejme2025111>
76. Kuo TY, Lin MY, Coffman RL, Campbell JD, Traquina P, Lin YJ, et al. Development of CpG-adjuvanted stable prefusion SARS-CoV-2 spike antigen as a subunit vaccine against COVID-19. *Sci Rep.* 2020;10(1):20085. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77077-z>
77. V'kovski P, Gultom M, Kelly J, Steiner S, Russeil J, Manganat B, et al. Disparate temperature-dependent virus — host dynamics for SARS-CoV-2 and SARS-CoV in the human respiratory epithelium. *BioRxiv.* 2020.04.27.062315. <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.062315>
78. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol.* 2008;9(7):769–76. <https://doi.org/10.1038/ni.1622>

Об авторах / Authors

Алпатова Наталья Александровна, д-р биол. наук. *Natalia A. Alpatova*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф. *Zhanna I. Avdeeva*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9377-1378>

Лысикова Светлана Леонидовна, канд. мед. наук. *Svetlana L. Lysikova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7864-8972>

Головинская Ольга Вячеславовна, канд. мед. наук. *Olga V. Golovinskaya*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук. *Lidia A. Gayderova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф. *Vladimir P. Bondarev*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Поступила 18.01.2021

После доработки 03.02.2021

Принята к публикации 26.02.2021

Received 18 January 2021

Revised 3 February 2021

Accepted 26 February 2021

Современная ситуация по заболеваемости отдельными клостридиальными инфекциями: газовая гангрена и столбняк

Е. И. Комаровская*, О. В. Перельгина*

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

Клостридиальный мионекроз, или газовая гангрена (мионекроз), и столбняк в современном мире относительно редкие, но серьезные заболевания с неблагоприятным прогнозом и высокой смертностью. Опасные для жизни инфекции, вызываемые бактериями рода *Clostridium*, на протяжении сотен лет были известны и описаны, поскольку они отличались от других инфекций по характерным клиническим проявлениям, сложностью терапии и профилактики. Цель работы — провести аналитический обзор заболеваемости газовой гангреной и столбняком в мире, проанализировать проблемы профилактики и лечения этих заболеваний. Обзор современных источников научной литературы продемонстрировал, что газовая гангрена продолжает оставаться проблемой из-за молниеносного течения и сложностей терапии. Выделяют две основные формы заболевания: травматическую и спонтанную. Виды *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi (oedematiens)* и *C. histolyticum* являются наиболее частыми возбудителями травматической газовой гангрены. Заболеваемость резко возрастает во время войн, природных катаклизмов и других массовых бедствий. Анализ данных литературы показал, что за последние 40 лет возросла частота спонтанной газовой гангрены, вызванной *C. septicum*, у людей с ослабленной иммунной системой, у потребителей инъекционных наркотиков и у женщин при проведении им различных гинекологических процедур, а также при естественных родах. При этом, несмотря на эффективность программы иммунизации против столбняка, инфекция остается распространенным явлением в странах с недостаточным охватом иммунизацией. Высокий риск столбняка в развитых странах отмечен среди пожилых непривитых или частично привитых людей, среди потребителей инъекционных наркотиков, а также людей, сознательно отказывающихся от вакцинации. В статье приведены некоторые клинические случаи заболеваний газовой гангреной и столбняком, демонстрирующие проблемы, связанные с трудностями диагностики и лечения, недостаточностью знаний персонала первичного звена об особенностях развития анаэробных инфекций, антипрививочным движением.

Ключевые слова: клостридии; анаэробная инфекция; газовая гангрена; мионекроз; некротизирующие инфекции; столбняк; тетаноспазм; раневые инфекции; отказ от вакцинации; хирургические инфекции кожи и мягких тканей; вакцинация

Для цитирования: Комаровская ЕИ, Перельгина ОВ. Современная ситуация по заболеваемости отдельными клостридиальными инфекциями: газовая гангрена и столбняк. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(1):31–38. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-31-38>

* **Контактные лица:** Комаровская Елена Игоревна; kleni@mail.ru
Перельгина Ольга Викторовна; perelygina@rambler.ru

Current incidence of certain clostridial infections: gas gangrene and tetanus

E. I. Komarovskaya*, O. V. Perelygina*

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

Clostridial myonecrosis or gas gangrene (myonecrosis) and tetanus are relatively rare nowadays, but they are still considered serious conditions associated with poor prognosis and high mortality. Life-threatening infections caused by *Clostridium* species have been known and studied for centuries, as they differed from other infections in terms of typical clinical manifestations, challenges of therapy and prevention. The aim of the study was to analyse the global incidence of gas gangrene and tetanus and challenges of prevention and treatment of these diseases. The review of up-to-date scientific literature demonstrated that gas gangrene continues to be a problem due to its rapid progression and challenging treatment. There are two main forms of the disease—traumatic and spontaneous. Traumatic gas gangrene is usually caused by *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi (oedematiens)*, or *C. histolyticum*. Its incidence increases dramatically during wars, natural disasters, and other calamities. The literature review demonstrated that over the past 40 years there has been a rise in the frequency of spontaneous gas gangrene caused by *C. septicum* in people with compromised immune systems, in injecting drug users, and in women during various gynecological procedures and during normal delivery. Despite the effectiveness of the tetanus immunisation programme, the infection remains widespread in countries with insufficient vaccination coverage. The risk of tetanus in developed countries is high among elderly unvaccinated or partially vaccinated people, among injecting drug users, and vaccine refusers. The paper describes some clinical cases of gas gangrene and tetanus which demonstrate problems associated with challenging diagnosis and treatment, low awareness among primary healthcare personnel about mechanisms of anaerobic infection development, and anti-vaccination movement.

Key words: clostridia; anaerobic infection; gas gangrene; myonecrosis; necrotizing infections; tetanus; tetanospasmin; wound infections; vaccination refusal; surgical skin and soft-tissue infections; vaccination

For citation: Komarovskaya EI, PereLygina OV. Current incidence of certain clostridial infections: gas gangrene and tetanus. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2021;21(1):31–38. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-31-38>

* **Corresponding authors:** Elena I. Komarovskaya; kleni@mail.ru
Olga V. PereLygina; pereLygina@rambler.ru

Газовая гангрена и столбняк относятся к группе инфекций, вызываемых возбудителями спорообразующих клостридий, являющимися грамположительными облигатными анаэробами, способными вызывать заболевания, обусловленные действием вырабатываемых ими сильнейших токсинов. Основным резервуаром для этих микроорганизмов является почва, пыль, желудочно-кишечный тракт многих животных как травоядных, так и всеядных. За последние десятилетия были подробнее изучены механизмы действия клостридиальных токсинов, получены новые данные о патогенезе инфекции, клеточных и иммунологических механизмах патогенеза.

Цель работы — провести аналитический обзор заболеваемости газовой гангреной и столбняком в мире, проанализировать проблемы профилактики и лечения этих заболеваний.

Газовая гангрена (мионекроз)

Мионекроз (газовая гангрена) — одна из самых молниеносно развивающихся инфекций у людей. Клостридиальные инфекции, вызывающие некроз кожи и мягких тканей, были подробно описаны в медицинской литературе с середины XIX в. Большинство случаев газовой гангрены фиксировалось во время военных действий. В эти периоды заболеваемость газовой гангреной достигала 10% среди раненых. В период Второй мировой войны более высокий уровень смертности наблюдался среди раненых военнопленных, что было связано с задержкой хирургического лечения, которое начиналось на 3,5 суток позже по сравнению с другими ранеными [1]. В период военных операций на европейских территориях заболеваемость газовой гангреной была выше по сравнению с военными операциями, проводившимися в пустыне. Вероятно, это объясняется тем, что почвы Европы были сильно обсеменены *C. perfringens* (50 тыс. микроорганизмов на 1 г почвы), тогда как из грунта пустыни Сахара они высевались редко. Военная форма также была заражена клостридиями: *C. perfringens* были высеяны из 24% рубашек и 44% брюк [2]. В военных конфликтах второй половины XX в. (войны в Корее, Вьетнаме, Персидском заливе, Афганистане и др.) случаи газовой гангрены значительно сократились благодаря современным возможностям для быстрой эвакуации, тщательной хирургической обработки ран, сосудистой реконструкции, улучшенным мерам поддержки пациента, широкому выбору и доступности эффективных антибиотиков. Но анаэробные инфекции продолжают оставаться проблемой как в период военных конфликтов, так и в мирное время. Например, в декабре 2004 г. в Индонезии от цунами погибли более 200 тыс. человек, некоторые пострадавшие впоследствии умерли от столбняка или газовой гангрены. В 2008 г. после землетрясения в Китае в уезде Вэньчуань (Wenchuan) среди пострадавших было зафиксировано более 2,4% случаев развития газовой гангрены [3].

Обсемененность раны *C. perfringens* не является абсолютным условием для развития газовой гангрены. Фактически в период Второй мировой войны почти 80% ран были контаминированы *C. perfringens*, но только в 0,8% случаев развивалась газовая гангрена. Определяющими факторами развития мионекроза являются: анатомическое расположение раны, степень повреждения раны, иммунитет человека. Повреждения такого

типа, как раздавливание, повреждение стенок сосудов крупных или средних артерий и открытые переломы длинных костей, загрязненные почвой, содержащей споры бактерий, являются предрасполагающими условиями для развития инфекции [4]. Газовая гангрена брюшной стенки и области живота возникает после проникающих травм колюще-режущими предметами или в результате огнестрельных ран, нарушающих целостность кишечника с последующим попаданием его содержимого в брюшную полость.

Клинические проявления клостридиальной газовой гангрены характеризуются внезапным началом — мучительной болью в месте раны и быстрым формированием зловонного очага, содержащего небольшие серозно-геморрагические выделения и газовые пузырьки. Развиваются отечность и уплотнение мышц с дальнейшим возникновением кожных пузырей, содержащих голубовато-бордовую жидкость¹. Позже эти ткани могут стать разжиженными и отторгнуться. Граница между здоровой и некротической тканями может сокращаться со скоростью несколько сантиметров в час, несмотря на соответствующую антибиотикотерапию. Радикальная ампутация является единственным способом спасти жизнь. Шок и органная недостаточность часто сопровождают газовую гангреноу, при развитии бактериемии смертность превышает 50%. Для окончательной постановки диагноза необходима биопсия тканей или окраска по Граму выделений из раны.

Есть сообщения, что *C. sordellii* является причиной возникновения газовой гангрены матки. Заболевание является следствием самопроизвольного, криминального или медикаментозного аборта, нормальных родов, кесарева сечения и травматического повреждения [5]. Смерть при гинекологических инфекциях, связанных с *C. sordellii*, наступает быстро, и инфекция почти всегда смертельна в основном потому, что начало шока и полиорганной недостаточности часто бывает настолько быстрым, что смерть предшествует диагнозу.

В литературе описаны случаи эндофтальмита, спровоцированного *C. sordellii* после снятия швов с трансплантата роговицы. Эндофтальмит, вызванный *C. perfringens* вследствие проникающих травм, является молниеносной инфекцией [6].

Случаи газовой гангрены, вызванной *C. sordellii*, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. histolyticum*, описаны в США и Северной Европе среди наркоманов, вводящих подкожно героин «черная смола». Смертность от этого заболевания ниже (до 50%), что, по-видимому, связано с ранними проявлениями кожных признаков инфекции, которые хорошо видны в начале болезни [6]. У потребителей инъекционных наркотиков также были зафиксированы случаи инфицирования клостридиями с образованием абсцессов, развитием целлюлита, эндокардитов, полиорганной недостаточности.

Спонтанная, не связанная с травмой газовая гангрена, вызванная *Clostridium septicum*

К предрасполагающим факторам развития спонтанной газовой гангрены относят рак толстой кишки, дивертикулит, желудочно-кишечные операции, лейкомию, лимфопролиферативные нарушения, химиотерапию, лучевую терапию и СПИД [7]. Циклическая, врожденная или приобретенная нейтропения

¹ Коротяев АИ, Бабичев СА. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. Учебник для медицинских вузов. СПб.: СпецЛит; 2012.

также тесно связана с повышенной частотой возникновения спонтанной газовой гангрены, вызванной *C. septicum*, в таких случаях обычно диагностируют некротический энтероколит, воспаление слепой кишки (тифлит) или воспаление подвздошной кишки (илеит). Эти желудочно-кишечные патологии позволяют бактериям проникнуть в кровоток, где они, размножаясь, вызывают мионекроз.

Смертность от спонтанной гангрены колеблется от 67 до 100%, при этом большинство смертей происходит в течение 24 ч после начала заболевания. Поскольку эти инфекции не связаны с травмой, диагностика на ранних стадиях затруднена. Клинические признаки для постановки диагноза проявляются в виде сильной боли, быстро прогрессирующей инфекции мягких тканей, а также газообразованием в ткани.

Основные экзотоксины бактерий — возбудителей газовой гангрены

C. perfringens является наиболее патогенным микроорганизмом среди других возбудителей мионекроза. Бактерии вырабатывают 17 известных токсинов, наиболее токсичными являются альфа-токсин (лецитиназа) и тета-токсин. Альфа-токсин обладает множественной биологической активностью (гемолитической, энзиматической, фосфолипазной), летальным действием, а также является мощным активатором тромбоцитов. Токсин разрушает клеточные мембраны, вызывая агрегацию тромбоцитов, тромбоз и высвобождение гистамина, нарушает функции кардиомиоцитов [8].

Тета-токсин относится к группе холестерин-зависимых цитолизин (CDC), который включает стрептолизин O, отвечающий за развитие гемолиза. При контакте с холестерином клеточной мембраны мономеры тета-токсина олигомеризуются и внедряются в мембрану, образуя поры и приводя к лизису клеток. Тета-токсин оказывает прямое повреждающее действие на сосуды, разрушает лейкоциты, вызывая воспалительную реакцию организма на инфекцию [6, 9].

C. perfringens продуцирует также такие токсины, как коллагеназа, гиалуронидаза, гемагглютинины и гемолизины. Коллагеназа расщепляет соединительную ткань, способствуя быстрому распространению микроорганизма по тканям. Это одна из главных причин распространения инфекции в более глубокие мышечные ткани [6, 9].

C. septicum продуцирует четыре основных токсина, обладающих гемолитической, некротизирующей активностью и летальным действием [6, 9].

Патогенные штаммы *C. sordellii* вырабатывают до 7 идентифицированных экзотоксинов. Из них летальный токсин и геморрагический токсин рассматриваются как основные факторы вирулентности [6, 9].

Патогенез

Патогенез газовой гангрены, как правило, включает следующие этапы.

1. Загрязнение раны. На характер загрязнения влияют такие факторы, как обсемененность почвы, характер раны, посторонние материалы (загрязненная одежда) и степень тканевой гипоксии. Нарушение кровоснабжения быстро приводит к снижению окислительно-восстановительного потенциала тканей от +170 до +50 милливольт (мВ), развивается анаэробное состояние, что приводит к активному размножению клостридий. Реакции организма на этом этапе ослабляются из-за гипоксии и нарушения питания тканей, нарушенной функции фагоцитов [6].

2. Продуцирование токсина. Как только микробы начинают размножаться, снижение pH и окислительно-восстанови-

тельного потенциала обеспечивают идеальные условия для их роста и продуцирования токсина. Продуцированию токсина способствует также присутствие углеводов, аминокислот (глицин, тирозин) и увеличение содержания электролитов с более высоким соотношением Na:K (2:1) [7–9].

3. Разрушение локальных и окружающих тканей. Быстро, с которой развивается газовая гангрена, предполагает, что задействован сосудистый механизм. Используя экспериментальные модели, D. L. Stevens с коллегами [6, 7, 10] продемонстрировали, что сильная боль, быстрое прогрессирование инфекции, заметное разрушение тканей и отсутствие нейтрофилов при газовой гангрене *C. perfringens* вызвано альфа-токсин-индуцированной окклюзией кровеносных сосудов тромбоцитами и нейтрофилами. Без адекватного тканевого кровоснабжения анаэробная ниша расширяется и, как следствие, происходит быстрое разрушение жизнеспособных тканей. Окклюзией более крупных сосудов, вероятно, объясняется внезапное начало сильной боли у пациентов с газовой гангреной. Для газовой гангрены характерно отсутствие воспалительного ответа в тканях, что объясняется неспособностью преодолеть эндотелиальный барьер нейтрофилами, которые нагружены большим количеством прилипших к ним тромбоцитов.

4. Системная токсичность, включая шок и повреждения органов. Поскольку альфа- и тета-токсины действуют системно, индуцируя выброс цитокинов, они нарушают функции макрофагов, тромбоцитов и эндотелиальных клеток. У пациентов с бактериемией возникает активный внутрисосудистый гемолиз. Кроме того, токсины оказывают глубокое прямое влияние на сердечный выброс, частоту сердечных сокращений и системное сосудистое сопротивление [7–9].

Лечение

Ключевыми элементами лечения газовой гангрены являются хирургическое удаление мертвых тканей, удаление инородного материала и восстановление сосудов. Для предотвращения дальнейшего развития заболевания большую важность имеет антибиотикотерапия. Экспериментальные исследования показали, что антибиотики, ингибирующие синтез белка, более эффективны, чем пенициллин. В частности, исследования на мышах показали, что клиндамицин обладает значительно большей активностью, чем пенициллин, подавляет выработку цитокинов, вызывающих шок и полиорганную недостаточность [6, 10].

Гипербарическая кислородная терапия (гипербарическая оксигенация, ГБО) основывается на способности кислорода, находящегося под большим давлением, тормозить продуцирование летального альфа-токсина, снижать ишемию и отек тканей, улучшать бактерицидный эффект антибиотиков. Гипербарический кислород также увеличивает выработку факторов роста, таких как сосудистый эндотелиальный фактор роста, который способствует неоваскуляризации и восстановлению тканей. ГБО способствовала снижению количества смертельных исходов, процент выживших пациентов увеличился с 50 до 65 [11].

Для лечения газовой гангрены возможно проведение пассивной иммунизации антитоксином — сывороткой противогангренозной поливалентной лошадиной, которая содержит токсиннейтрализующие антитела (антитоксическая сыворотка) против нескольких видов клостридий². В то же время при описании клинических случаев недостаточно информации о применении антитоксической сыворотки. В 2015 г. в украинском

² <https://www.grls.rosminzdrav.ru>

журнале «Острые и неотложные состояния в практике врача» опубликована статья об успешном применении лечебной сыворотки для лечения мионекроза как осложнения боевой травмы [12]. В современных зарубежных рекомендациях по лечению газовой гангрены применение антитоксина не предусмотрено, поскольку ГБО является альтернативой, исключающей побочные реакции от введения антитоксической сыворотки.

Профилактика

В период между Первой и Второй мировыми войнами в США была разработана поливалентная вакцина против *C. histolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum* и *C. perfringens*. В эксперименте было показано, что активная иммунизация увеличивает выживаемость животных. Но масштабная иммунизация людей не проводилась из-за низких титров защитных антител и серьезных побочных реакций.

Объем современных знаний о механизмах инфицирования, о действии токсинов на клеточном уровне дает представление о критической важности профилактики газовой гангрены. Профилактика подразумевает выполнение следующих мероприятий:

- а) надлежащая обработка травм, направленная на снижение возможности развития анаэробных бактерий в поврежденной области, и усиленный контроль за состоянием раны;
- б) тщательное наблюдение за пациентами с окклюзией сосудов, сахарным диабетом и за людьми с ослабленной иммунной системой, санитарно-просветительская работа с подобными пациентами;
- в) недопущение внутрибольничного распространения возбудителей газовой гангрены, особенно в условиях стихийных бедствий (наводнение, ураган) при оказании помощи пострадавшим.

Заболееваемость

Анализ зарубежных и отечественных специализированных изданий и интернет-ресурсов показал, что во всем мире газовая гангрена — редкая инфекция, в основном встречается как осложнение травм. Но участились случаи газовой гангрены среди потребителей инъекционных наркотиков, наблюдается рост случаев газовой гангрены, не связанной с военной травмой. Описаны случаи развития газовой гангрены после открытых переломов, после операции по трансплантации костного мозга, у людей с сахарным диабетом, а также внутрибольничной инфекции. Клиницисты кроме того отмечают проблемы терапии, связанные с растущими показателями антибиотикорезистентности.

Проанализировать заболеваемость мионекрозом в нашей стране затруднительно, поскольку в доступных источниках, посвященных отчетности по заболеваемости и смертности от этой инфекции, данные не отображены.

Далее приведены случаи газовой гангрены, не связанной с военной травмой, и, на наш взгляд, заслуживающие особого внимания.

Клинические случаи газовой гангрены в России. В России в 2012 г. в Оренбурге был зафиксирован случай газовой гангрены как осложнение уличной травмы [13]. У ребенка 11 лет

после падения с велосипеда был диагностирован открытый перелом лучевой и локтевой костей со смещением. Проведена иммобилизация конечности гипсовой лонгетой. Ребенок был отправлен для выздоровления домой. Через 24 ч девочка была доставлена в приемное отделение районной больницы с острой распирающей болью в поврежденной конечности, кистью синюшного оттенка. В отделении реанимации была выполнена фасциотомия предплечья и нижней трети плеча. Через 2 ч поставлен диагноз — газовая гангрена. В результате лечения ребенку была сохранена жизнь ценой ампутации левой верхней конечности. По результатам бактериологического посева из раны была выявлена обсемененность *C. perfringens*. Проведенное расследование показало, что развитие и распространение инфекции произошли в результате ряда ошибок на этапе оказания первичной помощи: помощь оказывали амбулаторно, что недопустимо в детской практике, поскольку все лица с открытыми и закрытыми переломами костей со смещением подлежат госпитализации. Ревизия и первичная хирургическая обработка раны были проведены недостаточно тщательно [13].

В 2015 г. в Свердловской области было зарегистрировано четыре случая внутрибольничного инфицирования газовой гангреной³, в Благовещенске — случай спонтанного мионекроза левого бедра и передней брюшной стенки у пациентки 63 лет, закончившийся летальным исходом [14].

На официальных сайтах двух больниц Чувашской Республики⁴ опубликованы сведения о 21 случае газовой гангрены в период с 1995 по 2015 г., возникших в результате: огнестрельного ранения в живот с повреждением печени и тонкого кишечника, при разрыве прямой кишки у подростка при падении с дерева, при обширном гнойном парапроктите и др. Приведены описания двух случаев лечения резаных ран, полученных при разделке мяса в домашних условиях (повреждение пятого пальца кисти), и на сенокосе (повреждение голени), повлекшие развитие мионекроза. Обе раны не были загрязнены почвой. В обоих случаях проведена ампутация, в послеоперационном периоде — массивная антибактериальная инфузионная терапия, введение поливалентной противогангренозной сыворотки, ГБО. Оба пациента выписаны с выздоровлением.

Клинические случаи газовой гангрены в мире. Согласно данным литературы, в США фиксируют около 1 тыс. случаев мионекроза ежегодно [4]. В период с 1970 по 1980 г. в Европе было зафиксировано 139 случаев заболевания, из них 27 с летальным исходом. В 1990-х гг. в Финляндии были зарегистрированы 52 заболевших, из них 12 умерли. В Германии М. Lehnhardt с коллегами проанализировали случаи осложнений после косметической липосакции за период 1998–2002 гг. Было рассмотрено 72 случая тяжелых осложнений, включая 23 летальных исхода. Наиболее частыми осложнениями были некротический фасциит, газовая гангрена и различные формы сепсиса [15].

В Великобритании с апреля по июнь 2000 г. зафиксировано 23 подтвержденных случая мионекроза [16, 17].

В 2014 г. в Сеуле (Южная Корея) после операции по трансплантации стволовых клеток у пациента развилась газовая гангрена, пациент умер [18, 19].

³ Аналитический обзор о состоянии системы профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в медицинских организациях Свердловской области в 2015 году. Министерство здравоохранения Свердловской области; 2016. <https://minzdrav.midural.ru/uploads/document/2651/otchet-po-vbi-za-2015---mart-2016.pdf>

⁴ Случай выздоровления пациентки с диагнозом анаэробная гангрена. Сборник статей научно-практической конференции к 50-летию Новочебоксарской городской больницы. БУ «Новочебоксарская городская больница» Минздрава Чувашии. <http://www.nchk-gb.med.cap.ru/novietechnologii/nauka-v-zdravoohranenii/spisok-publikacij-sotrudnikov-uchrezhdeniya/sluchaj-vizdorovleniya-pacientki-s-diagnozom-anaerobnoy-gangrayi>

Анаэробная газовая гангрена после первичной хирургической обработки. Пресс-центр. БУ «Козловская центральная районная больница им. И.Е. Виноградова» Министерства здравоохранения Чувашской Республики. <http://www.kozlovka-crb.med.cap.ru/press/2015/12/4/167517>

В 2019 г. опубликованы данные о случае устойчивой газовой гангрены у 17-летней школьницы в Пакистане [20]. Девочка упала в школе со стула на левую руку, получив легкую царапину. Был диагностирован перелом, наложен гипс. Через неделю пациентка почувствовала острую боль. Снятие гипса выявило признаки отека руки и крепитации тканей. Биопсия подтвердила диагноз — газовая гангрена, вызванная *C. perfringens*. На протяжении 22 суток пациентка получала антибиотики внутривенно и *per os*, но ее состояние усугубилось распространением отека и крепитации тканей на лицо, а также все туловище, включая руку и ногу. Родители отказались от ампутации конечности. Было выполнено пять операций по иссечению пораженных тканей, начата ГБО. Через 40 сеансов ГБО состояние девочки улучшилось, но заложенность уха, боль в области шеи и верхних конечностей, а также кровотечения из корней волос не позволяли закончить лечение. На момент публикации статьи (апрель 2019 г.), пациентка получила 139 сеансов ГБО, но ее состояние не изменилось.

Столбняк

В эпоху, предшествующую вакцинации, смертность от столбняка достигала более 99%. В 1924 г. был получен химически инактивированный токсин — анатоксин, введение которого формировало активный иммунитет против болезни. Иммунизация против столбняка столбнячным анатоксином начала широко внедряться в вооруженных силах во время Второй мировой войны. Число случаев столбняка среди этой группы населения уменьшилось с 13,4 на 100 тыс. до 0,44 на 100 тыс. ран и ранений. В конце 1940-х гг. столбнячный анатоксин был введен в программу иммунизации детей. В 1974 г. ВОЗ запустила Расширенную программу иммунизации вакциной против дифтерии, столбняка и коклюша (ДТП/АКДС), что позволило резко снизить заболеваемость. Несмотря на успехи иммунизации, в современном мире столбняк остается угрозой здравоохранению. По оценкам экспертов Европейского центра по контролю и профилактике заболеваний (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC), столбняк является причиной 213–293 тыс. случаев смерти во всем мире ежегодно, 5–7% всех случаев смерти новорожденных, 3,2–5% случаев материнской смерти в мире⁵.

В результате широкого распространения бактерий *C. tetani*, вызывающих столбняк, болезнь не может быть искоренена. *C. tetani* находятся повсеместно в почве, в домашней пыли, а также в экскрементах животных и человека. Споры годами остаются жизнеспособными в окружающей среде и устойчивы к кипячению и замораживанию⁶.

Заболевание вызывают споры *C. tetani*, проникшие в рану мягких тканей. Как только споры прорастают *in vivo*, начинает продуцироваться основной нейротоксин *C. tetani* — тетаноспазмин (также называемый столбнячным нейротоксином TeNT).

Столбнячный токсин является одним из самых сильных токсинов. Он распространяется с кровью и лимфой и захватывается посредством эндоцитоза нервными клетками в нервно-мышечных соединениях, после чего транспортируется центробежно внутри аксонов. Попав внутрь нейронов, столбнячный токсин не может быть нейтрализован антитоксином. Тетаноспазмин действует на четыре области нервной системы: двигательные концевые пластины в скелет-

ной системе, спинной мозг, головной мозг и симпатическую систему. Токсин блокирует высвобождение ингибирующих нейротрансмиттеров глицина и гамма-аминомасляной кислоты в центральной нервной системе, что нарушает процесс передачи нервных импульсов и приводит к мышечным спазмам [21].

Клиника

Основные клинические проявления столбняка:

1) генерализованный столбняк — является наиболее распространенной формой. При генерализованном столбняке симптомы включают тризм, эпистотонус, гримасу на лице (*risus sardonicus*), судороги, скованность спины и шеи, ригидность мышц, дисфагию и беспокойство, возникновение рефлекторных спазмов вследствие незначительных внешних раздражителей, таких как шум, свет или осязание;

2) локализованный столбняк — редкая форма с локализацией в месте проникновения спор бактерий, со слабостью пораженной конечности и в тяжелых случаях с сильными болезненными спазмами;

3) столбняк головного мозга — является результатом инкуляции при травме головы или инфекции среднего уха и проявляется в виде двигательного паралича черепно-мозговых нервов, чаще всего лицевого нерва.

Выделяют также «столбняк матерей» и неонатальный столбняк. Столбняк, возникающий во время беременности или в течение шести недель после окончания беременности, называется «столбняком матерей», а столбняк, возникающий в течение первых 28 дней жизни, называется неонатальным столбняком или «столбняком новорожденного»⁷. Столбняк новорожденного в большинстве случаев является летальным, особенно распространен в труднодоступных и сельских районах, где роды проходят в домашних условиях без соблюдения надлежащих стерильных процедур в условиях загрязненной окружающей среды.

Симптомы столбняка обычно появляются примерно через 7–10 дней после проникновения инфекции в организм. Однако инкубационный период может варьировать от 4 дней до 3 недель, а в некоторых случаях продолжаться несколько месяцев. Существует прямая связь между расстоянием от места раны до центральной нервной системы и степенью проявления клинических симптомов. Чем дальше от центральной нервной системы расположено место травмы, тем дольше инкубационный период. Поскольку не существует надежных диагностических экспресс-тестов, диагноз ставится на основании клинической картины, сведениях о вакцинации. Для подтверждения диагноза проводят посев из раны и тесты на выявление циркулирующего столбнячного токсина и отсутствие антител против столбняка. Получение результатов лабораторных анализов не должно задерживать начало терапии.

Лечение

Лечение столбняка проводится только в условиях стационара и требует неотложной медицинской помощи. Терапевтические мероприятия включают⁸:

- немедленное введение противостолбнячной сыворотки или противостолбнячного иммуноглобулина;
- тщательный уход за раной;
- введение препаратов для купирования мышечных спазмов;
- антибиотикотерапию;

⁵ Disease factsheet about tetanus. Factsheet. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). <https://ecdc.europa.eu/en/tetanus/facts>

⁶ Коротяев АИ, Бабичев СА. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. Учебник для медицинских вузов. СПб.: СпецЛит; 2012.

⁷ Столбняк. ВОЗ; 2018. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/tetanus>

⁸ Там же.

- вакцинацию.

Противостолбнячный иммуноглобулин (человеческий) и противостолбнячная сыворотка (лошадиная) могут нейтрализовать циркулирующий токсин, но они не проникают через гематоэнцефалический барьер и, соответственно, не способны повлиять на уже связанный токсин.

Благодаря надлежащему уходу за раной и применению соответствующих антибиотиков уменьшается продуцирование токсина. Исследования показывают, что люди, которые переболели столбняком, могут заразиться повторно, так как специфический противостолбнячный иммунитет у них не формируется⁹.

Профилактика

Профилактика столбняка разделяется на плановую и экстренную.

Эффективная профилактика столбняка достигается иммунизацией вакцинами, содержащими столбнячный анатоксин. Столбнячный анатоксин чаще всего используется в сочетании с дифтерийным анатоксином и цельноклеточной или бесклеточной коклюшной вакциной. Новые комбинации могут также включать инактивированные полиомиелитные компоненты (IPV), вакцины против гепатита В и/или *Haemophilus influenzae* типа b в качестве тетра-, пента- или гексавалентных вакцин. Столбнячный анатоксин также выпускают в виде монопрепарата.

Трехкратная вакцинация новорожденных обеспечивает трех-пятилетнюю защиту, дальнейшая ревакцинация (например, в раннем детском возрасте 4–7 лет) обеспечивает защиту вплоть до юношеского возраста (12–15 лет)¹⁰. Индуцированный антитоксический столбнячный иммунитет сохраняется до 10 лет, но ослабевает с увеличением возраста, поэтому взрослый человек должен раз в 10 лет получать ревакцинацию. Для ревакцинации применяют препараты: АДС-М-анатоксин, АС-анатоксин (АО «НПО Микроген», Россия) — возможно вводить без возрастных ограничений, вакцину Адасель («Санофи Пастер», Канада), которую допустимо применять у взрослых от 18 до 64 лет¹¹.

Столбняк новорожденного можно предотвратить путем иммунизации женщин репродуктивного возраста. Беременность не является противопоказанием для вакцинации¹².

При наличии загрязненных ран, ран, требующих хирургического вмешательства, ран с задержкой более шести часов после получения травмы, укусов животных и змей, ожогов и травм со значительным повреждением тканей, особенно в местах соприкосновения с почвой или навозом, ран, содержащих инородные тела, сложных переломов, ран или ожогов у септических пациентов, употребляющих инъекционные наркотики с множественными абсцессами кожи, необходима экстренная профилактика столбняка. Выбор схемы экстренной профилактики столбняка зависит от истории вакцинации конкретного пациента и наличия или отсутствия документального подтверждения о вакцинации против столбняка. Пассивная

иммунизация подразумевает введение противостолбнячной сыворотки (ПСС) или иммуноглобулина; активно-пассивная — введения в разные участки тела противостолбнячного человеческого иммуноглобулина (при его отсутствии — ПСС) и столбнячного анатоксина (АС). Экстренная ревакцинация предполагает введение столбнячного анатоксина (или дифтерийно-столбнячного анатоксина с уменьшенным содержанием антигенов — АДС-М) для стимуляции иммунитета у ранее привитых людей¹³.

Иммунизация является единственной эффективной профилактикой столбняка. Столбнячный анатоксин — эффективная, безопасная, стабильная и недорогая вакцина, которую можно вводить во всех возрастных группах, беременным, людям с ослабленным иммунитетом, ВИЧ-инфицированным.

Заболеемость

В странах, в которых национальные программы вакцинации поддерживают высокий уровень охвата иммунизацией населения на протяжении нескольких десятилетий, столбняк является редким заболеванием.

В качестве проблемы общественного здравоохранения в 1989 г. на Всемирной ассамблее здравоохранения была выдвинута цель по глобальной элиминации столбняка новорожденных во всех странах. В 1999 г. ЮНИСЕФ, ВОЗ и Фонд ООН по народонаселению (ЮНФПА) провозгласили Инициативу по элиминации столбняка матерей и новорожденных. На сегодня цель по элиминации столбняка матерей и новорожденных во всех странах не достигнута¹⁴.

В России в период с 2002 по 2006 г. показатель заболеваемости снизился с 0,02 до 0,01 на 100 тыс. населения. С 2002 по 2011 г. от столбняка умерли 70 человек, из них 6 детей. В 2012 г. заболел 21 человек, в том числе ребенок, без летальных исходов [22]. С 2014 г. Роспотребнадзором не зарегистрировано ни одного случая заболевания столбняком¹⁵.

В Европе самый высокий риск заболеваемости столбняком отмечен среди пожилых непривитых или частично привитых людей, людей с диабетом, а также среди потребителей инъекционных наркотиков. В Европейском регионе начиная с 2008 г. ECDC ежегодно регистрирует от 80 до 118 случаев столбняка, из которых около 10% — с летальным исходом. Например, по данным за 2016 г., зарегистрировано 92 случая, из них 13 закончились летально, в 2017 г. — 82 случая, из них 7 с летальным исходом, в 2018 г. — 92 случая, из них 13 с летальным исходом. Ежегодно самое большое число заболевших регистрируют в Италии. В 2016, 2017, 2018 гг. было зарегистрировано 30, 33 и 36 случаев соответственно¹⁶. При этом в Италии все случаи заканчивались выздоровлением. Пик случаев столбняка в Европейском регионе приходится на летне-осенний период (в основном август–сентябрь), когда возрастает активность людей на приусадебных участках и т. п. Более 70% случаев заболевания приходятся на людей

⁹ https://www.who.int/immunization/Tetanus_28May08_RU.pdf

¹⁰ Там же.

¹¹ <https://www.grls.rosminzdrav.ru>

¹² Там же.

¹³ Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 22.10.2013 № 59 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.2.3113-13 «Профилактика столбняка».

¹⁴ <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>

¹⁵ Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. http://rosпотребнадзор.ru/activities/statistical-materials/?PAGEN_1=4

¹⁶ Annual epidemiological report on tetanus. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). <https://www.ecdc.europa.eu/en/tetanus/surveillance-and-disease-data/annual-epidemiological-report>

Surveillance atlas of infectious diseases. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>

старше 65 лет. Некоторые авторы предполагают, что это может быть связано с низкой публичной осведомленностью о риске столбняка после легких травм в случае неполной вакцинации и (или) незнания своего прививочного статуса относительно вакцинации против столбняка.

В США в период с 2009 по 2017 г. было зафиксировано 264 случая столбняка, возраст 60% заболевших — от 20 до 64 лет. Четверть из всех зарегистрированных случаев пришлось на людей в возрасте 65 лет и старше. Из всех заболевших в этот период 13% были больны диабетом, четверть из них погибли от столбняка. Все заболевшие были не привиты или не закончили полный курс иммунизации¹⁷.

В 2017 г. в недельном отчете CDC Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR, США) был подробно описан случай столбняка у ребенка. Случай привлекает внимание тем, что ребенок воспитывался в семье, которая придерживалась антипрививочных взглядов. Мальчик 6 лет поранил лоб, играя на ферме. Рана была очищена и ушита в домашних условиях. Через 6 дней у него начались тризм, непроизвольные мышечные спазмы верхних конечностей, опистотонус, генерализованная спастичность, затруднение дыхания. Мальчик был доставлен самолетом в педиатрический медицинский центр. Был поставлен диагноз — столбняк. Ребенку потребовалось 57 суток неотложной медицинской помощи, в том числе 47 суток в отделении интенсивной терапии. Плата за стационарное лечение составила 811 929 долларов США (без учета расходов на воздушный транспорт, реабилитацию в стационаре и последующие амбулаторные расходы). В период лечения мальчик был иммунизирован вакциной для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша (бесклеточный компонент). Через 1 месяц после стационарной реабилитации он смог бегать и ездить на велосипеде. Несмотря на тщательный анализ рисков и разъяснения преимуществ прививки от столбняка врачами, семья отказалась от второй дозы вакцины и любой другой рекомендованной иммунизации¹⁸.

Этот случай демонстрирует опасную тенденцию к увеличению количества людей, отвергающих успехи и необходимость вакцинации. Всемирная организация здравоохранения включила сознательный отказ от прививок в перечень десяти угроз для глобального здравоохранения в 2019 г.¹⁹

Столбняк остается распространенным явлением в 12 странах, главным образом в Африке и Азии²⁰, с недостаточным охватом иммунизацией, низкой посещаемостью медицинских учреждений дородового ухода, небезопасными традиционными методами ухода за пуповиной (например, присыпание пупочной ранки почвой), а также там, где женщины рожают без помощи квалифицированных специалистов здравоохранения.

Заключение

Обзор данных литературы продемонстрировал, что недопустимо недооценивать возможность возникновения редких, но крайне опасных заболеваний — газовой гангрены и столбняка. Данные заболевания являются инфекциями не только при глубоких и тяжелых травмах, но могут возникать при, казалось бы, незначительных ранах.

Клостридиальный мионекроз может иметь различные проявления и всегда требует интенсивной терапии. Практикующие специалисты всех уровней должны быть знакомы со спектром клинических проявлений газовой гангрены и основными профилактическими мероприятиями, к которым относятся надлежащая обработка травм, знание факторов риска пациента (диабет и т.д.) и, если возможно, быстрое диагностическое тестирование.

Ситуация по заболеваемости столбняком продолжает оставаться актуальной проблемой во всем мире, несмотря на наличие безопасных и эффективных вакцин. Повышенному риску инфицирования в первую очередь подвергаются дети, чьи родители следуют антипрививочным догмам. Также очевидна необходимость поддержания высоких показателей вакцинации во всех возрастных группах, особенно людей старше 65 лет.

Вклад авторов. *Е. И. Комаровская* — анализ данных научной литературы, сбор и обработка материалов, написание текста, редактирование и переработка рукописи; *О. В. Перельгина* — анализ данных научной литературы, доработка и корректировка материалов, окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. *Elena I. Komarovskaya*—scientific literature review; collection and analysis of materials; drafting, editing, and revision of the paper; *Oliga V. Perelygina*—scientific literature review; final approval of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the FSBI "SCEEMP" of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. 121022000147-4).

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

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

Литература/References

1. MacLennan JD. The histotoxic clostridial infections of man. *Bacteriol Rev.* 1962;26(2 Pt 1–2):177–276.
2. MacLennan JD. Anaerobic infections of war wounds in the Middle East. *Lancet.* 1943;242(6256):94–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)87071-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)87071-3)
3. Chen E, Deng L, Liu Z, Zhu X, Chen X, Tang H. Management of gas gangrene in Wenchuan earthquake victims. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2011;31(1):83–7. <https://doi.org/10.1007/s11596-011-0155-3>
4. Buboltz JB, Murphy-Lavoie HM. *Gas Gangrene*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publ. Last update: August 15, 2020.
5. Aldape MJ, Bryant AE, Stevens DL. *Clostridium sordellii* infection: epidemiology, clinical findings, and current perspectives on diagnosis and treatment. *Clin Infect Dis.* 2006;43(11):1436–46. <https://doi.org/10.1086/508866>

¹⁷ About tetanus. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.cdc.gov/tetanus/about/index.html>

¹⁸ Guzman-Cottrill JA, Lancioni C, Eriksson C, Cho Y, Liko J. Notes from the Field: Tetanus in an Unvaccinated Child — Oregon, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2019;68:231–2. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6809a3>

¹⁹ Десять проблем здравоохранения, над которыми ВОЗ будет работать в 2019 году. ВОЗ; 2019. <https://www.who.int/ru/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>

²⁰ Охват иммунизацией. ВОЗ; 2020. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>

6. Stevens DL, Aldape MJ, Bryant AE. Life-threatening clostridial infections. *Anaerobe*. 2012;18(2):254–9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.11.001>
7. Stevens DL, Musher DM, Watson DA, Eddy H, Hamill RJ, Gyorkey F, et al. Spontaneous, nontraumatic gangrene due to *Clostridium septicum*. *Rev Infect Dis*. 1990;12(2):286–96. <https://doi.org/10.1093/clinids/12.2.286>
8. Asmuth DM, Olson RD, Hackett SP, Bryant AE, Tweten RK, Tso JY, et al. Effects of *Clostridium perfringens* recombinant and crude phospholipase C and theta-toxins on rabbit hemodynamic parameters. *J Infect Dis*. 1995;172(5):1317–23. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.5.1317>
9. Bryant AE, Bergstrom R, Zimmerman GA, Salyer JL, Hill HR, Tweten RK, et al. *Clostridium perfringens* invasiveness is enhanced by effects of theta toxin upon PMNL structure and function: the roles of leukocytotoxicity and expression of CD11/CD18 adherence glycoprotein. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993;7(4):321–36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1993.tb00414.x>
10. Stevens DL, Bryant AE, Hackett SP. Antibiotic effects on bacterial viability, toxin production, and host response. *Clin Infect Dis*. 1995;20(Suppl 2):S154–7. https://doi.org/10.1093/clinids/20.Supplement_2.s154
11. Korhonen K, Klossner J, Hirn M, Niinikoski J. Management of clostridial gas gangrene and the role of hyperbaric oxygen. *Ann Chir Gynaecol*. 1999;88(2):139–42.
12. Мальцева ЛА, Мосенцев НФ, Лисничая ВН. Особенности анаэробной инфекции, ассоциированной с боевой травмой. *Гострі та невідкладні стани у практиці лікаря*. 2015;(5):28–30. [Maltseva LA, Mosentsev NF, Lisnichaya VN. Features of anaerobic infection associated with combat trauma. *Hostrі ta nevidkladni stany u praktytsi likaria = Acute Conditions and Emergencies in Medical Practice*. 2015;(5):28–30 (In Russ.)]
13. Мельцин ИИ, Никитенко ВИ, Афуков ИВ, Котлубаев РС, Арестова СВ, Куркин АП и др. Клинический случай открытого перелома обеих костей предплечья, осложненного анаэробной клостридиальной инфекцией, газовой гангреной смешанной формы, у ребенка 11 лет. *Детская хирургия*. 2014;18(5):51–2. [Mel'tsin II, Nikitenko VI, Afukov IV, Kotlubaev RS, Arestova SV, Kurkin AP, et al. A clinical case of open fracture of both forearm bones complicated by anaerobic clostridial infection and mixed gas gangrene in an 11 year-old child. *Detskaya khirurgiya = Russian Journal of Pediatric Surgery*. 2014;18(5):51–2 (In Russ.)]
14. Фигурнов ВА, Григоренко АА. Случай газовой гангрены. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2016;175(5):92–3. [Figurnov VA, Grigorenko AA. A case of gas gangrene. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Grekov's Bulletin of Surgery*. 2016;175(5):92–3 (In Russ.)]
15. Lehnhardt M, Homann HH, Daigeler A, Hauser J, Palka P, Steinau HU. Major and lethal complications of liposuction: a review of 72 cases in Germany between 1998 and 2002. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(6):396e–403e. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318170817a>
16. McGuigan CC, Penrice GM, Gruer L, Ahmed S, Goldberg D, Black M, et al. Lethal outbreak of infection with *Clostridium novyi* type A and other spore-forming organisms in Scottish injecting drug users. *J Med Microbiol*. 2002;51(11):971–7. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-11-971>
17. Jones JA, Salmon JE, Djuretic T, Nichols G, George RC, Gill ON. An outbreak of serious illness and death among injecting drug users in England during 2000. *J Med Microbiol*. 2002;51(11):978–84. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-11-978>
18. Debata NK, Chander Y, Singh L, Ohri VC, Singh G, Nesargi SS, Galgali A. Investigation of a case of clostridial myonecrosis. *Med J Armed Forces India*. 1998;54(1):55–6. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(17\)30412-4](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(17)30412-4)
19. Hanganu B, Neagu M, Manolescu I, Velnic A, Ioan BG. Gas gangrene: case presentation and literature data. *J Surgery*. 2017;13(4):139–42. <https://doi.org/10.7438/1584-9341-13-4-7>
20. Hassan S, Akhtar A, Khan M, Sheikh FN, Asghar H. “Frightening” resistant clostridial myonecrosis: a case report. *Cureus*. 2019;11(4):e4539. <https://doi.org/10.7759/cureus.4539>
21. Pellizzari R, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999;354(1381):259–68. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0377>
22. Якимова ТН, Максимова НМ, Маркина СС, Яцковский КА, Жилина НЯ. Состояние противостолбнячного антитоксического иммунитета у населения Российской Федерации в настоящее время. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013;(5):54–9. [Yakimova TN, Maximova NM, Markina SS, Yatskovsky KA, Zhilina NY. The present level of the tetanus antitoxic immunity among population of the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2013;(5):54–9 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Комаровская Елена Игоревна. Elena I. Komarovskaya. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9035-6072>

Перельгина Ольга Викторовна, канд. мед. наук. Olga V. PereLygina, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5029-3751>

Поступила 04.08.2020

После доработки 01.02.2021

Принята к публикации 26.02.2021

Received 4 August 2020

Revised 1 February 2021

Accepted 26 February 2021

Лекарственные препараты фактора VIII, актуальные вопросы разработки, клинического исследования и применения (часть 1)

Ж. И. Авдеева^{1,*}, А. А. Солдатов¹, В. П. Бондарев¹, В. Д. Мосягин¹, В. А. Меркулов^{1,2}

¹ 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

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

По информации Всемирной федерации гемофилии, в настоящее время в мире насчитывается около 400 тыс. пациентов с заболеванием гемофилией. Тяжелые клинические проявления заболевания, связанные с генетически детерминированным дефицитом активности фактора свертывания крови, требуют проведения постоянной заместительной терапии препаратами свертывания крови. Длительное применение препаратов белковой природы часто приводит к формированию специфических антител, что вызывает снижение или потерю эффективности лекарственного препарата или является причиной выраженных побочных реакций, вплоть до анафилаксии. В связи с этим актуальным является поиск новых оптимальных подходов к способам лечения гемофилии, что требует разработки новых лекарственных препаратов факторов свертывания крови и совершенствования технологии производства ранее зарегистрированных препаратов, а так и использования препаратов «нефакторной» терапии. Цель работы — представление результатов анализа актуальных вопросов, касающихся разработки и особенностей плазменных и рекомбинантных лекарственных препаратов фактора VIII, новых подходов к лечению гемофилии А, в том числе и использования препаратов «нефакторной» терапии. В обзоре представлены обобщенные современные данные об этиологии, клинических проявлениях, осложнениях, связанных с проводимой терапией гемофилии А. Приведены сведения о лекарственных препаратах факторов свертывания крови (плазменных и рекомбинантных), используемых в качестве заместительной терапии при указанной патологии. Отражены сведения о перспективных разработках новых лекарственных препаратов, базирующихся на современных достижениях биотехнологии. Имеющиеся разработки открывают перспективы успешного применения таких препаратов в клинической практике.

Ключевые слова: гемофилия А; фактор свертывания крови VIII; препараты фактора VIII (препараты плазмы крови, рекомбинантные); новые подходы к терапии гемофилии

Для цитирования: Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Бондарев ВП, Мосягин ВД, Меркулов ВА. Лекарственные препараты фактора VIII, актуальные вопросы разработки, клинического исследования и применения (часть 1). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(1):39–49. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-39-49>

* **Контактное лицо:** Авдеева Жанна Ильдаровна; Avd-cytok@yandex.ru

Factor VIII products: key aspects of development, clinical research and use (part 1)

Zh. I. Avdeeva^{1,*}, A. A. Soldatov¹, V. P. Bondarev¹, V. D. Mosyagin¹, V. A. Merkulov^{1,2}

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University,
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

According to the World Federation of Hemophilia (WFH), there are currently about 400 thousand patients with hemophilia in the world. Severe clinical manifestations of the disease associated with a genetically determined deficiency of blood clotting factor activity require continuous replacement therapy with blood clotting medicines. Long-term use of protein-based medicines often leads to the formation of specific antibodies, which causes a decrease in or loss of efficacy of the medicine or results in severe adverse reactions, including anaphylaxis. Therefore, it is important to search for new optimal approaches to hemophilia treatment, which requires the development of new blood clotting factor products, improvement of the production technology for already authorised products, as well as the use of non-factor products. The aim of the study was to present the results of the analysis of key issues related to the development and characteristics of plasma-derived and recombinant factor VIII products, new approaches to hemophilia A treatment, including the use of non-factor products. The review summarises current data on the etiology, clinical manifestations, and complications of hemophilia A treatment. It provides information on the blood clotting factor products (plasma-derived and recombinant) used as replacement therapy. It also provides information on advanced research projects for the development of new biotechnology-derived products which have good prospects of successful clinical use.

Key words: hemophilia A; coagulation factor VIII; factor VIII products (blood plasma products, recombinant products); new approaches to hemophilia treatment

For citation: Avdeeva ZH, Soldatov AA, Bondarev VP, Mosyagin VD, Merkulov VA. Factor VIII products: key aspects of development, clinical research and use (part 1). *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(1):39–49. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-39-49>

* **Corresponding author:** Zhanna I. Avdeeva; Avd-cytok@yandex.ru

Гемофилия является одним из орфанных заболеваний. В настоящее время согласно информации Всемирной федерации гемофилии в мире насчитывается около 400 тыс. пациентов с указанным заболеванием¹. Количество пациентов, включенных в Федеральный регистр по нозологии «гемофилия» по всем субъектам Российской Федерации, по состоянию на середину 2020 г. составляет 9400 человек, из которых 6328 — пациенты с гемофилией А². Клиническая картина указанного заболевания обусловлена проявлением патологических изменений в системе свертывания крови пациентов за счет нарушения процесса тромбопластинообразования. Тяжелые клинические проявления заболевания и последующие осложнения требуют проведения постоянной заместительной терапии препаратами свертывания крови, поскольку развитие гемофилии А связано с генетически детерминированным дефицитом активности фактора свертывания крови. Возмещение фактора свертывания обеспечивает сохранение жизни и трудоспособности пациентов. Однако длительное введение препаратов белковой природы часто сопровождается формированием антител, так называемых ингибирующих антител, которые нейтрализуют специфическое действие лекарственного препарата или вызывают аллергические реакции вплоть до анафилаксии. В связи с этим актуальным является поиск новых оптимальных подходов к способам лечения гемофилии, что требует разработки новых лекарственных препаратов факторов свертывания крови и совершенствования технологии производства ранее зарегистрированных препаратов. При этом необходимо учитывать, что особые оптимальные способы лечения требуются для пациентов, у которых сформировались АТ к препарату в процессе проводимой терапии.

Цель работы — представление результатов анализа актуальных вопросов, касающихся разработки и особенностей плазмменных и рекомбинантных лекарственных препаратов фактора VIII, новых подходов к лечению гемофилии А, в том числе и использования препаратов «нефакторной» терапии.

Общие положения

В основе механизмов, определяющих развитие гемофилии, лежат нарушения генов, кодирующих факторы свертывания крови, что является причиной снижения продукции факторов коагуляции крови (VIII, IX или XI) или полное отсутствие их синтеза. Гены, кодирующие продукцию факторов VIII и IX (Xq28 и Xq27 соответственно), локализованы в X-хромосоме, их мутация и обуславливает развитие указанной наследственной патологии. Также причиной развития гемофилии может быть не наследственная, а спонтанная мутация генов, кодирующих продукцию VIII или IX факторов коагуляции крови³. Это отмечают у одной трети пациентов с данной патологией.

Выделяют три типа гемофилии: гемофилия типа А встречается наиболее часто (в 85% всех случаев), обусловлена дефицитом фактора VIII (FVIII); гемофилия типа В встречается в 13% случаев, обусловлена недостаточной активностью фактора IX (FIX); гемофилия типа С наблюдается в 1–2% случаев, развивается из-за недостаточности фактора XI (FXI). Все типы гемофилии характеризуются сходной клинической симптоматикой, однако для проведения адекватной терапии необходимо установление четкого диагноза.

Основным клиническим проявлением гемофилии является склонность к спонтанным или вызванным травмой наружным или внутренним кровотечениям. У пациентов часто развиваются подкожные или внутримышечные гематомы, кровоизлияния в суставы даже при незначительных травмах, реже кровоизлияния в брюшную полость, желудочно-кишечные кровотечения, формирование забрюшинных гематом, гематурия и др. При хирургическом вмешательстве, травме возможны обширные кровотечения, которые могут привести к тяжелым последствиям вплоть до летального исхода. Частота встречаемости кровоизлияний в различных участках тела приведена в таблице 1. Наиболее подробно информация

Таблица 1. Частота встречаемости кровотечений при гемофилии⁴

Table 1. Frequency of bleedings in hemophilia⁴

Локализация кровоизлияний Site of bleeding	Частота встречаемости, % Frequency, %
Гемартрозы (кровоизлияния в суставы, чаще голеностопный, коленный и локтевой, реже плечевой, запястный и тазобедренный) Hemarthroses (joint bleedings; more common in ankles, knees, elbows, less common in shoulders, wrists, and hips)	70–80
Гематомы (кровоизлияния в мышечную ткань) Hematomas (muscle hemorrhage)	10–20
Другие тяжелые кровотечения Other sites (major bleeds)	5–10
Кровоизлияния в центральную нервную систему Central nervous system	менее 5 lower than 5

¹ Report on the Annual Global Survey 2019. World Federation of Hemophilia. <https://elearning.wfh.org/resource/report-on-the-annual-global-survey-2019/>

Пресс-релиз к Всемирному дню гемофилии 2020. Всероссийское общество гемофилии; 2020. <https://hemophilia.ru/news/1147-press-reliz-vserssijskogo-obschestva-gemofilii-k-vsemirnomu-dnju-gemofilii.html>

² Пресс-релиз к Всемирному дню гемофилии 2020. Всероссийское общество гемофилии; 2020. <https://hemophilia.ru/news/1147-press-reliz-vserssijskogo-obschestva-gemofilii-k-vsemirnomu-dnju-gemofilii.html>

³ Воробьев АИ, Андреев ЮН, Баркаган ЗС, Буланов АЮ. Руководство по гематологии. 3-е изд. Т. 3. М.: Ньюдиамед; 2005.

Румянцев АГ, Румянцев СА, Чернов ВМ. Гемофилия в практике врачей различных специальностей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.

Рукавицын ОА, ред. Гематология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017.

⁴ Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd ed. *Hemophilia*. 2020;26(Suppl 6):1–158. <https://doi.org/10.1111/hae.14046>

об указанном заболевании приведена в ряде отечественных руководств, международных документах, работах отечественных и зарубежных авторов [1–9].

Ранее нами опубликована статья по вопросам, связанным с гемофилией типа В [10], в настоящем обзоре приведены данные анализа наиболее дискуссионных вопросов, связанных с наиболее часто встречающимся типом гемофилии — гемофилией типа А.

Гемофилия типа А, вопросы патогенеза

Гемофилию типа А относят к классическому типу гемофилии. Заболевание обусловлено дефицитом FVIII, который отсутствует в крови пациентов полностью или находится в функционально неполноценной форме и не может принимать участия в свертывании крови за счет нарушения образования активной тромбоназы. Дефицит FVIII (гемофилия А) встречается у 1 из 5–10 тыс. новорожденных.

В зависимости от тяжести клинических проявлений выделяют легкую, умеренную и тяжелую формы заболевания, что связано со степенью нарушения коагуляционной активности фактора свертывания крови, то есть остаточной активностью FVIII в плазме крови⁵.

У пациентов с легкой формой клинические проявления заболевания в виде кровотечений отмечаются, как правило, в школьном возрасте и только после полученных травм или хирургических вмешательств. При этом кровотечения обычно менее интенсивные и наблюдаются реже, чем при более тяжелых формах заболевания. Уровень активности фактора свертывания крови составляет более 5% от нормы, при этом у одной трети пациентов уровень активности FVIII — от 25 до 49%.

У пациентов со среднетяжелой формой клинические симптомы развиваются в дошкольном возрасте. Проявления геморрагического синдрома (кровотечения в мышцы и суставы), как правило, выражены умеренно, обширные гематомы развиваются только в результате значительных травм. Обострения заболевания отмечаются с частотой 2–3 раза в год, уровень активности фактора свертывания крови составляет от 1 до 5% от нормального.

Среди всех диагностируемых случаев гемофилии в 60–70% заболевание протекает в тяжелой форме, при этом проявления тяжелого геморрагического синдрома отмечают у детей начиная с первых дней и месяцев жизни. Симптоматика заболевания включает кровотечения из пупочной раны, десен (при прорезывании и смене молочных зубов), в месте инъекции; периодические спонтанные кровотечения в суставы, что сопровождается развитием гемартрозов; развитие гематом мягких тканей; послеоперационные кровотечения; желудочно-кишечные и внутримозговые кровоизлияния. Уровень активности фактора свертывания крови составляет менее 1% от нормального уровня.

Фактор VIII (антигемофильный глобулин А) синтезируется в печени, селезенке, клетках эндотелия, лейкоцитах, почках и принимает участие в первой фазе плазменного гемостаза (протромбинаобразования). Ген FVIII расположен на длинном плече хромосомы X (Xq28). Содержание FVIII в плазме — 0,01–0,02 г/л, средний период полужизни в кровотоке составляет ≈12 ч. Процент активности FVIII в плазме здорового человека составляет 70–150% (от нормы); минимальный уровень, необходимый для гемостаза, — 20–35%.

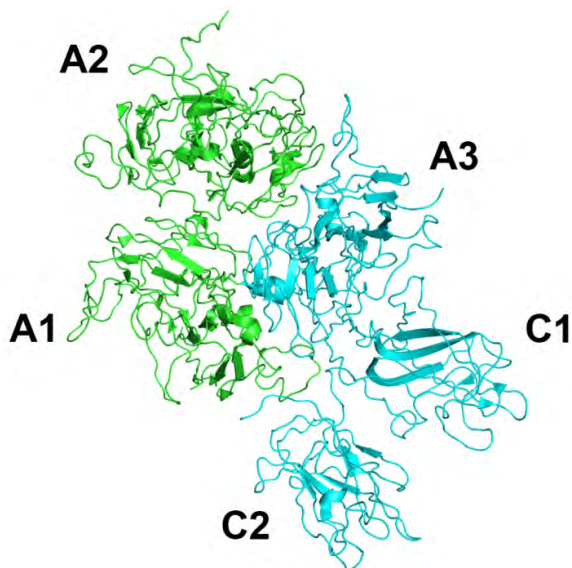


Рис. 1. Структура молекулы фактора VIII⁶. A1, A2 — домены тяжелой цепи; A3, C1, C2 — домены легкой цепи.
Fig. 1. Factor VIII molecular structure⁶. A1, A2—heavy chain domains; A3, C1, C2—light chain domains.

Молекулярная масса гликопротеина FVIII составляет приблизительно 280 кДа. Молекула FVIII представляет собой гетеродимер (рис. 1), состоящий из легкой цепи (доменов A3, C1 и C2), тяжелой цепи (доменов A1 и A2) и домена В.

FVIII является важным кофактором для активации FX активированным FIX (FIXa). Прежде чем FVIII станет физиологически активным, его молекула должна подвергнуться протеолитическому расщеплению в двух различных участках под действием тромбина.

В нормальных условиях FVIII циркулирует в плазме крови в виде комплекса, состоящего из трех субъединиц, обозначаемых VIII-к (коагулирующая единица), VIII-АГ (основной антигенный маркер) и VIII-фВ (фактор Виллебранда, связанный с VIII-АГ). VIII-фВ регулирует синтез коагуляционной части антигемофильного глобулина (VIII-к) и участвует в сосудистотромбоцитарном гемостазе.

Фактор Виллебранда (vWF) — антигеморрагический сосудистый фактор, синтезируется клетками эндотелия сосудов и мегакариоцитами, содержится в плазме и в тромбоцитах, служит внутрисосудистым белком-носителем для FVIII. Около 95% FVIII связано с vWF, который стабилизирует молекулу FVIII, защищает ее от протеолиза, увеличивая период полувыведения из сосудистого русла, и способствует транспорту к месту повреждения [3, 4, 8, 9]. Комплекс FVIII с фактором vWF формируется за счет нековалентного взаимодействия между FVIII-C1, -C2 и -A3 доменами и D'D3 регионом vWF [9, 11].

Формирование комплекса FVIII/vWF играет важную роль в проявлении физиологической активности FVIII; при участии тромбина и ионов Ca²⁺ происходит активация FVIII, который усиливает действие активированного FIX (FIXa), ускоряя переход FX в активную форму (FXa). Связывание vWF с FVIII увеличивает период полувыведения последнего не только за счет указанных выше факторов, но также и за счет подавления LRP-рецептор-

⁵ Клинические рекомендации «Гемофилия» (утв. Минздравом России). Год утверждения (частота пересмотра): 2018 (пересмотр не реже 1 раза в 3 года).

⁶ Hemlibra® (emicizumab-kxwh) for the treatment of haemophilia A with inhibitors. <https://www.clinicaltrialsarena.com/projects/hemlibra-emicizumab-kxwh-treatment-haemophilia-inhibitors/>

Mattkosloski [CC BY 3.0], via Wikimedia Commons. https://en.wikipedia.org/wiki/Factor_VIII#/media/File:Fviii_2R7E.png

опосредованного клиренса. Кроме того, vWF защищает FVIII от эндцитоза дендритными клетками с последующей презентацией клеткам иммунной системы, тем самым препятствует формированию иммунного ответа на антигенные сайты FVIII [12–14].

Следует отметить, что vWF, находясь в комплексе с FVIII, экранирует известные потенциальные сайты связывания, локализованные на тяжелой (домен A2) и легкой цепи (A3/C2 домен) молекулы FVIII, препятствуя взаимосвязи с иАТ, что очень существенно при наличии АТ к FVIII у пациентов с ингибиторной формой гемофилии.

В крови пациентов с гемофилией А FVIII отсутствует (в 90–92% случаев) или находится в функционально неполноценной форме (в 8–10% случаев), которая не может принимать участия в свертывании крови. У пациентов с гемофилией при резко сниженном содержании в плазме крови субъединицы VIII-к концентрация vWF находится в пределах нормы. В связи с этим продолжительность кровотечения при гемофилии А находится в пределах нормы, а при болезни Виллебранда длительность кровотечения увеличена.

Изменение в содержании и нарушении активности FVIII наблюдается не только при гемофилии А. Так, отчетливое снижение активности FVIII отмечается при ДВС-синдроме начиная со II стадии вследствие коагулопатии потребления. Содержание FVIII снижается при болезни Виллебранда, а также при формировании ингибиторов — специфических АТ к FVIII, на фоне проводимой терапии препаратами, полученными из плазмы крови или рекомбинантными. Тяжелые заболевания печени также могут привести к снижению содержания FVIII в крови. Известно, что активность FVIII значительно повышается после спленэктомии⁷.

Разработка лекарственных препаратов и способов лечения пациентов с гемофилией А

Для лечения гемофилии в качестве заместительной терапии используют препараты, которые получают из плазмы крови доноров (концентраты на основе плазмы крови), а также биотехнологические лекарственные препараты.

Известно, что ранее используемые криопреципитаты и лиофилизированные концентраты факторов свертывания крови, произведенные из плазмы, полученной путем объединения от значительного числа доноров, стали причиной инфицирования пациентов с гемофилией ВИЧ, а также вирусами гепатитов В и С. Высокая частота передачи ВИЧ с препаратами крови привела в начале 1980-х гг. к инфицированию 60–70% пациентов с тяжелой формой гемофилии; при этом почти все пролеченные пациенты были также инфицированы вирусом гепатита С (в то время называемым вирусом гепатита ни А, ни В) [15].

Указанная трагическая ситуация послужила мощным стимулом к разработке высокоэффективных способов инактивации и элиминации вирусов при производстве плазменных препаратов факторов свертывания крови. С конца 1980-х гг. случаев заражения ВИЧ пациентов с гемофилией за счет использования препаратов плазменного происхождения не на-

блюдалось. Рекомендации по обеспечению безопасности в процессе производства таких препаратов представлены в международных⁸ и отечественных документах, а также отражены в научных сообщениях ряда авторов [15–18].

Вопросам совершенствования способов инактивации потенциальной вирусной контаминации плазменных препаратов для обеспечения минимизации рисков передачи вирусной инфекции уделяется внимание и в настоящее время.

На основе использования достижений молекулярной биологии в 1984 г. был клонирован ген фактора свертывания крови VIII, что послужило основой для разработки препаратов на основе рекомбинантного белка FVIII (rFVIII). Первый лекарственный препарат rFVIII был зарегистрирован и получил одобрение Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (FDA) в 1992 г.

Препараты первого поколения получены путем встраивания полной последовательности кДНК FVIII в вектор экспрессии, в результате чего клетки-продуценты синтезировали полноразмерный рекомбинантный белок FVIII человека. Однако экспрессия целевого белка при ферментации была очень низкой, поскольку молекула фактора оставалась связанной с мембраной клеток-продуцентов (клетки CHO) и в итоге подвергалась деградации. Вскоре после разработки первого рекомбинантного препарата FVIII начали разрабатывать рекомбинантные препараты FVIII второго и третьего поколения. К препаратам второго поколения относят препараты на основе рекомбинантного белка FVIII с удаленным В-доменом. При этом удаление из конструкции кДНК последовательности В-домена привело к усилению экспрессии целевого белка в 20 раз. Следует отметить, что удаление В-домена не нарушает прокоагулянтную активность FVIII; молекулы FVIII с удаленным В-доменом обладают неизменной прокоагулянтной активностью по сравнению с полноразмерным FVIII [19, 20].

Разработка новых биотехнологических лекарственных препаратов, в том числе и препаратов на основе белка FVIII с модифицированной последовательностью аминокислот, продолжается и в настоящее время.

Условия производства биотехнологических лекарственных препаратов регламентируются требованиями GMP, включая требования к обеспечению вирусной безопасности, которые представлены в ряде отечественных и международных документов⁹.

Перспективные разработки новых биотехнологических лекарственных препаратов на основе фактора VIII и разработка альтернативных подходов к лечению пациентов с гемофилией

Лечение пациентов с гемофилией за последние 50 лет значительно улучшилось. Это связано с разработкой и внедрением новых лекарственных препаратов, начиная от концентратов плазмы крови и очищенных белков, выделенных из плазмы, до препаратов, полученных с использованием технологии рекомбинантных ДНК, включая препараты на основе модифи-

⁷ Методы оценки системы гемостаза. Учебное пособие для врачей. Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России; 2013. <http://library.bashgu.ru/elibdoc/elib556.pdf>

⁸ Guidance on plasma-derived medicinal products (EMA/CHMP/BWP/706271/2010). EMA; 2011.

⁹ Q5A (R1) Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. ICH; 1999. <https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/MEDIA425.pdf>

Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95). EMEA; 1996.

Guideline on virus safety evaluation of biotechnological investigational medicinal products (EMA/CHMP/BWP/398498/2005). EMEA; 2008.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

цированных белков с увеличенным периодом полувыведения, препараты белков слияния (fusion proteins) и др.

Продолжаются исследования по разработке лекарственных препаратов, обеспечивающих альтернативный подход для лечения гемофилии за счет восстановления гемостатического баланса путем вмешательства в процесс коагуляции. Указанная стратегия лечения, обозначаемая термином «нефакторная терапия» (nonfactor therapy, NFT), базируется на использовании препаратов, обеспечивающих прокоагулянтный профилактический эффект без замещения отсутствующего фактора свертывания крови, таких как FVIII-миметики, препараты-ингибиторы эндогенных антикоагулянтов, аптамеры и др. [21–25].

Основные проблемы, которые должны быть решены при разработке новых препаратов для лечения пациентов с гемофилией — снижение частоты дозирования препарата и снижение его иммуногенного потенциала. Все традиционные препараты FVIII, несмотря на значительный прогресс в лечении гемофилии, характеризуются приблизительно одинаковыми параметрами фармакокинетики (ФК). Период полувыведения таких препаратов, как правило, колеблется от 8 до 14 ч, что требует при проведении профилактической терапии введения препарата не реже 3–4 раз в неделю. Отмечают, что период полувыведения одного и того же препарата у различных пациентов находится в пределах от 6 до 24 ч. Решающее значение на сроки циркуляции FVIII имеет фоновое значение уровня vWF; при этом период полувыведения FVIII коррелирует с уровнями vWF в циркуляции до инфузии лекарственного препарата. Некоторые авторы высказывают предположение о возможной взаимосвязи вариабельности фармакокинетических показателей препарата FVIII у отдельных пациентов не только с особенностями клиренса эндогенного vWF, но и с группой крови, объемом распределения, ассоциированным с возрастом, а также тяжестью клинических проявлений заболевания. Так, имеются сообщения о том, что у пациентов с группой крови 0 может наблюдаться более короткий период полувыведения FVIII [26, 27].

Необходимость частого введения препарата создает трудности в проведении профилактической терапии пациентов с гемофилией. Часть из них, особенно в подростковом возрасте, переходит на режим неотложного лечения по требованию, то есть на режим введения препарата только с целью купирования кровотечения. Это сопровождается неблагоприятным течением заболевания и развитием осложнений в виде артропатии и др. Особенно остро данный вопрос касается пациентов младшего детского возраста, поскольку в ряде случаев для частого введения препарата может потребоваться имплантация устройства центрального венозного доступа (ЦВД), что сопровождается риском развития инфекций и тромбоэмболических осложнений. Проблема венозного доступа особенно актуальна для пациентов с ингибиторной формой гемофилии [28–30].

На основе современных достижений продолжают исследования по разработке модифицированных биотехнологических препаратов, характеризующихся увеличенным периодом полувыведения, что позволяет оптимизировать схему лечения путем введения препарата с большим интервалом между инъекциями [31].

Удлинение срока циркуляции препарата может быть достигнуто путем химической модификации молекулы фактора свертывания крови, слияния терапевтического белка с белком, имеющим более длительный период полувыведения (например, с Fc-фрагментом иммуноглобулина G (IgG-Fc), альбумином или vWF), а также за счет изменения структуры молекулы фактора свертывания крови [32–35].

Химическая модификация молекулы FVIII за счет конъюгации с полиэтиленгликолем (ПЭГ) продлевает период полувыведения и время циркуляции терапевтического белка за счет увеличения размера молекулы и, как следствие, уменьшения клиренса препарата FVIII через почки. Сайт-специфическое или сайт-неспецифическое пегилирование проводят, используя ПЭГ с молекулярной массой 20, 40 или 60 кДа [36–38].

Разработаны и находятся на этапе клинических исследований рекомбинантные препараты на основе белков слияния (fusion proteins), например с Fc-фрагментом иммуноглобулина (FVIII/IgG-Fc). Увеличение периода полувыведения препарата в таком случае обусловлено способностью модифицированной молекулы FVIII взаимодействовать с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) за счет Fc-фрагмента IgG [39–43].

Независимо от используемой стратегии по модификации белка FVIII увеличение периода полувыведения достигается приблизительно только в 1,5 раза, что позволяет снизить частоту инфузии до двух раз в неделю. Следует отметить, что для FIX подобные модификации молекулы позволяют увеличить период полувыведения до 2,5 раз. Выяснение причины влияния таких различий на пролонгацию полувыведения указанных белков является предметом постоянных научных исследований.

Проводятся исследования препаратов с модифицированной структурой молекулы FVIII, в частности разработан препарат на основе рекомбинантного FVIII с усеченным В-доменом, полученным из последовательности, кодирующей 10 аминокислот из N-конца и 11 аминокислот из C-конца естественного В-домена (trigostocog alfa). Молекулярная структура белка с удаленным В-доменом повышает ее стабильность, обеспечивает необходимую оптимальную протеолитическую активацию FVIII тромбином, а также более прочное связывание с vWF, что позволяет применять препарат в качестве заместительной терапии FVIII у пациентов с гемофилией А [44].

Проводятся исследования рекомбинантного препарата на основе одноцепочечного FVIII [45, 46]. Известно, что FVIII процессируется и секретируется как гетеродимер, состоящий из легкой и тяжелой цепей, соединенных мостиком из ионов металлов. При определенных условиях эта структура может диссоциировать, в результате чего формируются неактивные цепи FVIII. Проведены доклинические сравнительные исследования разработанного одноцепочечного FVIII (rVIII-SingleChain) с полноразмерным рекомбинантным FVIII на экспериментальных животных — мышах с гемофилией А и мышах, нокаутированных по vWF, крысах, кроликах и обезьянах *Synomolgus*. Анализ результатов изучения препаратов показал, что одноцепочечный FVIII характеризуется выраженной гемостатической эффективностью и хорошей переносимостью, проявляя более благоприятные фармакокинетические и фармакодинамические (ФК/ФД) свойства в опытах на различных видах экспериментальных животных. Отмечено, что ФД эффективность сопоставима с полноцепочечным и лишённым В-домена рекомбинантным FVIII. Исследованиями методом плазмонного резонанса установлено, что одноцепочечный FVIII имеет более высокую степень аффинности к vWF по сравнению с полноразмерным рекомбинантным FVIII, что объясняет улучшенные ФК параметры исследуемого белка [45, 46].

Новый подход к лечению гемофилии включает разработку препаратов, принцип механизма действия которых отличается от действия препаратов заместительной терапии. Такие препараты активируют систему каскада свертывания крови или оказывают подавляющее действие на активность факторов противосвертывающей системы гемостаза. К таким препара-

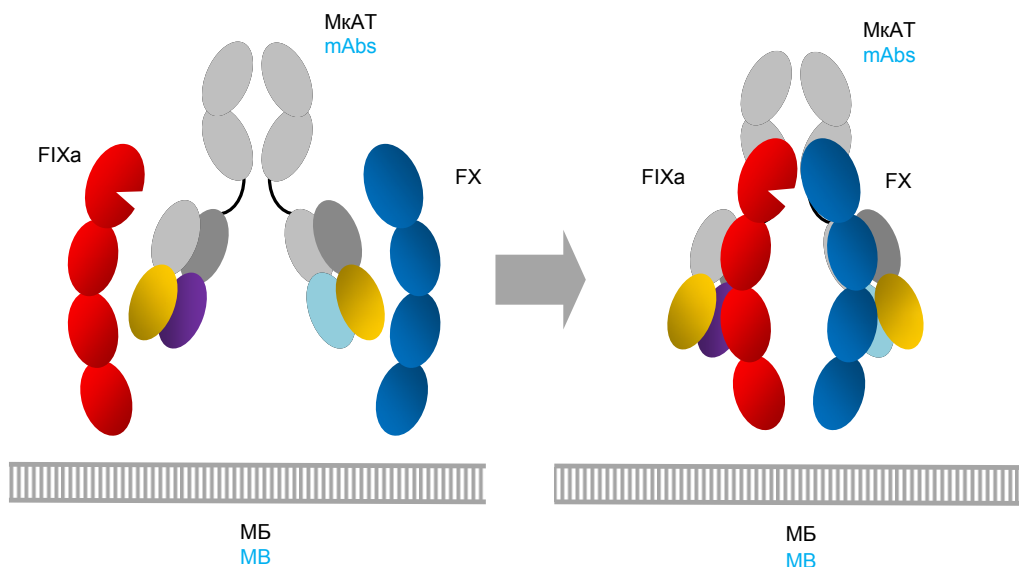


Рис. 2. Механизм имитации функции активированного FVIII биспецифичными МкАТ, специфичными к FIXa и FX. FIXa, FX — факторы свертывания крови; МБ — фосфолипидная мембрана¹⁰.
Fig. 2. The mechanism of mimicking the function of activated FVIII by anti-FIXa/FX bispecific mAbs. FIXa, FX—blood coagulation factors; MB—phospholipid membrane¹⁰.

там, которые включают в терапию пациентов с гемофилией, относятся препараты МкАТ, блокаторы ингибитора пути тканевого фактора, блокаторы антитромбина III, аптамеры и др.

Разработаны рекомбинантные гуманизированные биспецифичные МкАТ (эмицизумаб) на основе иммуноглобулина G4 (IgG4), которые способны связывать FIXa и FX. Известно, что FVIII является важным кофактором для активации FX активированным FIX (FIXa). Указанные МкАТ характеризуются FVIIIa-кофакторной активностью, поскольку они, связывая активированный FIX с FX, восполняют функцию отсутствующего активированного FVIII, который необходим для эффективного гемостаза [47–52].

На рисунке 2 представлена схема механизма имитации функции активированного FVIII (кофактора FVIIIa) биспецифичными МкАТ, специфичными к FIXa и FX.

Следует отметить, что рекомбинантный белок эмицизумаб не имеет структурного сходства и гомологичных последовательностей с FVIII и, соответственно, не индуцирует и не усиливает выработку ингибиторов непосредственно к FVIII, что является большим преимуществом по сравнению с препаратами на основе FVIII.

Первые клинические исследования препарата эмицизумаб начаты в 2012 г. Результаты последующих международных долгосрочных исследований продемонстрировали клиническую эффективность и относительную безопасность этого препарата для профилактического лечения пациентов с гемофилией А. Особенно важно, что клинические исследования свидетельствовали об успешном его применении при лечении пациентов различного возраста как с ингибиторами, так и без них [23, 53–59].

В обзорных статьях авторов-разработчиков (M. Shima и T. Kitazawa) нового препарата приведена информация о молекулярной характеристике, этапах доклинического и клинического изучения препарата [47, 60, 61].

Разработанный в Японии лекарственный препарат на основе рекомбинантного белка эмицизумаб получил одобрение бо-

лее чем в 60 странах мира, включая Японию, США, ЕС. В 2018 г. препарат зарегистрирован в Российской Федерации¹¹.

Преимущество указанного нового терапевтического препарата заключается в возможности менее частого введения (один раз в первые 4 недели, затем один раз в 2 или 4 недели), подкожном способе введения (включая детей младшего возраста), снижении риска развития ингибиторов и клинической эффективности независимо от наличия ингибиторов. Важно, что препарат может быть применен для пациентов детского возраста и ранее нелеченных пациентов (РНП) с целью более раннего начала терапии для эффективного подавления кровотечений.

Также продолжают исследования по разработке лекарственных препаратов, обеспечивающих альтернативный подход для лечения гемофилии за счет восстановления гемостатического баланса путем вмешательства в процесс коагуляции. Так, в настоящее время разрабатываются препараты, оказывающие влияние на белки системы гемостаза, в частности препараты антител к ингибитору пути тканевого фактора (anti-TFPI). Известно, что ингибитор тканевого фактора (TFPI) является важным антикоагулянтом внешнего пути свертывания, синтезируется различными клетками, но преимущественно эндотелиальными. Основная функция белка — ингибирование фактора VIIa, связывающегося с тканевым фактором, и фактора Xa. TFPI уменьшает коагуляцию путем нейтрализации каталитической активности FXa и ингибирования комплекса TF-FVIIa в присутствии FXa. Подавление активности TFPI может восстановить функциональный гемостаз через внешний путь свертывания крови без проявления активности факторов VIII или IX. В настоящее время разработаны и изучаются препараты, которые, специфически связываясь с TFPI, модулируют его активность и которые могут быть применены для лечения пациентов с гемофилией. Важным является всестороннее изучение структуры и понимание механизмов проявления функциональной активности TFPI в модуляции кровотечения при ге-

¹⁰ European Biotechnology. <https://european-biotechnology.com/up-to-date/latest-news/news/roche-set-to-extend-hemlibra-label.html>

¹¹ <http://grls.rosminzdrav.ru>

мофилии и физиологического воздействия терапевтических агентов, направленных на TFPI [62, 63].

Разработанный препарат на основе МкАТ (конкизумаб), специфичных к TFPI, способен путем связывания TFPI подавлять его активность. При проведении доклинических исследований на модели гемофилии кролика показано восстановление уровня тромбина в плазме крови при дефиците FVIII и FIX и снижение потери крови при травме. Результаты клинических исследований свидетельствуют о благоприятном профиле безопасности при внутривенном и подкожном введении, отмечен дозозависимый прокоагулянтный эффект конкизумаба и тенденция к снижению частоты кровотечений [25, 64–66].

Разрабатываются препараты на основе аптамеров — коротких одноцепочечных олигонуклеотидов, которые подобно МкАТ способны с высокой степенью аффинности и специфичности связываться с молекулой-мишенью. В частности, разработан и исследуется препарат на основе аптамера BAX 499 — пегелированного олигонуклеотида (молекулярная масса ПЭГ 40 кДа), направленного против ингибитора TFPI [63, 67, 68].

Исследованы механизмы, определяющие влияние ингибиторов TFPI на динамику формирования фибринозного сгустка, и их совместное применение с факторами свертывания крови. Установлено, что инактивация TFPI ускоряет начальную фазу роста сгустка, возможно совместное применение ингибиторов TFPI с рекомбинантным FVIIa. Показано, что ингибирование TFPI *in vitro* оказывает более выраженный ускоряющий эффект на свертывание в плазме с дефицитом FVIII, чем в плазме здоровых доноров, то есть увеличение концентрации FVIII в крови снижает относительный эффект антагониста TFPI на размер сгустка [63].

С целью восстановления баланса гемостаза разрабатываются препараты на основе природных антикоагулянтов. Разработаны и проводятся клинические исследования нескольких вариантов препарата на основе FVIIa с повышенным потенциалом и (или) длительным периодом полувыведения; наиболее изученным является Eptacog beta¹². Разрабатывается препарат на основе ингибитора APC (активированный протеин C), являющегося эндогенным белком, проявляющим антикоагулянтную активность за счет инактивации FVa, что приводит к замедлению превращения протромбина в тромбин.

Преимущество всех разрабатываемых новых терапевтических средств заключается в возможности менее частого введения препаратов (один раз в 1–4 недели), подкожном способе введения (включая детей младшего возраста), снижении риска развития ингибиторов и клинической эффективности независимо от наличия ингибиторов.

Стратегия генной терапии при гемофилии предполагает непосредственное введение пациенту вирусного вектора, несущего терапевтический ген. В настоящее время разработано несколько релевантных вирусных векторов, кодирующих FVIII или FIX под контролем гепатоспецифического промотора. Имеются сообщения о том, что при гемофилии А проводятся клинические исследования с использованием вектора на основе аденоассоциированного вируса (AAV5), несущего ген, кодирующий продукцию FVIII с удаленным В-доменом [69, 70].

Указывают на несколько преимуществ векторов на основе AAV по сравнению с векторами на основе других вирусов, в том числе ретро- и лентивирусов. Так, рекомбинантные AAV векторы не подвергаются сайт-специфической интеграции в ДНК клеток-хозяина, они в основном локализуются в ядре трансдуцированных клеток в виде нереплицирующихся эписом. Однако, несмо-

тря на большие надежды, возлагаемые на генную терапию, ряд серьезных проблем в терапии гемофилии А сохраняется. Нельзя полностью исключить риск инсерционного мутагенеза вследствие случайного интегрирования гена AAV после его трансдукции в клетки организма-хозяина. Возможно формирование нейтрализующих АТ, а также клеточно-опосредованного иммунитета, направленного на АГ капсида AAV, что приводит к снижению экспрессии фактора свертывания крови, разрушению трансдуцированных гепатоцитов и повышению активности печеночной трансаминазы. При выборе доз вводимого вектора сложно обеспечить долгосрочную экспрессию клинически значимого уровня FVIII, сохраняя его безопасность. В ряде случаев при использовании высоких доз вектора пациентам необходимо назначение кортикостероидной терапии для предотвращения токсичного воздействия проводимой терапии на печень и предупреждения развития дисфункции печени [69, 70].

Согласно современным представлениям принципы будущей генной терапии гемофилии могут основываться на «перезаписи» гена FVIII или FIX в гепатоцитах [71]. Предполагается, что такая концепция редактирования генома обеспечит идеальный терапевтический подход для восстановления aberrантных генов. Это может быть достигнуто с помощью искусственных нуклеаз, нацеленных на двухцепочечные разрывы в определенных сайтах ДНК. Обсуждается вопрос об использовании новых принципов генной терапии, базирующихся на концепции редактирования генома с целью восстановления aberrантных генов (в частности, путем использования метода направленного мутагенеза с целью добавления гена в геном организма — «нокин технология» / knock-in technique).

Разрабатываются и продолжают исследования препаратов РНК-интерференционной (RNAi) терапии при гемофилии, механизм действия которой основывается на подавлении экспрессии гена при последовательном включении следующих процессов: двухцепочечная РНК подвергается процессингу за счет воздействия фермента Dicer, короткие фрагменты РНК включаются в нуклеопротеиновый комплекс RISC, который разрушает мРНК, содержащую участки, комплементарные РНК в составе комплекса. На рисунке 3 приведена схема механизма, лежащая в основе RNAi терапии.

Для лечения гемофилии разработан новый подход, основанный на РНК-интерференции, направленной на антитромбин. Основанием этого является предположение, что совместное наследование протромботических мутаций может улучшить клиническую картину гемофилии. В частности, проводятся исследования препарата — антисмыслового олигонуклеотида (siRNA), связывающего матричную РНК (мРНК) антитромбина III (альфа 2-глобулина). Известно, что антитромбин III — основной плазматический белок, универсальный ингибитор всех ферментных факторов свертывания, в комплексе с гепарином инактивирует тромбин, синтезирующийся в печени и эндотелиальных клетках. Механизм действия препарата опосредован РНК-интерференцией, направленной на антитромбин. За счет малой интерферирующей РНК (siRNA) подавляется трансляция антитромбина путем связывания и разрушения мРНК антитромбина, что приводит к подавлению экспрессии гена и предотвращению синтеза антитромбина. В доклинических и клинических исследованиях показано, что генетический нокаунт антитромбина приводит к дозозависимому снижению его уровня в циркулирующей крови, что способствует увеличению FXa, необходимого для перехода протромбина в тромбин. На основании результатов анализа исследований, проведенных

¹² LFB S.A. announced today the acceptance by U.S. Food and Drug Administration of the filed Biologic License Application for Coagulation Factor VIIa Recombinant, (eptacog beta activated). <https://www.groupe-lfb.com/lfb-content/uploads/2017/01/pr-bla-sevenfact-def.pdf>

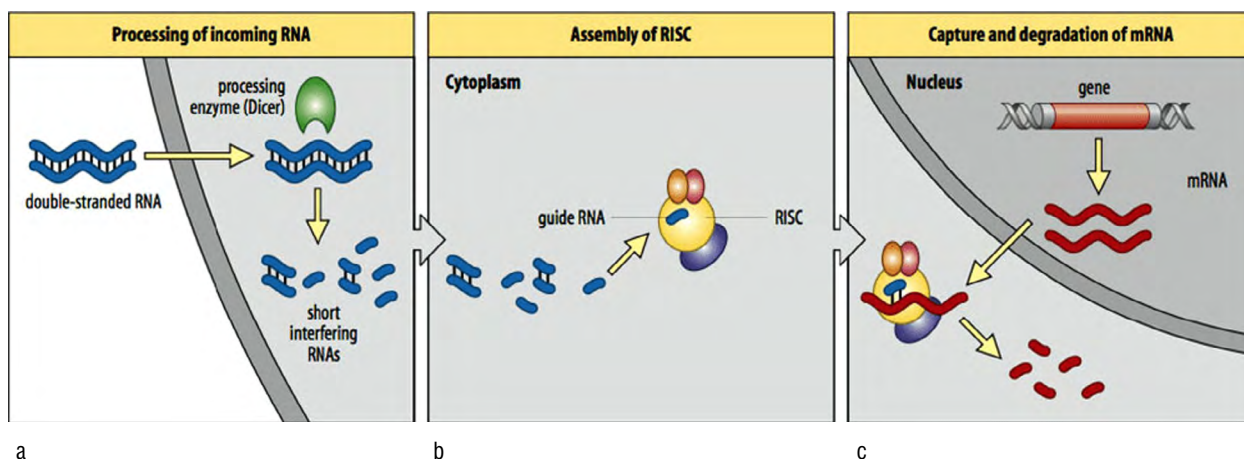


Рис. 3. Схема РНК-интерференции: а — процессирование двухцепочечной РНК в АПК клетке; б — встраивание коротких фрагментов РНК в нуклеопротеиновый комплекс RISC; с — деградация мРНК, содержащей участки, комплементарные РНК¹³.

Fig. 3. RNA interference pathways: а—processing of double-stranded RNA in an APC; б—incorporation of short RNA fragments into RISC; с—degradation of mRNA containing regions complementary to RNAs¹³.

на модели гемофилии А у мышей и нечеловекообразных приматов (NHP), показано, что применение препарата ALN-AT3 стимулировало гемостаз у мышей и приводило к улучшению генерации тромбина у NHP с ингибиторами к FVIII. Преимуществом препарата является то, что он вводится подкожно 1 раз в месяц и может быть использован для лечения пациентов с наличием нейтрализующих АТ к препаратам свертывания крови. Данные клинических исследований I–II фазы свидетельствовали о приемлемом уровне эффективности и безопасности, однако смерть пациента в сентябре 2017 г. вызвала приостановку исследования препарата FDA. Однако после установления причины гибели пациента и коррекции протокола было принято решение о продолжении исследования [24, 72].

Клинические исследования, проведенные с участием здоровых добровольцев и пациентов с гемофилией без ингибиторов, показали, что при введении препарата отмечено значительное дозозависимое снижение антитромбина (от 70 до 89% от исходного уровня) и увеличение продукции тромбина [70].

В опубликованной обзорной статье В. Ну с соавт. [73] приведен анализ имеющихся в настоящее время сведений о возможностях и проблемах, связанных с разработкой препаратов на основе малой интерферирующей РНК. Основные проблемы, требующие решения, касаются способов эффективной и безопасной доставки siRNAs в нужные ткани и клетки и способов повышения эффективности siRNAs в отношении их активности, стабильности, специфичности и обеспечения минимизации потенциальных побочных эффектов.

Разработка новых биотехнологических препаратов и новых подходов к лечению гемофилии на основе применения препаратов, различающихся принципами механизма их действия, продолжается. Это обусловлено как необходимостью обеспечения эффективности лечения пациентов, особенно с тяжелой формой заболевания, так и обеспечения безопасности, в частности иммунологической безопасности проводимой терапии. Внедрение в клиническую практику эффективных и безопасных лекарственных препаратов для лечения гемофилии А требует необходимости проведения клинических исследований в соответствии с требованиями отечественных и международных документов. Вопросы, связанные с принципами проведения клинических исследований препаратов FVIII плазменного происхождения и рекомбинантных, будут отражены во второй части статьи.

Заключение

Проблемы орфанного заболевания — гемофилии А, часто характеризующегося тяжелой клинической симптоматикой, требуют постоянного внимания научного сообщества. Несмотря на то что замещение дефицитного фактора свертывания крови в настоящее время остается основной стратегией лечения пациентов с гемофилией А, достижения в области биотехнологии открывают путь к разработке новых препаратов, базирующихся на различных подходах нормализации функционирования системы гемостаза. Особый подход к выбору оптимального способа лечения требуется для пациентов, у которых сформировались антитела к препарату в процессе проводимой терапии. Разработка новых способов лечения пациентов с гемофилией, основанных на научных достижениях в области современной биотехнологии, совершенствовании технологии производственного процесса выделения факторов свертывания крови из плазмы крови доноров, использовании достижений генной терапии, открывает перспективы успешного их применения в клинической практике.

Окончание следует.

Вклад авторов. Ж. И. Авдеева — сбор и анализ информации, изложенной в научной литературе и методических рекомендациях, написание текста рукописи; А. А. Солдатов — сбор публикаций по тематике обзора, доработка текста рукописи; В. П. Бондарев — формирование концепции статьи, критический пересмотр содержания текста рукописи; В. Д. Мосягин — подготовка и редактирование текста рукописи; В. А. Меркулов — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. Zhanna I. Avdeeva—collection and analysis of scientific literature and guidelines, writing of the paper; Aleksandr A. Soldatov—collection of papers on the topic of the review, finalisation of the paper; Vladimir P. Bondarev—elaboration of the concept of the study, revision of the paper; Vyacheslav D. Mosyagin—writing, formatting and editing of the text; Vadim A. Merkulov—final approval of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

¹³ http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_06/box6a.jpg

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicity funded research project № 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Конфликт интересов. В. А. Меркулов, В. П. Бондарев являются заместителями главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», Ж. И. Авдеева, В. Д. Мосягин являются членами редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Vadim A. Merkulov and Vladimir P. Bondarev are Deputy Editors-in-chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. Zhanna I. Avdeeva, Vyacheslav D. Mosyagin, and Vyacheslav B. Ivanov are members of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Волкова СА, Боровков НН. *Основы клинической гематологии*. Учебное пособие. Н. Новгород: НижГМА; 2013. [Volkova SA, Borovkov NN. *Clinical Hematology Basics*. Study guide. Nizhny Novgorod: NizhGMA; 2013 (In Russ.)]
2. Бломбек М, Антонович И, ред. *Нарушения свертывания крови. Практические рекомендации по диагностике и лечению*. М.: Медицинская литература; 2014. [Blombek M, Antonovich J, eds. *Blood coagulation disorders. Practical recommendations for diagnosis and treatment*. Moscow: Meditsinskaya literatura; 2014 (In Russ.)]
3. Зозуля НИ, Свиринов ПВ. *Диагностика и лечение гемофилии. Национальные клинические рекомендации*. М.: Национальное гематологическое общество; 2014. [Zozulya NI, Svirin PV. *Diagnosis and treatment of hemophilia*. Moscow: Natsional'noe gematologicheskoe obshchestvo; 2014 (In Russ.)]
4. Сараева НО. *Гематология*. Учебное пособие. Изд. 2-е, перераб. Иркутск: ИГМУ; 2015. [Saraeva NO. *Hematology*. Study guide. 2nd ed. Irkutsk: IG MU; 2015 (In Russ.)]
5. Орлова НА, Ковнир СВ, Воробьев ИИ, Габиров АГ, Воробьев АИ. Фактор свертывания крови VIII — от эволюции к терапии. *Acta Naturae*. 2013;5(2):19–39. [Orlova NA, Kovnir SV, Vorobiev II, Gabibov AG, Vorobiev AI. Blood clotting factor VIII: from evolution to therapy. *Acta Naturae*. 2013;5(2):19–39 (In Russ.)] <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-2-19-39>
6. Зозуля НИ, Чернов ВМ, Тарасова ИС, Румянцев АГ. Нерешенные вопросы оказания медицинской помощи пациентам с ингибиторной формой гемофилии в России. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2019;6(2):48–53. [Zozulya NI, Chernov VM, Tarasova IS, Romyantsev AG. Unsolved issues of providing medical care to patients with hemophilia with inhibitors in Russia. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2019;6(2):48–53 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21682/2311-1267-2019-6-2-48-53>
7. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias — from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med*. 2001;344(23):1773–9. <https://doi.org/10.1056/nejm200106073442307>
8. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
9. DeLoughery TG, ed. *Hemostasis and thrombosis*. 2nd ed. Georgetown, TX: Landes Bioscience; 2019. <https://www.springer.com/us/book/9783030193294>
10. Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Бондарев ВП, Меркулов ВА. Аспекты клинических исследований препаратов для лечения гемофилии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(1):30–41. [Avdeeva Zhi, Soldatov AA, Bondarev VP, Merkulov VA. General considerations on clinical trials of hemophilia medicines. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(1):30–41 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-1-30-41>
11. Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood*. 2016;128(16):2007–16. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-713289>
12. Lenting PJ, Van Schooten CJ, Denis CV. Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. *J Thromb Haemost*. 2007;5(7):1353–60. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02572.x>
13. Dasgupta S, Repessé Y, Bayry J, Navarrete AM, Wootla B, Delignat S, et al. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood*. 2007;109(2):610–2. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-022756>
14. Saenko EL, Ananyeva NM. Receptor-mediated clearance of factor VIII: implications for pharmacokinetic studies in individuals with haemophilia. *Haemophilia*. 2006;12(Suppl 4):15–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01329.x>
15. Mannucci PM. Viral safety of coagulation factor concentrates: memoirs from an insider. *J Thromb Haemost*. 2018;16(4):630–3. <https://doi.org/10.1111/jth.13963>
16. Русанов ВМ, Левин И. *Лечебные препараты крови*. М.: Медпрактика-М; 2004. [Rusanov VM, Levin I. *Blood medicines*. Moscow: Medpraktika-M; 2004 (In Russ.)]
17. Зубкова НВ. Обеспечение инфекционной безопасности препаратов из плазмы крови доноров. *Гематология и трансфузиология*. 2014;59(2):44–9. [Zubkova NV. Infection safety of donor plasma preparations. *Gematologiya i transfuziologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2014;59(2):44–9 (In Russ.)]
18. Velthove KJ, Over J, Abbink K, Janssen MP. Viral safety of human plasma-derived medicinal products: impact of regulation requirements. *Transfus Med Rev*. 2013;27(3):179–83. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2013.05.002>
19. Hay CR, Palmer BP, Chalmers EA, Hart DP, Liesner R, Rangarajan S, et al. The incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia A following a major switch from full-length to B-domain-deleted factor VIII: a prospective cohort comparison. *Haemophilia*. 2015;21(2):219–26. <https://doi.org/10.1111/hae.12563>
20. Gringeri A, Tagliaferri A, Tagariello G, Morfini M, Santagostino E, Mannucci P. Efficacy and inhibitor development in previously treated patients with haemophilia A switched to a B domain-deleted recombinant factor VIII. *Br J Haematol*. 2004;126(3):398–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05058.x>
21. Franchini M, Mannucci PM. Direct oral anticoagulants and venous thromboembolism. *Eur Respir Rev*. 2016;25(141):295–302. <https://doi.org/10.1183/16000617.0025-2016>
22. Arruda VR, Doshi BS, Samelson-Jones BJ. Novel approaches to hemophilia therapy: successes and challenges. *Blood*. 2017;130(21):2251–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-742312>
23. Shima M, Hanabusa H, Taki M, Matsushita T, Sato T, Fukutake K, et al. Factor VIII-mimetic function of humanized bispecific antibody in hemophilia A. *N Engl J Med*. 2016;374(21):2044–53. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1511769>
24. Sehgal A, Barros S, Ivanciu L, Cooley B, Qin J, Racie T, et al. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nat Med*. 2015;21(5):492–7. <https://doi.org/10.1038/nm.3847>
25. Chowdary P, Lethagen S, Friedrich U, Brand B, Hay C, Abdul Karim F, et al. Safety and pharmacokinetics of anti-TFPI antibody (concizumab) in healthy volunteers and

- patients with hemophilia: a randomized first human dose trial. *J Thromb Haemost.* 2015;13(5):743–54. <https://doi.org/10.1111/jth.12864>
26. Fischer K, Pendu R, van Schooten CJ, van Dijk K, Denis CV, van den Berg HM, Lenting PJ. Models for prediction of factor VIII half-life in severe haemophiliacs: distinct approaches for blood group O and non-O patients. *PLoS One.* 2009;4(8):e6745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006745>
27. Fijnvandraat K, Peters M, ten Cate JW. Inter-individual variation in half-life of infused recombinant factor VIII is related to pre-infusion von Willebrand factor antigen levels. *Br J Haematol.* 1995;91(2):474–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb05325.x>
28. Hacker MR, Geraghty S, Manco-Johnson M. Barriers to compliance with prophylaxis therapy in haemophilia. *Haemophilia.* 2001;7(4):392–6.
29. De Moerloose P, Urbancik W, Van Den Berg HM, Richards M. A survey of adherence to haemophilia therapy in six European countries: results and recommendations. *Haemophilia.* 2008;14(5):931–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01843.x>
30. Journeycake JM, Buchanan GR. Catheter-related deep venous thrombosis and other catheter complications in children with cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(28):4575–80. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.05.5343>
31. Mahdi AJ, Obaji SG, Collins PW. Role of enhanced half-life factor VIII and IX in the treatment of haemophilia. *Br J Haematol.* 2015;169(6):768–76. <https://doi.org/10.1111/bjh.13360>
32. Strohl WR. Fusion proteins for half-life extension of biologics as a strategy to make biobetters. *BioDrugs.* 2015;29(4):215–39. <https://doi.org/10.1007/s40259-015-0133-6>
33. Baldo BA. Chimeric fusion proteins used for therapy: indications, mechanisms, and safety. *Drug Saf.* 2015;38(5):455–79. <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0285-9>
34. Ivens IA, Baumann A, McDonald TA, Humphries TJ, Michaels LA, Mathew P. PEGylated therapeutic proteins for haemophilia treatment: a review for haemophilia caregivers. *Haemophilia.* 2013;19(1):11–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02931.x>
35. Konkle BA, Stasyshyn O, Chowdary P, Bevan DH, Mant T, Shima M, et al. Pegylated, full-length, recombinant factor VIII for prophylactic and on-demand treatment of severe hemophilia A. *Blood.* 2015;126(9):1078–85. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-630897>
36. Tiede A, Brand B, Fischer R, Kavakli K, Lentz SR, Matsushita T, et al. Enhancing the pharmacokinetic properties of recombinant factor VIII: first-in-human trial of glycoPEGylated recombinant factor VIII in patients with hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2013;11(4):670–8. <https://doi.org/10.1111/jth.12161>
37. Turecek PL, Bossard MJ, Graninger M, Gritsch H, Höllriegl W, Kaliwoda M, et al. BAX 855, a PEGylated rFVIII product with prolonged half-life. Development, functional and structural characterisation. *Hamostaseologie.* 2012;32(Suppl 1):S29–38.
38. Coyle TE, Reding MT, Lin JC, Michaels LA, Shah A, Powell J. Phase I study of BAY 94-9027, a PEGylated B-domain-deleted recombinant factor VIII with an extended half-life, in subjects with hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2014;12(4):488–96. <https://doi.org/10.1111/jth.12506>
39. Mahlangu J, Powell JS, Ragni MV, Chowdary P, Josephson NC, Pabinger I, et al. Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood.* 2014;123(3):317–25. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-529974>
40. Shapiro AD, Ragni MV, Kulkarni R, Oldenburg J, Srivastava A, Quon DV, et al. Recombinant factor VIII Fc fusion protein: extended-interval dosing maintains low bleeding rates and correlates with von Willebrand factor levels. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1788–800. <https://doi.org/10.1111/jth.12723>
41. Peters RT, Toby G, Lu Q, Liu T, Kulman JD, Low SC, et al. Biochemical and functional characterization of a recombinant monomeric factor VIII-Fc fusion protein. *J Thromb Haemost.* 2013;11(1):132–41. <https://doi.org/10.1111/jth.12076>
42. Powell JS, Josephson NC, Quon D, Ragni MV, Cheng G, Li E, et al. Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients. *Blood.* 2012;119(13):3031–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-382846>
43. Young G, Mahlangu JN, Kulkarni R, Nolan B, Liesner R, Pasi J, et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of recombinant factor VIII Fc fusion protein (rFVIII-Fc) in previously-treated children with severe hemophilia A (Kids-A-LONG). *Blood.* 2014;124(21):1494. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.1494.1494>
44. Ezban M, Vad K, Kjalke M. Turoctocog alfa (NovoEight®) — from design to clinical proof of concept. *Eur J Haematol.* 2014;93(5):369–76. <https://doi.org/10.1111/ejh.12366>
45. Zollner SB, Raquet E, Müller-Cohrs J, Metzner HJ, Weimer T, Pragst I, et al. Preclinical efficacy and safety of rVIII-SingleChain (CSL627), a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res.* 2013;132(2):280–7. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.06.017>
46. Zollner S, Raquet E, Claar P, Müller-Cohrs J, Metzner HJ, Weimer T, et al. Non-clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of rVIII-SingleChain, a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res.* 2014;134(1):125–31. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.03.028>
47. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med.* 2012;18(10):1570–4. <https://doi.org/10.1038/nm.2942>
48. Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood.* 2017;130(23):2463–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-801662>
49. Kitazawa T, Esaki K, Tachibana T, Ishii S, Soeda T, Muto A, et al. Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens. *J Thromb Haemost.* 2017;117(7):1348–57. <https://doi.org/10.1160/th17-01-0030>
50. Kitazawa T, Shima M. Emicizumab, a humanized bispecific antibody to coagulation factors IXa and X with a factor VIIIa-cofactor activity. *Int J Hematol.* 2020;111(1):20–30. <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2545-9>
51. Yada K, Nogami K. Novel insights and new developments regarding coagulation revealed by studies of the anti-factor IXa (activated factor IX)/factor X bispecific antibody, emicizumab. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(5):1148–54. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.120.312919>
52. Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. *J Thromb Haemost.* 2014;12(2):206–13.
53. Lippi G, Favaloro EJ. Emicizumab (ACE910): clinical background and laboratory assessment of hemophilia A. *Adv Clin Chem.* 2019;88:151–67. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.10.003>
54. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, Schmitt C, Callaghan MU, Young G, et al. Emicizumab prophylaxis in hemophilia A with inhibitors. *N Engl J Med.* 2017;377(9):809–18. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1703068>
55. Young G, Liesner R, Chang T, Sidonio R, Oldenburg J, Jiménez-Yuste V, et al. A multicenter, open-label, phase 3 study of emicizumab prophylaxis in children with hemophilia A with inhibitors. *Blood.* 2019;134(24):2127–38. <https://doi.org/10.1182/blood.2019001869>

56. Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, Negrier C, Niggli M, Mancuso ME, et al. Efficacy of emicizumab prophylaxis in patients with hemophilia A without inhibitors. *N Engl J Med*. 2018;379(9):811–22. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1803550>
57. Pipe SW, Shima M, Lehle M, Shapiro A, Chebon S, Fukutake K, et al. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of emicizumab prophylaxis given every 4 weeks in people with haemophilia A (HAVEN 4): a multicentre, open-label, non-randomised phase 3 study. *Lancet Haematol*. 2019;6(6):e295–305. [https://doi.org/10.1016/s2352-3026\(19\)30054-7](https://doi.org/10.1016/s2352-3026(19)30054-7)
58. Shima M, Nogami K, Nagami S, Yoshida S, Yoneyama K, Ishiguro A, et al. A multicentre, open-label study of emicizumab given every 2 or 4 weeks in children with severe haemophilia A without inhibitors. *Haemophilia*. 2019;25(6):979–87. <https://doi.org/10.1111/hae.13848>
59. Uchida N, Sambe T, Yoneyama K. A first-in-human phase 1 study of ACE910, a novel factor VIII-mimetic bispecific antibody, in healthy subjects. *Blood*. 2016;127(13):1633–41. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-650226>
60. Shima M. Bispecific antibodies and advances in non-gene therapy options in hemophilia. *Res Pract Thromb Haemost*. 2020;4(4):446–54. <https://doi.org/10.1002/rth2.12337>
61. Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Efficacy of emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII. *Blood*. 2017;130(23):2463–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-801662>
62. Peterson JA, Maroney SA, Mast AE. Targeting TFPI for hemophilia treatment. *Thromb Res*. 2016;141(Suppl 2):S28–30. [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(16\)30359-0](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(16)30359-0)
63. Chowdary P. Anti-tissue factor pathway inhibitor (TFPI) therapy: a novel approach to the treatment of haemophilia. *Int J Hematol*. 2020;111(1):42–50. <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2548-6>
64. Eichler H, Angchaisuksiri P, Kavakli K, Knoebl P, Windyga J, Jiménez-Yuste V, et al. A randomized trial of safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of concizumab in people with hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2018;16(11):2184–95. <https://doi.org/10.1111/jth.14272>
65. Chowdary P. Inhibition of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) as a treatment for haemophilia: rationale with focus on concizumab. *Drugs*. 2018;78(9):881–90. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0922-6>
66. Dockal M, Hartmann R, Fries M, Thomassen MC, Heinzmann A, Ehrlich H, et al. Small peptides blocking inhibition of factor Xa and tissue factor-VIIa by tissue factor pathway inhibitor (TFPI). *J Biol Chem*. 2014;289(3):1732–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.533836>
67. Waters EK, Genga RM, Schwartz MC, Nelson JA, Schaub RG, Olson KA, et al. Aptamer ARC19499 mediates a procoagulant hemostatic effect by inhibiting tissue factor pathway inhibitor. *Blood*. 2011;117(20):5514–22. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-311936>
68. Parunov LA, Soshitova NP, Fadeeva OA, Balandina AN, Kopylov KG, Kumsikova MA, et al. Drug-drug interaction of the anti-TFPI aptamer BAX499 and factor VIII: studies of spatial dynamics of fibrin clot formation in hemophilia A. *Thromb Res*. 2014;133(1):112–9. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.10.036>
69. Rangarajan S, Walsh L, Lester W, Perry D, Madan B, Laffan M, et al. AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2519–30. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1708483>
70. Pasi J, Rangarajan S, Mitchell N, Lester W, Laffan M, Madan B, et al. First-in-human evidence of durable therapeutic efficacy and safety of AAV gene therapy over 3-years with Valoctocogene Roxaparvotec for severe haemophilia A (BMN 270-201 Study). *J Thromb Haemost*. LB 01.2. 2019.
71. Shima M. Current progress and future direction in the treatment for hemophilia. *Int J Hematol*. 2020;111:16–9. <https://doi.org/10.1007/s12185-019-02786-9>
72. Machin N, Ragni MV. An investigational RNAi therapeutic targeting antithrombin for the treatment of hemophilia A and B. *J Blood Med*. 2018;9:135–40. <https://doi.org/10.2147/jbm.s159297>
73. Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Sig Transduct Target Ther*. 2020;5(1):101. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>

Об авторах / Authors

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф. Zhanna I. Avdeeva, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9377-1378>

Солдатов Александр Алексеевич, д-р мед. наук. Aleksandr A. Soldatov, Dr. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф. Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Мосягин Вячеслав Дмитриевич, д-р мед. наук, проф. Vyacheslav D. Mosyagin Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0269-8337>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 14.09.2020

После доработки 10.02.2021

Принята к публикации 26.02.2021

Received 14 September 2020

Revised 10 February 2021

Accepted 26 February 2021

Сравнительная оценка использования моно- и поликлональных антител при определении подлинности различных лекарственных средств на основе интерферона альфа-2b

Л. А. Гайдерова*, Ю. Н. Лебедева, Т. Н. Лобанова, Е. А. Лукинова

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

В настоящее время все большую актуальность приобретают вопросы оценки качества лекарственных препаратов на основе рекомбинантных интерферонов (рИФН) с использованием современных аналитических методов, среди которых одними из важнейших являются методы определения подлинности. Особую проблему представляет оценка подлинности интерферона в отечественных препаратах на основе рИФН, содержащих помимо интерферона (ИФН) альфа-2b иные действующие и вспомогательные вещества, затрудняющие определение этого показателя физико-химическими методами. Производители препаратов указанного типа используют для оценки их подлинности реакцию нейтрализации ИФН различными моно- и поликлональными антителами. **Цель работы:** оценка пригодности различных видов антител для проведения испытания по показателю «Подлинность» в реакции нейтрализации противовирусной активности интерферона в различных лекарственных средствах на основе интерферона альфа-2b, содержащих помимо интерферона иные действующие и вспомогательные вещества. **Материалы и методы:** в исследовании использовали клетки MDBK, вирус везикулярного стоматита, образцы различных лекарственных средств, содержащих интерферон альфа-2b, разного состава и производства, моно- и поликлональные антитела различного производства. Определение подлинности рИФН проводили биологическим методом, основанным на нейтрализации специфическими антителами способности ИФН подавлять цитопатическое действие индикаторного вируса в культуре клеток в сравнении со стандартным образцом. **Результаты:** показано, что образцы всех субстанций на основе интерферона альфа-2b нейтрализуются как поликлональными, так и моноклональными антителами. Поликлональные антитела взаимодействуют со всеми лекарственными препаратами различного состава, изготовленными из тех же субстанций. Моноклональные антитела избирательно взаимодействуют с некоторыми препаратами. **Выводы:** поликлональные антитела универсальны с точки зрения возможности их использования для определения подлинности любого препарата, содержащего ИФН альфа-2b. Применение с этой целью моноклональных антител ограничено и зависит от состава препарата.

Ключевые слова: интерферон рекомбинантный; метод определения подлинности; реакция нейтрализации противовирусной активности; моно- и поликлональные антитела

Для цитирования: Гайдерова ЛА, Лебедева ЮН, Лобанова ТН, Лукинова ЕА. Сравнительная оценка использования моно- и поликлональных антител при определении подлинности различных лекарственных средств на основе интерферона альфа-2b. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(1):50–63. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-50-63>

***Контактное лицо:** Гайдерова Лидия Александровна; Gaiderova@expmед.ru

Comparative evaluation of mono- and polyclonal antibodies used in identification of interferon alpha-2b products

L. A. Gayderova*, Yu. N. Lebedeva, T. N. Lobanova, E. A. Lukinova

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

Quality control of recombinant interferon (rIFN) products with the help of modern analytical methods, including those used for identification, is becoming increasingly relevant nowadays. Identification is especially challenging in the case of Russian rIFN products that contain not only interferon (IFN) alpha-2b, but also other active ingredients and excipients that hinder the use of physical and chemical methods. Manufacturers of such products use IFN neutralization assay with mono- and/or polyclonal antibodies for identification. **The aim of the study** was to assess the feasibility of using different types of antibodies in the identification test based on neutralization of IFN antiviral activity in IFN alpha-2b products containing other active ingredients and excipients in addition to IFN. **Materials and methods:** the following materials were used in the study: MDBK cells, vesicular stomatitis virus, samples of IFN alpha-2b products with different composition and by different manufacturers, mono- and polyclonal antibodies by different manufacturers. Identification of rIFNs was carried out by a biological method based on neutralization by specific antibodies of IFN ability to suppress the cytopathic effect of the indicator virus in a cell culture using a reference standard for comparison. **Results:** both polyclonal and monoclonal antibodies were shown to neutralize the activity of the tested IFN alpha-2b substances. Polyclonal antibodies interact with all products containing the same active ingredients, irrespective of their composition. Monoclonal antibodies interact selectively with some products. **Conclusions:** polyclonal antibodies can be used for identification of any product containing IFN alpha-2b. The use of monoclonal antibodies for this purpose is limited and depends on the composition of the product.

Key words: recombinant interferon; identification test; antiviral activity neutralization assay; mono- and polyclonal antibodies

For citation: Gayderova LA, Lebedeva YuN, Lobanova TN, Lukinova EA. Comparative evaluation of mono- and polyclonal antibodies used in identification of interferon alpha-2b products. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(1):50–63. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-50-63>

* **Corresponding author:** Lidiya A. Gaiderova; Gaiderova@expmed.ru

Лекарственные препараты на основе рекомбинантных интерферонов (рИФН) занимают все большее место на современном фармацевтическом рынке и используются в комплексной терапии многих вирусных [1, 2] и онкологических [3–6] заболеваний.

В связи со значительным расширением масштабов использования рИФН в медицинской практике все большую актуальность приобретают вопросы совершенствования их производства и оценки качества. Одним из важнейших показателей качества препаратов на основе рекомбинантных ИФН, характеризующих их фармакологическую эффективность и безопасность, является подлинность. В соответствии с рекомендациями Европейской фармакопеи (ЕФ) подлинность препарата подтверждают его биологической активностью, а также физико-химическими методами, идентифицирующими специфические белки препарата: изoeлектрическое фокусирование, пептидное картирование с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих условиях¹. Дополнительно к указанным в ЕФ методам контроля подлинности используют и метод обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Однако существует ряд лекарственных форм препаратов ИФН альфа-2b отечественного производства, в основном для наружного и местного применения (мази, гели, суппозитории, капли, спреи и пр.), компонентный состав которых не позволяет применять для подтверждения подлинности физико-химические методы, рекомендованные ЕФ. Поэтому многие отечественные производители используют биологический метод определения подлинности ИФН, в основе которого лежит реакция нейтрализации противовирусной активности за счет связывания белка-антигена (интерферона) специфическими антителами.

При этом антигенная детерминанта (эпитоп) белка интерферона взаимодействует с частью антитела, распознающей эпитоп (паратоп). Взаимодействующие участки должны быть комплементарными по конформации, распределению заряда и гидрофобности — лишь при этих условиях формируются гидрофобные связи. В то же время при перекрывании электронных оболочек в результате тесного контакта поверхностей белковых молекул могут возникать силы отталкивания. Соотношение сил притяжения и отталкивания играет решающую роль в определении специфичности молекулы антитела и ее способности различать структурно сходные молекулы [7].

Испытания по определению подлинности в реакции нейтрализации противовирусной активности проводят в культуре клеток, чувствительных к ИФН, с использованием индикаторного вируса. Нейтрализация активности испытуемого и стандартного образцов должна происходить при аналогичных разведениях антител².

Используемые в реакции антитела могут быть моноклональными и поликлональными. Моноклональные антитела вырабатываются иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, то есть произошедшими из одной плазматической клетки-предшественницы. Моноклональные антитела специфичны к одной антигенной детерминанте [8, 9].

В норме в организме антитела продуцируются несколькими или даже множеством клонов [10].

Поэтому из сыворотки иммунизированного животного получают препараты поликлональных антител, которые представляют собой смесь иммуноглобулинов и обладают неодинаковой специфичностью по отношению к различным эпитопам полидетерминантного иммуногена. В целом специфичность поликлональных антител определяется совокупностью специфического взаимодействия с многочисленными антигенными детерминантами, которые могут быть или не быть уникальными, то есть присущими только молекулам определенного вещества.

Вероятность перекрестных реакций с другими антигенами у моноклональных антител значительно ниже, чем у поликлональных. Она минимизируется в результате подбора наиболее уникальной, неповторимой антигенной детерминанты, моноклональные антитела к которой затем производятся [10].

Таким образом, моноклональные антитела имеют следующие основные преимущества перед поликлональными: полная стандартизация препарата антител; высокая специфичность; свободный выбор антигенных детерминант, к которым образуются антитела. Вместе с тем в некоторых случаях применение поликлональных антител позволяет достичь лучших результатов.

Анализ нормативной документации на отечественные препараты, содержащие в качестве основного действующего вещества рекомбинантный ИФН альфа-2b, показывает, что единого подхода к выбору антител для оценки подлинности белка интерферона нет. Большинство производителей рекомендуют использовать с этой целью поликлональные антитела (ООО «Фармапарк», ЗАО «Биокад», ООО «Фирн М», ООО «ФЕРОН», ООО «Алфарм»). Некоторые производители (АО «Биннофарм», ЗАО «Вектор-Медика», ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России) указывают в нормативной документации на препараты, что при определении их подлинности следует использовать моноклональные антитела.

Цель работы — оценка пригодности различных видов антител для проведения испытания по показателю «Подлинность» в реакции нейтрализации противовирусной активности интерферона в различных лекарственных средствах на основе интерферона альфа-2b, содержащих помимо интерферона иные действующие и вспомогательные вещества.

Материалы и методы

Материалы:

- образцы 6 субстанций ИФН альфа-2b человеческого рекомбинантного (производства ООО «Фармапарк», ЗАО «Биокад», АО «Биннофарм», ООО «Фирн М», ЗАО «Вектор-Медика», ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России), а также лекарственных препараты различного состава, изготовленные с использованием вышеуказанных субстанций (производства ООО «Алфарм», АО «Алтайвитамины», АО «Биннофарм», ЗАО «Вектор-Медика», ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА, ООО «ФЕРОН», ООО «Фирн М», ЗАО «ЛЕККО»);

¹ 01/2009:1639 Interferon beta-1a concentrated solution. European Pharmacopoeia 10th ed.

² Общая фармакопейная статья 1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

- моноклональные антитела: Mouse Anti-Interferon- α 2 Antibody, кат. № MAB411, клон ST2541 (далее — AT MAB411) и Mouse Anti-Human α -Interferon Monoclonal Antibody, кат. № MAB413, клон ST126 (далее — AT MAB413), производства Merck (Millipore);

- поликлональные антитела: Anti-Human Interferon Alpha, Rabbit Serum (PAb), кат. № 31101-1, производства PBL Assay Science (далее — AT 31101-1) и Polyclonal Antibody to Interferon Alpha (IFN α)-Aff-Purified, кат. № AP02801PU-N, производства Acris Antibodies GmbH (далее — AT AP02801PU-N);

- вирус везикулярного стоматита (VSV), штамм Индиана, из Государственной коллекции вирусов ФГУП «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» (индикаторный вирус);

- международный стандартный образец (МСО) активности интерферона альфа-2b (WHO International Standard INTERFERON ALPHA 2b (Human rDNA derived) NIBSC Code 95/566);

- культура клеток почек крупного рогатого скота MDBK (NBL-1) из коллекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Россия) и ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» (Россия);

- питательная среда DMEM с глюкозой 4,5 г/л с L-глутамином (ООО НПФ «ПанЭко», Россия).

Оборудование:

- бокс микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 (Россия);
- CO₂-инкубатор INCO 108 med (Германия);
- микроскоп инвертированный ID-03 Option Feintechnick;
- баня водяная GFL 1012 (Германия);
- центрифуга Eppendorf 5804 R (Германия);
- камера Горяева для счета форменных элементов крови (ООО «МиниМедПром», Россия).

Методы

Определение подлинности интерферона проводили в соответствии с ОФС Биологические методы испытания препаратов на основе интерферона с использованием культур клеток³. Метод определения подлинности (так же, как и специфической активности) основан на способности интерферона альфа, входящего в состав лекарственного средства, подавлять цитопатическое действие индикаторного вируса в культуре клеток в сравнении со стандартным образцом интерферона. Интерферон, входящий в состав лекарственного средства, должен инактивироваться (нейтрализовываться) специфическими антителами аналогично стандартному образцу (МСО) интерферона.

Испытания проводили в асептических условиях.

Клетки культивировали в стандартных условиях: температура (37±1) °С, содержание углекислого газа в атмосфере инкубатора (5,0±0,5)%.

Образцы лекарственных средств и МСО после проведения пробоподготовки, предусмотренной нормативной документацией, разводили питательной средой до одной десятой титра противовирусной активности (рабочие растворы испытуемого лекарственного средства (РР-ЛС) и МСО (РР-МСО)). Титр противовирусной активности определяли заранее в ходе определения специфической активности.

Рабочий диапазон разведений антител определяли по их нейтрализующей активности относительно раствора МСО.

Для проведения реакции нейтрализации готовили серию двукратных разведений антител к ИФН альфа-2b в пределах трех двукратных разведений ниже и выше разведения, соответствующего вычисленному титру антител, в объеме, достаточном для нейтрализации РР-ЛС и РР-МСО.

Для проведения реакции нейтрализации РР-МСО подготовленные двукратные разведения антител объединяли в равных объемах с РР-МСО, прибавляя раствор антител к РР-МСО и перемешивая смесь. Аналогичным образом готовили смеси для проведения реакции нейтрализации РР-ЛС. Для контроля активности интерферона готовили контрольные образцы, смешивая в равных объемах рабочий РР-МСО и питательную среду и РР-ЛС и питательную среду (КО-МСО и КО-ЛС соответственно). Приготовленные смеси и контрольные образцы инкубировали при температуре (37±1) °С в течение 1 ч, после чего из лунок 96-луночного планшета с клеточным монослоем удаляли культуральную среду и вносили (в 4 раздельные лунки на каждое разведение антител) нейтрализованные смеси РР-ЛС и РР-МСО (объемом по 100 мкл). Для контроля активности интерферона вносили в лунки по 100 мкл КО-МСО и КО-ЛС (по 4 лунки на каждый контрольный образец). Кроме того, на планшете оставляли 4 лунки для контроля качества клеточного монослоя и 16 лунок для контроля дозы вируса-индикатора. В эти лунки вносили по 100 мкл питательной среды.

После внесения растворов 96-луночный планшет инкубировали в течение 22–26 ч в стандартных условиях, а затем из лунки удаляли культуральную среду и во все лунки, содержащие нейтрализованные смеси и контрольные образцы, вносили по 100 мкл раствора индикаторного вируса в рабочей дозе (титр и рабочую дозу вируса определяли в ходе определения специфической активности). В лунки, предназначенные для контроля дозы вируса-индикатора, вносили по 100 мкл разведений вируса, соответствующих 100, 10, 1, 0,1 ТЦД₅₀/0,1 мл. В лунки с контролем клеточного монослоя вносили по 100 мкл поддерживающей среды. После внесения индикаторного вируса 96-луночный планшет инкубировали в течение 24–26 ч в стандартных условиях до появления цитопатического действия в монослое клеток с индикаторным вирусом в дозе 1 ТЦД₅₀/0,1 мл.

Результаты испытания подлежали визуальному учету при выполнении следующих условий:

- отсутствовала дегенерация клеточного монослоя в лунках с контролем клеточного монослоя, в лунках, содержащих минимальное количество антител, и в лунках с индикаторным вирусом в дозе 0,1 ТЦД₅₀/0,1 мл, а также в лунках с КО-МСО и КО-ЛС;

- наблюдалось полное поражение клеточного монослоя вирусом в лунках с клетками без образцов, подвергшихся действию вируса в заражающей дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл, а также в лунках, содержащих максимальное количество антител;

- доза внесенного вируса составляла 10^(2±0,25) ТЦД₅₀/0,1 мл.

Лекарственное средство выдерживало испытание на подлинность, если нейтрализация активности РР-ЛС и РР-МСО происходила при аналогичных разведениях антител.

Результаты и обсуждение

Проведено исследование взаимодействия образцов 6 субстанций разных производителей и изготовленных из них препаратов различного состава. Сведения об испытуемых лекарственных препаратах приведены в таблице 1. Наименования фирм-производителей, препаратов и компонентов, входящих в их состав, указаны в соответствии с нормативной документацией производителей на момент производства.

В результате исследования выявлено, что образцы всех испытанных субстанций нейтрализуются всеми испытанными образцами антител, независимо от их вида и производителя (табл. 2).

³ Там же.

Результаты испытаний различных лекарственных препаратов с поли- и моноклональными антителами представлены в таблице 3.

Из представленных результатов можно заключить, что:

- поликлональные антитела нейтрализуют интерферон в образцах всех испытанных лекарственных средств;

- моноклональные антитела нейтрализуют интерферон только в субстанциях и в препаратах, в состав которых помимо ИФН альфа-2b человеческого рекомбинантного не входят действующие вещества химического происхождения, консерванты и другие вещества, необходимые для придания препаратам требуемых физико-химических свойств.

Особенно наглядно влияние вспомогательных веществ на результат взаимодействия с антителами при сравнении трех вариантов препаратов под группировочным названием Интерферон альфа-2b+Дифенгидрамина гидрохлорид, капли глазные 10 000 МЕ/мл+1 мг/мл, произведенных разными производителями и отличающихся только наличием различных консервантов в двух из них (препараты № 7, 20 в табл. 1) и отсутствием такового в третьем (препарат № 21 в табл. 1). Нейтрализация интерферона в препаратах с консервантами происходила только при использовании поликлональных антител, а в препарате без консерванта — и моно-, и поликлональными антителами.

Обращает на себя внимание и тот факт, что интерферон в препарате Иммуноглобулин человека нормальный [IgG+IgA+IgM]+Интерферон альфа-2b, суппозитории вагинальные и ректальные, 200 мг+500 000 МЕ (препарат № 19 в табл. 1), произведенном на разных производственных площадках с использованием субстанции ИФН альфа-2b человеческого рекомбинантного двух производителей, не во всех случаях нейтрализуется моноклональными антителами. Можно предположить, что полученные результаты обусловлены наличием в препарате действующего вещества биологического происхождения («Иммуноглобулиновый комплексный препарат»), имеющего неоднородный и неопределенный состав и свойства.

Способность поликлональных антител нейтрализовать противовирусную активность ИФН во всех испытанных образцах позволяет предположить, что они содержат паратопы ко всем антигенным детерминантам, определяющим специфичность белковой макромолекулы интерферона. В то же время моноклональные антитела, способные распознавать только одну определенную детерминанту, нейтрализуют интерферон лишь в образцах испытанных субстанций и препаратов, не имеющих в составе иных действующих и вспомогательных веществ.

Заключение

Проведено исследование взаимодействия образцов субстанций ИФН альфа-2b разных производителей и изготовленных из них лекарственных препаратов различного состава с моно- и поликлональными антителами с целью оценки пригодности последних для определения показателя «Подлинность» в реакции нейтрализации противовирусной активности.

Сравнительный анализ полученных данных позволяет заключить, что результат взаимодействия ИФН альфа-2b с антителами зависит от состава препарата. Субстанции и инъекционные препараты, не содержащие никаких вспомогательных веществ, кроме буферной системы, нейтрализуются как моно-, так и поликлональными антителами. Если в состав препарата входят сложные неорганические и органические вещества, то только поликлональные антитела нейтрализуют интерферон в этих препаратах. Моноклональные антитела с интерфероном в таких препаратах, как правило, не взаимодействуют.

Таким образом, влияние сложных химических и биологических соединений в составе лекарственного препарата (в ка-

честве действующих или вспомогательных веществ) на способность интерферона альфа-2b нейтрализоваться антителами очевидно. Но противоречивость полученных данных не позволяет интерпретировать их однозначно. Можно предположить, что единственная детерминанта, с которой взаимодействует моноклональное антитело в субстанции, в препарате сложного состава может быть недоступна для взаимодействия из-за изменения конформации молекулы в присутствии различных веществ.

Проведенное исследование позволяет заключить, что поликлональные антитела универсальны с точки зрения возможности их использования для определения подлинности любого препарата, содержащего ИФН альфа-2b. Применение с этой целью моноклональных антител ограничено. Прежде чем рекомендовать использовать моноклональные антитела для определения подлинности препаратов сложного состава, следует предварительно убедиться в их способности нейтрализовать противовирусную активность интерферона в каждом конкретном случае.

Вклад авторов. Л. А. Гайдерова — общее руководство исследованиями, окончательное редактирование текста статьи; Ю. Н. Лебедева — концепция и дизайн исследования, получение экспериментальных данных, оформление и интерпретация результатов, редактирование экспериментальных разделов статьи; Т. Н. Лобанова — анализ и интерпретация результатов, написание и оформление рукописи, редактирование и переработка рукописи; Е. А. Луканова — определение специфической активности ИФН и титра антител.

Authors' contributions. Lidiya A. Gayderova—general management of the study, final editing of the paper; Yuliya N. Lebedeva—elaboration of the study concept and design, obtaining of the experimental data, presentation and interpretation of the results, editing of the parts of the paper describing the experiments; Tatyana N. Lobanova—analysis and interpretation of the results, writing, formatting, revising, and editing of the paper; Ekaterina A. Lukinova—determination of the specific activity of IFN and antibody titer.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

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

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

Литература/References

1. Li SF, Gong MJ, Zhao FR, Shao JJ, Xie YL, Zang YG, et al. Type I interferons: distinct biological activities and current applications for viral infection. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(5):2377–96. <https://doi.org/10.1159/000495897>
2. Wang H, Hu H, Zhang K. Overview of interferon: characteristics, signaling and anti-cancer effect. *Arch Biotechnol Biomed*. 2017;1:001–016. <https://doi.org/10.29328/journal.hjb.1001001>
3. Bekisz J, Baron S, Balinsky C, Morrow A, Zoon KS. Antiproliferative properties of type I and type II interferon. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010;3(4):994–1015. <https://doi.org/10.3390/ph3040994>

Таблица 1. Сведения о составе лекарственных препаратов отечественного производства на основе ИФН альфа-2b
Table 1. Information about the composition of Russian-produced IFN alpha-2b-based products

№ п/л No.	Название Name	МНН / группировочное наименование, лекарственная форма, дозировка INN / generic name, dosage form, strength	Производитель / производственная площадка Manufacturer / manufacturing site	Действующие вещества, производитель Active ingredients, manufacturer	Вспомогательные вещества Excipients
1	Альтевир®, раствор для инъекций 1 млн МЕ/мл, 3 млн МЕ/мл, 5 млн МЕ/мл, 10 млн МЕ/мл Altevir® solution for injection 1 million IU/mL, 3 million IU/mL, 5 million IU/mL, 10 million IU/mL	Интерферон альфа-2b, раствор для инъекций, 1 млн МЕ/мл, 3 млн МЕ/мл, 5 млн МЕ/мл, 10 млн МЕ/мл Interferon alpha-2b, solution for injection 1 million IU/mL, 3 million IU/mL, 5 million IU/mL, 10 million IU/mL	ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА» Pharmstandard-UfaVITA, JSC	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк» Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC	Натрия ацетат, натрия хлорид, динатрия эдетата дигидрат, полисорбат 80, декстран 40, раствор для инфузий 10%, вода для инъекций Sodium acetate, sodium chloride, disodium edetate dihydrate, polysorbate 80, dextran 40, solution for infusion 10%, water for injection
2	ВИФЕРОН®, гель для наружного и местного применения 36000 МЕ/г VIFERON®, topical gel 36000 IU/g	Интерферон альфа-2b, гель для наружного и местного применения, 36000 МЕ/г Interferon alpha-2b, topical gel, 36000 IU/g	ООО «ФЕРОН» FERON, OOO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк» Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC	Альфа-токоферола ацетат, метионин, бензойная кислота, лимонной кислоты моногидрат, натрия тетрагидрат декагидрат, натрия хлорид, альбумин человека, глицерин дистиллированный (Глицерол), кармеллоза натрия, этанол 99%, вода очищенная Alpha-tocopherol acetate, methionine, benzoic acid, citric acid monohydrate, sodium tetraborate decahydrate, sodium chloride, human albumin, distilled glycerin (Glycerol), carmellose sodium, ethanol 99%, purified water
3	ВИФЕРОН®, мазь для наружного и местного применения 40000 МЕ/г VIFERON®, topical ointment 40000 IU/g	Интерферон альфа-2b, мазь для наружного и местного применения, 40000 МЕ/г Interferon alpha-2b, topical ointment, 40000 IU/g	ООО «ФЕРОН» FERON, OOO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк» Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC	Альфа-токоферола ацетат, ланолин безводный, вазелин медицинский, альбумин человека, масло персиковое, вода очищенная Alpha-tocopherol acetate, anhydrous lanolin, medical vaseline, human albumin, peach oil, purified water
4	ВИФЕРОН®, суппозитории ректальные 150000 МЕ, 500000 МЕ, 1000000 МЕ, 3000000 МЕ VIFERON®, rectal suppositories 150000 IU, 500000 IU, 1000000 IU, 3000000 IU	Интерферон альфа-2b, суппозитории ректальные, 150000 МЕ, 500000 МЕ, 1000000 МЕ, 3000000 МЕ Interferon alpha-2b, rectal suppositories, 150000 IU, 500000 IU, 1000000 IU, 3000000 IU	ООО «ФЕРОН» FERON, OOO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк» Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC	Аскорбиновая кислота, натрия аскорбат, альфа-токоферола ацетат, динатрия эдетата дигидрат, полисорбат-80, масло какао, альбумин человека, жир кондитерский или заменитель какао масла Ascorbic acid, sodium ascorbate, alpha-tocopherol acetate, disodium edetate dihydrate, polysorbate-80, cocoa butter, human albumin, confectionery fat or cocoa butter substitute
5	ГРИППФЕРОН®, капли назальные 10000 МЕ/мл GRIPPFERON®, nasal drops 10000 IU/mL	Интерферон альфа-2b, капли назальные, 10000 МЕ/мл Interferon alpha-2b, nasal drops, 10000 IU/mL	ООО «Фирн М» Firm M, OOO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк» Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC, Firm M, OOO	Динатрия эдетата дигидрат, натрия хлорид, натрия гидрофосфата додекагидрат, калия дигидрофосфат, повидон-8 тыс., макрогол 4000, вода очищенная Disodium edetate dihydrate, sodium chloride, disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, potassium dihydrogen phosphate, povidone 8000, polyethylene glycol 4000, purified water
6	ГРИППФЕРОН®, спрей назальный дозированный 500 МЕ/доза GRIPPFERON®, metered-dose nasal spray 500 IU/dose	Интерферон альфа-2b, спрей назальный дозированный, 500 МЕ/доза Interferon alpha-2b, metered-dose nasal spray, 500 IU/dose	ООО «Фирн М» Firm M, OOO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк» Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC	Динатрия эдетата дигидрат, натрия хлорид, натрия гидрофосфата додекагидрат, калия дигидрофосфат, повидон-8 тыс., макрогол 4000, вода очищенная Disodium edetate dihydrate, sodium chloride, disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, potassium dihydrogen phosphate, povidone 8000, polyethylene glycol 4000, purified water

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

№ п/п No.	Название Name	МНН / группировочное наименование, лекарственная форма, дозировка INN / generic name, dosage form, strength	Производитель / производственная площадка Manufacturer / manufacturing site	Действующие вещества, производители Active ingredients, manufacturer	Вспомогательные вещества Excipients
7	Офтальмоферон®, капли глазные 10000 МЕ/мл+1 мг/мл Oftalmoferon®, eye drops 10000 IU/mL+1 mg/mL	Интерферон альфа-2b+Дифенгидрамина гидрохлорид, капли глазные, 10000 МЕ/мл+1 мг/мл Interferon alpha-2b+Diphenhydramine hydrochloride, eye drops, 10000 IU/mL+1 mg/mL	ООО «Фирн М» Firm M, OOO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк», ООО «Фирн М», дифенгидрамина гидрохлорид (1) ^а Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC, Firm M, OOO, diphenhydramine hydrochloride (1) ^a	Кислота борная, динатрия эдетат, натрия хлорид, натрия ацетат, гипромеллоза, повидон-8 тыс., макрогол 4000, вода очищенная Boric acid, disodium edetate, sodium chloride, sodium acetate, hypromellose, povidone 8000, polyethylene glycol 4000, purified water
8	ГЕРПФЕРОН®, мазь для местного и наружного применения 20000 МЕ/г+30 мг/г+10 мг/г HERPHERON®, topical ointment 20000 IU/g+30 mg/g+10 mg/g	Интерферон альфа-2b+ацикловир+лидокаин, мазь для местного и наружного применения, 20000 МЕ/г+30 мг/г+10 мг/г Interferon alpha-2b+acyclovir+lidocaine, topical ointment, 20000 IU/g+30 mg/g+10 mg/g	ООО «Фирн М» Firm M, OOO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк», ЗАО «Вектор-Медика», ЗАО «Биокад», ацикловир (1), лидокаин гидрохлорид (1) Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC, Vektor-Medika, ZAO, Biocad, ZAO, acyclovir (1), lidocaine hydrochloride (1)	Метилпарагидроксibenzoат, макрогол 1500, макрогол 400, polyethylene glycol 1500, polyethylene glycol 400
9	АЛЛЕРГОФЕРОН®, гель для местного и наружного применения 5000 МЕ/г+10 мг/г ALLERGOFERON®, topical gel 5000 IU/g+10 mg/g	Интерферон альфа-2b+лоратадин, гель для местного и наружного применения, 5000 МЕ/г+10 мг/г Interferon alpha-2b+loratadine, topical gel, 5000 IU/g+10 mg/g	ООО «Фирн М» Firm M, OOO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк», ЗАО «Вектор-Медика», лоратадин (1) Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC, Vektor-Medika, ZAO, loratadine (1)	Сорбиновая кислота, динатрия эдетата дигидрат, карбомер, макрогол 4000, макрогол 400, троламин, вода очищенная Sorbic acid, disodium edetate dihydrate, carbomer, polyethylene glycol 4000, polyethylene glycol 400, trolamine, purified water
10	ВАГИФЕРОН®, суппозитории вагинальные 50000 МЕ+250 мг+150 мг VAGIFERON®, vaginal suppositories, 50000 IU+250 mg+150 mg	Интерферон альфа-2b+метронидазол+флуконазол, суппозитории вагинальные, 50000 МЕ+250 мг+150 мг Interferon alpha-2b+metronidazole+fluconazole, vaginal suppositories, 50000 IU+250 mg+150 mg	ООО «Фирн М» Firm M, OOO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк», ЗАО «Вектор-Медика», метронидазол (2) ^а , флуконазол (2) Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC, Vektor-Medika, ZAO, metronidazole (2) ^a , fluconazole (2)	Борная кислота, динатрия эдетат, макрогол 400, макрогол 1500 Boric acid, disodium edetate, polyethylene glycol 400, polyethylene glycol 1500

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

№ п/п No.	Название Name	МНН / группировочное наименование, лекарственная форма, дозировка INN / generic name, dosage form, strength	Производитель / производственная площадка Manufacturer / manufacturing site	Действующие вещества, производители Active ingredients, manufacturer	Вспомогательные вещества Excipients
11	ГРИППФЕРОН® с лоратадином, мазь назальная, 10000 МЕ/г+2 мг/г GRIPPERON® with loratadine, nasal ointment 10000 IU/g+2 mg/g	Интерферон альфа-2b+лоратадин, мазь назальная, 10000 МЕ/г+2 мг/г Interferon alpha-2b+loratadine, nasal ointment, 10000 IU/g+2 mg/g	ООО «Фирн М» Firm M, OOO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк», ЗАО «Вектор-Медика», лоратадин (1) Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC, Vektor-Medika, ZAO, loratadine (1)	Борная кислота, натрия тетрабората декагидрат, глицерол, динатрия эдетата дигидрат, гипромеллоза, макрогол 400, макрогол 4000, вода очищенная Boric acid, sodium tetraborate decahydrate, glycerol, disodium edetate dihydrate, hypromellose, polyethylene glycol 400, polyethylene glycol 4000, purified water
12	Бинноферон альфа®, раствор для внутривенного и подкожного введения, 1 млн МЕ/0,3 мл, 3 млн МЕ/0,9 мл, 5 млн МЕ/0,5 мл, 6 млн МЕ/0,3 мл, 10 млн МЕ/мл, 12 млн МЕ/0,6 мл, 18 млн МЕ/0,9 мл Binopheron alpha®, solution for intravenous and subcutaneous injection, 1 million IU/0.3 mL, 3 million IU/0.9 mL, 5 million IU/0.5 mL, 6 million IU/0.3 mL, 10 million IU/mL, 12 million IU/0.6 mL, 18 million IU/0.9 mL	Интерферон альфа-2b, раствор для внутривенного и подкожного введения, 1 млн МЕ/0,3 мл, 3 млн МЕ/0,9 мл, 5 млн МЕ/0,5 мл, 6 млн МЕ/0,3 мл, 10 млн МЕ/мл, 12 млн МЕ/0,6 мл, 18 млн МЕ/0,9 мл Interferon alpha-2b, solution for intravenous and subcutaneous injection, 1 million IU/0.3 mL, 3 million IU/0.9 mL, 5 million IU/0.5 mL, 6 million IU/0.3 mL, 10 million IU/mL, 12 million IU/0.6 mL, 18 million IU/0.9 mL	АО «Биннофарм» Binnopharm, JSC	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, АО «Биннофарм» Human recombinant IFN alpha-2b, Binnopharm, JSC	Натрия ацетата тригидрат, натрия хлорид, дигидрат динатриевой соли этилендиамина, тетраацетатной кислоты, полисорбат 80, гидроксипропилкрахмал 200, уксусная кислота ледяная, вода для инъекций Sodium acetate trihydrate, sodium chloride, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, polysorbate 80, hydroxyethyl starch 200, glacial acetic acid, water for injection
13	Реаферон-ЛИПИНТ®, капсулы, 500000 МЕ Reaferon-LIPINT®, capsules, 500000 IU	Интерферон альфа-2b, капсулы, 500000 МЕ Interferon alpha-2b, capsules, 500000 IU	ЗАО «Вектор-Медика» Vektor-Medika, ZAO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ЗАО «Вектор-Медика» Human recombinant IFN alpha-2b, Vektor-Medika, ZAO	Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный (натрий гидрофосфат додекагидрат), натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный (натрий дигидрофосфат дигидрат), липоид С 100 (фосфатидилхолин), холестерол, альфа-токоферола ацетат (витамин Е-ацетат), лактозы моногидрат, кремния диоксид коллоидный безводный, титана диоксид, желатин Sodium chloride, sodium hydrogen phosphate dihydrate, lipid dodecahydrate, sodium dihydrogen phosphate dihydrate, lipid C 100 (phosphatidylcholine), cholesterol, alpha-tocopherol acetate (vitamin E acetate), lactose monohydrate, anhydrous colloidal silicon dioxide, titanium dioxide, gelatin

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

№ п/п No.	Название Name	МНН / группировочное наименование, лекарственная форма, дозировка INN / generic name, dosage form, strength	Производитель / производственная площадка Manufacturer / manufacturing site	Действующие вещества, производитель Active ingredients, manufacturer	Вспомогательные вещества Excipients
14	Интерфераль®, аэрозоль для местного применения 100000 ME Interferal®, topical aerosol 100000 IU	Интерферон альфа-2b, аэрозоль для местного применения, 100000 ME Interferon alpha-2b, topical aerosol, 100000 IU	ЗАО «Алтайвитамины» Altayvitamins, ZAO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России Human recombinant IFN alpha-2b, National Research Institute of High-Purity Biologicals	Натрия гидрофосфата додекагидрат, натрия дигидрофосфата дигидрат, натрия хлорид, динатрия эдетат, декстран (средняя ММ 50000–70000), полисорбат-80, альфа-токоферола ацетат, бензалкония хлорид, бензойная кислота, этанол 95%, вода очищенная, азот Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, sodium dihydrogen phosphate dihydrate, sodium chloride, disodium edetate, dextran (average mw 50000–70000), polysorbate 80, alpha-tocopherol acetate, benzalkonium chloride, benzoic acid, ethanol 95%, purified water, nitrogen
15	Генферон®, суппозитории вагинальные и ректальные 55 мг+250000 ME+10 мг, 55 мг+500000 ME+10 мг, 55 мг+1000000 ME+10 мг Genferon®, vaginal and rectal suppositories 55 mg+250000 IU+10 mg, 55 mg+500000 IU+10 mg, 55 mg+1000000 IU+10 mg	Бензокаин+Интерферон альфа-2b+Таурин, суппозитории вагинальные и ректальные, 55 мг+250000 ME+10 мг, 55 мг+500000 ME+10 мг, 55 мг+1000000 ME+10 мг Benzocaine+Interferon alpha-2b+Taurine, vaginal and rectal suppositories, 55 mg+250000 IU+10 mg, 55 mg+500000 IU+10 mg, 55 mg+1000000 IU+10 mg	ЗАО «Биокад» Biocad, ZAO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ЗАО «Биокад», бензокаин (1), таурин (1) Human recombinant IFN alpha-2b, Biocad, ZAO, benzocaine (1), taurine (1)	«Твердый жир», декстран 60000, макрогон 1500, полисорбат 80, эмульгатор Т 2, натрия гидротрицитрат, лимонная кислота, вода очищенная “Hard fat”, dextran 60000, polyethylene glycol 1500, polysorbate 80, T2 emulsifier, sodium citrate, citric acid, purified water
16	Генферон® Лайт, капли назальные 10000 ME/мл+0.8 мг/мл Genferon® Light, nasal drops 10000 IU/mL+0.8 mg/mL	Интерферон альфа-2b+Таурин, капли назальные, 10000 ME/мл+0.8 мг/мл Interferon alpha-2b+Taurine, nasal drops, 10000 IU/mL+0.8 mg/mL	ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА» Pharmstandard-UfaVITA, JSC	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ЗАО «Биокад», таурин (1) Human recombinant IFN alpha-2b, Biocad, ZAO, taurine (1)	Династрия эдетата дигидрат, глицерол, декстран 40000, полисорбат 80, натрия хлорид, калия хлорид, натрия гидрофосфат, калия гидрофосфат, вода для инъекций Disodium edetate dihydrate, glycerol, dextran 40000, polysorbate 80, sodium chloride, potassium chloride, disodium phosphate, dipotassium phosphate, water for injection
17	Генферон® Лайт, спрей назальный дозированный 50000 ME/доза+1 мг/доза Genferon® Light, metered-dose nasal spray 50000 IU/dose+1 mg/dose	Интерферон альфа-2b+Таурин, спрей назальный дозированный, 50000 ME/доза+1 мг/доза Interferon alpha-2b+Taurine, metered-dose nasal spray, 50000 IU/dose+1 mg/dose	ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА» Pharmstandard-UfaVITA, JSC	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ЗАО «Биокад», таурин (1) Human recombinant IFN alpha-2b, Biocad, ZAO, taurine (1)	Династрия эдетата дигидрат, глицерол, декстран 40000, полисорбат 80, натрия хлорид, калия хлорид, натрия гидрофосфата додекагидрат, калия дигидрофосфат, масло мяты перечной, метилпарагидроксибензоат, вода для инъекций Disodium edetate dihydrate, glycerol, dextran 40000, polysorbate 80, sodium chloride, potassium chloride, disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, potassium dihydrogen phosphate, peppermint oil, methyl parahydroxybenzoate, water for injection

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

№ п/п No.	Название Name	МНН / группировочное наименование, лекарственная форма, дозировка INN / generic name, dosage form, strength	Производитель / производственная площадка Manufacturer / manufacturing site	Действующие вещества, производитель Active ingredients, manufacturer	Вспомогательные вещества Excipients
18	Генферон® Лайт, суппозитории вагинальные и ректальные 125000 МЕ+5 мг, 250000 МЕ+5 мг Genferon® Light, vaginal and rectal suppositories 125000 IU+5 mg, 250000 IU+5 mg	Интерферон альфа-2b+Таурин, суппозитории вагинальные и ректальные, 125000 МЕ+5 мг, 250000 МЕ+5 мг Interferon alpha-2b+Taurine, vaginal and rectal suppositories, 125000 IU+5 mg, 250000 IU+5 mg	ЗАО «Биокад» Biocad, ZAO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ЗАО «Биокад», таурин (1) Human recombinant IFN alpha-2b, Biocad, ZAO, taurine (1)	«Твердый жир», Декстран 60000, макрогол 1500, полисорбат 80, эмульгатор Т2, натрия гидроцитрат, лимонная кислота, вода очищенная "Hard fat", dextran 60000, polyethylene glycol 1500, polysorbate 80, T2 emulsifier, sodium citrate, citric acid, purified water
19	Кипферон®, суппозитории вагинальные и ректальные, 200 мг+500000 МЕ Kipferon®, vaginal and rectal suppositories, 200 mg+500000 IU	Имуноглобулин человека нормальный [IgG+IgA+IgM]+Интерферон альфа-2b, суппозитории вагинальные и ректальные, 200 мг+500000 МЕ Human normal immunoglobulin [IgG+IgA+IgM]+Interferon alpha-2b, vaginal and rectal suppositories, 200 mg+500000 IU	ООО «Алфарм»; АО «Биннофарм» Alfarm, OOO, Binnopharm, JSC	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк», АО «Биннофарм»; Иммуноглобулиновый комплексный препарат (1) Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC, Binnopharm, JSC; complex immunoglobulin preparation (1)	Жир специального назначения «СолПро» кондитерский для шоколадных изделий и конфет, парафин нефтяной твердый П-2, Эмульгатор «Твердый» (Т-2), натрия гидрофосфата додекагидрат, натрия дигидрофосфата дигидрат, натрия хлорид, вода очищенная SolPro special confectionery fat for chocolate products and candies, petroleum paraffin wax P-2, "Hard" emulsifier (T-2), disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, sodium dihydrogen phosphate dihydrate, sodium chloride, purified water
20	Интерферон-Офтальмо, капли глазные, 10000 МЕ/мл+1 мг/мл Interferon-Ophthalmic, eye drops, 10000 IU/mL+1 mg/mL	Интерферон альфа-2b+Дифенгидрамина гидрохлорид, капли глазные, 10000 МЕ/мл+1 мг/мл Interferon alpha-2b+Diphenhydramine hydrochloride, eye drops 10000 IU/mL+1 mg/mL	ЗАО «ЛЕККО» LEKKO, ZAO	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк», дифенгидрамина гидрохлорид (2) Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC; diphenhydramine hydrochloride (2)	Гипромеллоза (гидроксипропилметилцеллюлоза), полидрония хлорид, динатрия эдетат, борная кислота, натрия ацетат тригидрат, калия хлорид, вода очищенная Hypromellose (hydroxypropylmethyl cellulose), polyidronium chloride, disodium edetate, boric acid, sodium acetate trihydrate, potassium chloride, purified water
21	Препарат I ^b Preparation I ^b	Интерферон альфа-2b+Дифенгидрамина гидрохлорид, капли глазные, 10000 МЕ/мл+1 мг/мл Interferon alpha-2b+Diphenhydramine hydrochloride, eye drops 10000 IU/mL+1 mg/mL	Производитель I Manufacturer I	ИФН альфа-2b человеческий рекомбинантный, ООО «Фармапарк», дифенгидрамина гидрохлорид (2) Human recombinant IFN alpha-2b, Pharmapark LLC; diphenhydramine hydrochloride (2)	Гипромеллоза (гидроксипропилметилцеллюлоза), динатрия эдетат, калия хлорид, дикалия гидрофосфат, калия гидрофосфат, фосфорная кислота разведенная 10% или натрия гидроксида раствор 8,5%, вода очищенная Hypromellose (hydroxypropylmethyl cellulose), disodium edetate, potassium chloride, dipotassium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, phosphoric acid, diluted, 10% solution, or sodium hydroxide solution 8,5%, purified water

^a Цифра в скобках означает количество производителей действующего вещества, входящего в состав препарата.

^b Препарат не зарегистрирован на момент написания статьи.

^a The number in brackets indicates how many manufacturers produce the active ingredient included in the medicinal product.

^b Product was not registered at the time of this writing.

Таблица 2. Результаты взаимодействия субстанций интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного с моно- и поликлональными антителами
Table 2. Results of interaction of human recombinant interferon alpha-2b with mono- and polyclonal antibodies

№ п/п No.	Производитель субстанции Active ingredient manufacturer	Результат нейтрализации при использовании Result of neutralization following the use of			
		поликлональных антител polyclonal antibodies		моноклональных антител monoclonal antibodies	
		AT 31101-1	AT AP02801PU-N	AT MAV411	AT MAV413
1	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	+	+
2	АО «Биннофарм» Binnopharm, JSC	+	+	+	+
3	ООО «Фирн М» Firn M, OOO	+	+	+	+
4	ЗАО «Вектор-Медика» Vektor-Medika, ZAO	+	+	+	+
5	ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России National Research Institute of High-Purity Biologicals	+	+	+	+
6	ЗАО «Биокад» Biocad, ZAO	+	+	+	+

Таблица 3. Результаты взаимодействия препаратов на основе интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного с моно- и поликлональными антителами
Table 3. Results of interaction of human recombinant interferon alpha-2b products with mono- and polyclonal antibodies

№ п/п No.	МНН / группировочное наименование, лекарственная форма, дозировка INN / generic name, dosage form, strength	Производитель / производственная площадка Manufacturer / manufacturing site	Производитель субстанции ИФН альфа-2b Active ingredient IFN alpha-2b manufacturer	Результат нейтрализации Result of neutralization			
				поликлональными антителами by polyclonal anti-bodies		моноклональными антителами by monoclonal anti-bodies	
				AT 31101-1	AT AP-02801PU-N	AT MAV411	AT MAV413
1	Интерферон альфа-2b, раствор для инъекций, 1 млн МЕ/мл, 3 млн МЕ/мл, 5 млн МЕ/мл, 10 млн МЕ/мл Interferon alpha-2b, solution for injection, 1 million IU/mL, 3 million IU/mL, 5 million IU/mL, 10 million IU/mL	ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА» Pharmstandard-UfaVITA, JSC	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	+	+
2	Интерферон альфа-2b, гель для наружного и местного применения, 36000 МЕ/г Interferon alpha-2b, topical gel, 36000 IU/g	ООО «Ферон» Feron, OOO	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	-	-
3	Интерферон альфа-2b, мазь для наружного и местного применения, 40000 МЕ/г Interferon alpha-2b, topical ointment, 40000 IU/g	ООО «Ферон» Feron, OOO	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	-	-

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

№ п/п No.	Препарат Product		Производитель субстанции ИФН альфа-2b Active ingredient IFN alpha-2b manufacturer	Результат нейтрализации Result of neutralization			
	МНН / группировочное наименование, лекарственная форма, дозировка INN / generic name, dosage form, strength	Производитель / производственная площадка Manufacturer / manufacturing site		поликлональными антителами by polyclonal anti- bodies		моноклональными антителами by monoclonal anti- bodies	
				AT 31101-1	AT AP- 02801PU-N	AT MAV411	AT MAV413
4	Интерферон альфа-2b, суппозитории ректальные, 150000 ME, 500000 ME, 1000000 ME, 3000000 ME Interferon alpha-2b, rectal suppositories, 150000 IU, 500000 IU, 1000000 IU, 3000000 IU	ООО «Ферон» Feron, ООО	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	-	-
5	Интерферон альфа-2b, капли назальные, 10000 ME/мл Interferon alpha-2b, nasal drops, 10000 IU/mL	ООО «Фирн М» Firn M, ООО	ООО «Фармапарк», ООО «Фирн М» Pharmapark, LLC, Firm M, ООО	+	+	-	-
6	Интерферон альфа-2b, спрей назальный дозированный, 500 ME/доза Interferon alpha-2b, metered-dose nasal spray, 500 IU/dose	ООО «Фирн М» Firn M, ООО	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	-	-
7	Интерферон альфа-2b+Дифенгидрамина гидрохлорид, капли глазные, 10000 ME/мл+1 мг/мл Interferon alpha-2b+diphenhydramine hydrochloride, eye drops, 10000 IU/mL+1 mg/mL	ООО «Фирн М» Firn M, ООО	ООО «Фирн М» Firn M, ООО	+	+	-	-
8	Интерферон альфа-2b+ацикловир+лидокаин, мазь для местного и наружного применения, 20000 ME/г+30 мг/г+10 мг/г Interferon alpha-2b+acyclovir+lidocaine, topical ointment, 20000 IU/g+30 mg/g+10 mg/g	ООО «Фирн М» Firn M, ООО	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	-	-
9	Интерферон альфа-2b+лоратадин, гель для местного и наружного применения, 5000 ME/г+10 мг/г Interferon alpha-2b+loratadine, topical gel, 5000 IU/g+10 mg/g	ООО «Фирн М» Firn M, ООО	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	-	-
10	Интерферон альфа-2b+метронидазол+флуконазол, суппозитории вагинальные, 50000 ME+250 мг+150 мг Interferon alpha-2b+metronidazole+fluconazole, vaginal suppositories, 50000 IU+250 mg+150 mg	ООО «Фирн М» Firn M, ООО	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	-	-
11	Интерферон альфа-2b+лоратадин, мазь назальная, 10000 ME/г+2 мг/г Interferon alpha-2b+loratadine, nasal ointment, 10000 IU/g+2 mg/g	ООО «Фирн М» Firn M, ООО	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	-	-

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

№ п/п No.	Препарат Product		Результат нейтрализации Result of neutralization				
	МНН / группировочное наименование, лекарственная форма, дозировка INN / generic name, dosage form, strength	Производитель / площадка Manufacturer / manufacturing site	Производитель субстанции ИФН альфа-2b Active ingredient IFN alpha-2b manufacturer	ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ антителами by polyclonal anti-bodies		МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ антителами by monoclonal anti-bodies	
				AT 31101-1	AT AP-02801PU-N	AT MAV411	AT MAV413
12	Интерферон альфа-2b, раствор для внутривенного и подкожного введения, 1 млн МЕ/0,3 мл, 3 млн МЕ/0,9 мл, 5 млн МЕ/0,5 мл, 6 млн МЕ/0,3 мл, 10 млн МЕ/мл, 12 млн МЕ/0,6 мл, 18 млн МЕ/0,9 мл Interferon alpha-2b, solution for intravenous and subcutaneous injection, 1 million IU/0.3 mL, 3 million IU/0.9 mL, 5 million IU/0.5 mL, 6 million IU/0.3 mL, 10 million IU/mL, 12 million IU/0.6 mL, 18 million IU/0.9 mL	АО «Бинофарм» Binnopharm, JSC	АО «Бинофарм» Binnopharm, JSC	+	+	+	+
13	Интерферон альфа-2b, капсулы, 500000 МЕ Interferon alpha-2b, capsules, 500000 IU	ЗАО «Вектор-Медика» Vektor-Medika, ZAO	ЗАО «Вектор-Медика» Vektor-Medika, ZAO	+	+	+	+
14	Интерферон альфа-2b, аэрозоль для местного применения, 100000 МЕ Interferon alpha-2b, topical aerosol, 100000 IU	ЗАО «Алтайвитамины» Altayvitaminy, ZAO	ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России National Research Institute of High-Purity Biologicals	+	+	-	-
15	Бензокаин+интерферон альфа-2b+таурин, суппозитории вагинальные и ректальные, 55 мг+250000 МЕ+10 мг, 55 мг+500000 МЕ+10 мг, 55 мг+1000000 МЕ+10 мг Benzocaine+interferon alpha-2b+taurine, vaginal and rectal suppositories, 55 mg+250000 IU+10 mg, 55 mg+500000 IU+10 mg, 55 mg+1000000 IU+10 mg	ЗАО «Биокад» Biocad, ZAO	ЗАО «Биокад» Biocad, ZAO	+	+	-	-
16	Интерферон альфа-2b+таурин, капли назальные, 10000 МЕ/мл+0,8 мг/мл Interferon alpha-2b+taurine, nasal drops, 10000 IU/mL+0.8 mg/mL	ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА» Pharmstandard-UfaVITA, JSC	ЗАО «Биокад» Biocad, ZAO	+	+	-	-
17	Интерферон альфа-2b+таурин, спрей назальный дозированный, 50000 МЕ/доза+1 мг/доза Interferon alpha-2b+taurine, metered-dose nasal spray, 50000 IU/dose+1 mg/dose	ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА» Pharmstandard-UfaVITA, JSC	ЗАО «Биокад» Biocad, ZAO	+	+	-	-
18	Интерферон альфа-2b+таурин, суппозитории вагинальные и ректальные, 125000 МЕ+5 мг, 250000 МЕ+5 мг Interferon alpha-2b+taurine, vaginal and rectal suppositories, 125000 IU+5 mg, 250000 IU+5 mg	ЗАО «Биокад» Biocad, ZAO	ЗАО «Биокад» Biocad, ZAO	+	+	-	-

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

№ п/п No.	Препарат Product		Результат нейтрализации Result of neutralization				
	МНН / группировочное наименование, лекарственная форма, дозировка INN / generic name, dosage form, strength	Производитель / площадка Manufacturer / manufacturing site	Производитель субстанции ИФН альфа-2b Active ingredient IFN alpha-2b manufacturer	Поликлональными антителами by polyclonal anti-bodies		Моноклональными антителами by monoclonal anti-bodies	
				AT 31101-1	AT AP-02801PU-N	AT MAV411	AT MAV413
19	Иммуноглобулин человека нормальный [IgG+IgA+IgM]-интерферон альфа-2b, суппозитории вагинальные и ректальные, 200 мг+500000 ME Human normal immunoglobulin [IgG+IgA+IgM]-interferon alpha-2b, vaginal and rectal suppositories, 200 mg+500000 IU	ООО «Алфарм» Alfarm, OOO	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	-	-
20		ООО «Алфарм» Alfarm, OOO	АО «Биннофарм» Binnopharm, JSC	+	+	-	-
21	Интерферон альфа-2b+Дифенгидрамина гидрохлорид, капли глазные, 10000 МЕ/мл+1 мг/мл Interferon alpha-2b+Diphenhydramine hydrochloride, eye drops, 10000 IU/mL+1 mg/mL	АО «Биннофарм» Binnopharm, JSC	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	+	+
22	Интерферон альфа-2b+Дифенгидрамина гидрохлорид, капли глазные, 10000 МЕ/мл+1 мг/мл Interferon alpha-2b+Diphenhydramine hydrochloride, eye drops, 10000 IU/mL+1 mg/mL	ООО «Фирн М» Firn M, OOO	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	-	-
23	Интерферон альфа-2b+Дифенгидрамина гидрохлорид, капли глазные, 10000 МЕ/мл+1 мг/мл Interferon alpha-2b+Diphenhydramine hydrochloride, eye drops, 10000 IU/mL+1 mg/mL	ЗАО «ЛЕККО» LEKKO, ZAO	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	-	-
24	Интерферон альфа-2b+Дифенгидрамина гидрохлорид, капли глазные, 10000 МЕ/мл+1 мг/мл ^a Interferon alpha-2b+Diphenhydramine hydrochloride, eye drops, 10000 IU/mL+1 mg/mL ^a	Производитель I Manufacturer I	ООО «Фармапарк» Pharmapark, LLC	+	+	+	+

Примечание. «+» — происходит нейтрализация интерферона; «-» — нейтрализация интерферона не происходит. Темно-голубым цветом выделены варианты, где взаимодействие происходит со всеми типами антител.

^a Препарат на момент написания статьи не зарегистрирован.

Note. + neutralization of interferon; - no neutralization of interferon. Cases where all types of antibodies took part in the interaction are highlighted in dark blue.

^a Product was not registered at the time of this writing.

4. Bogdan C, Mattner J, Schleicher U. The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol. Rev.* 2004;202:33–48. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896>
5. Wang YS, Youngster S, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss DF. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alfa-2b and its therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(4):547–70. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00027-3](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00027-3)
6. Ершов ФИ, Киселев ОИ. *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005. [Ershov FI, Kiselev OI. *Interferons and their inducers (from molecules to drugs)*. Moscow: GEOTAR-Media; 2005 (In Russ.)]
7. Хаитов РМ. *Иммунология*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. [Khaitov RM. *Immunology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2013 (In Russ.)]
8. Баншеров Ж, Палукка АК, Паскуал В, Приллиман К. Моноклональные антитела против интерферона-альфа и способы применения. Патент Российской Федерации № 2431638; 2011. [Banshero J, Palukka AK, Paskual V, Prilliman K. Monoclonal antibodies against interferon-alpha and methods of application. Patent of the Russian Federation № 2431638; 2011 (In Russ.)]
9. Альтшулер Е, Серебряная Д, Катруха А. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности. *Успехи биологической химии*. 2010;50:203–58. [Altshuler E, Serebryanaya D, Katrukha A. Preparation of recombinant antibodies and ways to increase their affinity. *Uspechi biologicheskoi khimii = Advances in biological Chemistry*. 2010;50:203–58 (In Russ.)]
10. Мейл Д, Бростофф Дж, Рот ДБ, Ройт А. *Иммунология*. М.: Логосфера; 2007. [Male D, Brostoff J, Rot DB, Roitt A. *Immunology*. Moscow: Logosfera; 2007 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук. *Lidiya A. Gayderova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Лебедева Юлия Николаевна. *Yuliya N. Lebedeva*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8933-6966>

Лобанова Татьяна Николаевна, канд. биол. наук. *Tatyana N. Lobanova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8972-4851>

Лукинова Екатерина Александровна. *Ekaterina A. Lukinova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8260-2360>

Поступила 08.10.2020

После доработки 19.01.2021

Принята к публикации 26.02.2021

Received 8 October 2020

Revised 19 January 2021

Accepted 26 February 2021

Изучение биологических свойств штаммов *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* в качестве кандидатных для включения в состав вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой для людей

А. А. Троценко*, М. В. Коврижко, Э. А. Яговкин, В. С. Ванжа, А. А. Решетов

Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Газетный пер., 119/262/157, Ростов-на-Дону, 344000, Российская Федерация

Лептоспироз является одним из широко распространенных зоонозных заболеваний в России. Для снижения рисков, связанных с осложнением эпидемиологической обстановки, применяется лептоспирозная вакцина для человека, производимая с 1998 г. ФБУН РостовНИИМП Роспотребнадзора. В настоящее время увеличилась заболеваемость людей лептоспирозом, вызванным *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola*, отсутствующим в составе производимой лептоспирозной вакцины для людей. **Цель работы:** изучить биологические свойства штаммов *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* для обоснования их включения в вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую для людей. **Материалы и методы:** в исследовании были использованы два штамма лептоспир серовара *Canicola*: № 480 Удалов и Собака 2000. Оценка вирулентных свойств штамма проводили путем инфицирования золотистых хомячков. Данные, полученные для серий экспериментальной вакцины по показателю «Специфическая активность», сравнивали с соответствующими данными серий вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, применяемой для профилактики заболевания. Экспериментальную вакцину испытывали по показателям «Специфическая безопасность» и «Аномальная токсичность» согласно ФС 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая. **Результаты:** при проведении сравнения вирулентности двух штаммов лептоспир серовара *Canicola* № 480 Удалов и Собака 2000 было выявлено, что более высокой вирулентностью обладает *L. interrogans Canicola* штамм № 480 Удалов. Испытания полученных серий экспериментальной вакцины показали, что включение в нее вышеуказанного штамма не приводит к изменению изученных свойств вакцины. **Выводы:** подтверждена возможность введения в состав производимой вакцины штамма № 480 Удалов *L. interrogans Canicola*, а также ее эффективность и безопасность.

Ключевые слова: лептоспироз; *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola*; вакцина; вакцинопрофилактика; защитный титр антител; антигенные свойства

Для цитирования: Троценко АА, Коврижко МВ, Яговкин ЭА, Ванжа ВС, Решетов АА. Изучение биологических свойств штаммов *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* в качестве кандидатных для включения в состав вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой для людей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(1):64–69. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-64-69>

***Контактное лицо:** Троценко Александр Александрович; aatrozenko@gmail.com

Study of biological properties of *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strains as candidate components of human leptospirosis concentrated inactivated vaccine

A. A. Trotsenko*, M. V. Kovrizhko, E. A. Yagovkin, V. S. Vanzha, A. A. Reshetov

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology,
119/262/157 Gazetny lane, Rostov-On-Don 344000, Russian Federation

Leptospirosis is a widespread zoonosis in Russia. The human leptospirosis vaccine produced by Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology has been used since 1998 to minimise risks associated with deterioration of epidemiological situation. Lately, there has been an increase in the incidence of leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* which is not included in the human vaccine. **The aim of the study** was to analyse biological properties of *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strains to substantiate their inclusion into human leptospirosis liquid concentrated inactivated vaccine. **Materials and methods:** two *L. interrogans* serovar *Canicola* strains: Udalov 480 and Sobaka 2000 were used in the study. Virulent properties of the strains were evaluated by infecting Syrian hamsters, the data on specific activity of the experimental vaccine were compared to specific activity of the leptospirosis liquid concentrated inactivated vaccine used for disease prevention. The experimental vaccine was tested for Specific safety and Abnormal toxicity according to FS.3.3.1.0014.15 *Leptospirosis liquid concentrated inactivated vaccine*. **Results:** the comparison of Udalov 480 and Sobaka 2000 strains of *L. interrogans* serovar *Canicola* revealed higher virulence of Udalov 480. The tests performed for the experimental vaccine batches demonstrated that the inclusion of Udalov 480 strain did not affect the above-mentioned properties of the vaccine. **Conclusions:** the study demonstrated the possibility of using *L. interrogans* serovar *Canicola* strain Udalov 480 as a component of the currently produced vaccine, and confirmed the safety and efficacy of the new vaccine.

Key words: leptospirosis; *Leptospira interrogans* serovar *Canicola*; vaccine; preventive vaccination; protective antibody titer; antigenicity

For citations: Trotsenko AA, Kovrizhko MV, Yagovkin EA, Vanzha VS, Reshetov AA. Study of biological properties of *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* strains as candidate components of human leptospirosis concentrated inactivated vaccine.

Лептоспирозы занимают лидирующие позиции среди зоонозов по широте распространения природных и антропогенных очагов в Российской Федерации. Вакцинопрофилактика лептоспироза является важной составной частью общих противоэпидемических и профилактических мероприятий, проводимых при этой инфекции¹.

С целью специфической профилактики в нашей стране с 1998 г. применяется вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая². В вакцине используются культуры четырех серогрупп: *Leptospira interrogans Icterohaemorrhagiae copenhageni* (Крыса 2/466), *L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa (Microtus arvalis 30/469)*, *L. interrogans Pomona mozdok (48B/470)*, *L. interrogans Sejroe sejoere (Mus musculus 751/471)*, которые соответствуют эпидемиологической ситуации в Российской Федерации и странах СНГ.

Применение в системе противоэпидемических мероприятий отечественной лептоспирозной вакцины обеспечило значительное снижение уровня заболеваемости людей лептоспирозом [1]. Аналогичные результаты демонстрирует также и зарубежный опыт внедрения вакцин против лептоспироза [2, 3]. На сегодня цельноклеточные инактивированные вакцины являются единственным зарегистрированным типом иммунобиологических лекарственных препаратов для превентивной борьбы с заражением людей лептоспирами [4].

Лептоспироз относится к числу природно-очаговых инфекций, вызываемых лептоспирами, насчитывающими около 250 сероваров [5]. При этом происходит постоянная смена возбудителей в разных регионах мира, в том числе в Российской Федерации. В связи с этим качество вакцины и ее противоэпидемические показатели во многом определяются соответствием состава входящих в нее штаммов штаммам, циркулирующим в природе. В настоящее время в России и в мире увеличивается количество заболеваний лептоспирозом, вызываемым *L. interrogans* серогруппы *Canicola* [6–8], что требует введения в состав выпускаемой в России лептоспирозной вакцины для людей штамма *L. interrogans* серогруппы *Canicola*. Особую опасность для людей представляют домашние собаки, которые являются резервуаром каникулезного лептоспироза [9].

Цель работы — изучить биологические свойства штаммов *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* для обоснования их включения в вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую для людей.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) изучить вирулентные свойства штаммов *L. interrogans* серогруппы *Canicola*;
- 2) получить серии экспериментальной вакцины в соответствии с производственным регламентом на вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую;
- 3) провести сравнительное изучение образования специфических антител к лептоспирам в экспериментальной вак-

цине и в вакцине, применяемой для профилактики лептоспироза;

- 4) подтвердить соответствие экспериментальной вакцины требованиям ФС 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая по показателям «Специфическая безопасность» и «Аномальная токсичность»³.

Материалы и методы

Материалы

1. Рекомендуемые штаммы-кандидаты для включения в состав вакцины:

- *Leptospira interrogans* серогруппы *Canicola* № 480 Удалов, выделенный от больного лептоспирозом человека;
- *L. interrogans* серогруппы *Canicola* Собака 2000, выделенный из почки больной собаки.

Вышеуказанные штаммы-кандидаты находились в коллекции лептоспир в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и были получены сотрудниками ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Разрешение на использование штаммов-кандидатов для проведения работ по внедрению в применяемую вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую было получено от ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

Пять серий экспериментальной вакцины были произведены в период с 2018 по 2020 г. в лаборатории по научной разработке, внедрению и выпуску микробиологических и вирусологических препаратов ФБУН РостовНИИМП Роспотребнадзора. Форма выпуска — суспензия 0,5 мл/доза. В течение срока исследования экспериментальную вакцину хранили в соответствии с СП 3.3.2.3332-16⁴ при температуре от 2 до 8 °С. Показатель «Специфическая активность» контролировали с учетом проверки антигенности штамма № 480 Удалов *L. interrogans Canicola*. Серии экспериментальной вакцины были проверены по показателям «Аномальная токсичность», «Специфическая безопасность» согласно ФС 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая⁵.

2. После контроля каждой серии экспериментальной вакцины данные по показателю «Специфическая активность» сравнивали с протоколами испытаний серий вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, выпущенной в гражданский оборот (номера серий: 1-0518, 2-0818, 1-0219, 2-0719, 1-0720).

3. Исследование серий экспериментальной вакцины по показателю «Специфическая активность» выполняли на аутбредных сирийских золотистых хомячках в возрасте 3–4 недели (массой (22±3) г).

4. Исследование серий экспериментальной вакцины по показателю «Аномальная токсичность» проводили на белых нелинейных мышах обоего пола (массой 19–21 г) и на морских свинках (массой 250–300 г).

¹ Методические указания 3.1.1128–02 Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний людей лептоспирозами.

² <https://grls.rosminzdrav.ru>

³ Фармакопейная статья 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая, суспензия для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁴ Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.3332-16 Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов. Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 17.02.2016 № 19.

⁵ Фармакопейная статья 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая, суспензия для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Лабораторные животные были выращены в условиях конвенционального вивария ФБУН РостовНИИМП Роспотребнадзора. В период проведения исследования животных содержали в изолированном помещении конвенционального вивария при температуре 22–24 °С и относительной влажности воздуха не выше 60% в условиях свободного доступа к корму и воде на стандартном рационе кормления. При проведении экспериментов соблюдали общепринятые этические нормы обращения с животными на основе стандартных операционных процедур, которые соответствуют правилам, принятым Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях⁶, и в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Методы

1. Вирулентные свойства возбудителей *L. interrogans* серогруппы *Canicola* изучали на экспериментальных животных (золотистые хомячки).

В опыте использовали три группы животных по три особи в каждой группе. Первую группу заражали внутрибрюшинно культурой *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов с содержанием 180×190 клеток лептоспир в дозе 1,0 мл в поле зрения темнопольного микроскопа при увеличении ×200, вторую группу заражали внутрибрюшинно культурой *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм Собака 2000, с содержанием 180×190 клеток лептоспир в дозе 1,0 мл в поле зрения темнопольного микроскопа при увеличении ×200. Контрольной третьей группе вводили внутрибрюшинно раствор натрия хлорида 0,9% в объеме 1,0 мл.

Оценку вирулентных свойств возбудителей проводили на пятые сутки после заражения экспериментальных животных культурой лептоспир, основываясь на результатах, полученных при вскрытии золотистых хомячков и посева коркового слоя почек этих животных в бактериологические пробирки со средой Терских. Посевы инкубировали в течение 7 сут в термостате при температуре (28±1) °С. Затем отбирали 0,02 мл микробной взвеси и просматривали не менее 30 полей зрения в темном поле микроскопа при увеличении ×200.

2. Пять серий экспериментальной вакцины получали в соответствии с производственным регламентом на вакцину лептоспирозную концентрированную инaktivированную жидкую. Экспериментальная вакцина состоит из смеси инaktivированных концентрированных культур лептоспир четырех серогрупп (*Leptospira interrogans lcterohaemorrhagiae copenhageni* (Крыса 2/466), *L. interrogans Grippotyphosa grippotyphosa* (*Microtus arvalis* 30/469), *L. interrogans Pomona mozdok* (48B/470), *L. interrogans Sejroe sejroe* (*Mus musculus* 751/471)) с добавлением штамма-кандидата № 480 Удалов *L. interrogans* серогруппы *Canicola*.

Инактивацию лептоспир проводили 30% раствором формальдегида, добавляя его в культуральную жидкость до концентрации 0,35%, и выдерживали 24 ч при комнатной температуре. Через указанный промежуток времени делали мазки и микроскопировали в темном поле зрения при увеличении ×200. Просматривали не менее 30 полей зрения. Критерием

того, что инактивация прошла в полном объеме, являлось отсутствие активных движений лептоспир при сохранении морфологии клеток.

3. Идентификацию штаммов лептоспир, входящих в состав экспериментальной вакцины, проводили с помощью перекрестной реакции микроагглютинации с эталонными контрольными штаммами лептоспир, входящими в состав диагностического набора Сыворотки групповые агглютинирующие лептоспирозные (ФКП «Армавирская биофабрика») в соответствии с инструкцией по применению.

4. Подсчет количества клеток лептоспир в экспериментальной вакцине осуществляли по методу А.П. Власовой, А.С. Фоменко [10], который основан на выявлении соотношения между площадью поля зрения и площадью, занимаемой исследуемой культурой, распределенной под покровным стеклом 18×18 мм, с учетом кратности увеличения оптической системы микроскопа, объема взятой культуры, среднего числа лептоспир в поле зрения микроскопа и кратности разведения культуры. Расчет проводили по формуле (1):

$$K = (3570,4 \times 50 \times M) / 2, \quad (1)$$

где K — число лептоспир в 1 мл; 3570,4 — коэффициент, указывающий, во сколько раз площадь распределения культуры под стеклом превышает площадь поля зрения; 50 — коэффициент, указывающий, во сколько раз объем 1 мл превышает объем исследуемой культуры; M — среднее число лептоспир в поле зрения [8]. Анализировали пять ампул экспериментальной вакцины по 0,02 мл и просматривали в поле зрения темнопольного микроскопа при увеличении ×200. Рассчитанный по формуле результат делили на 2, с учетом дозировки экспериментальной вакцины.

5. Образование специфических антител в защитных титрах к лептоспирам, входящим в состав экспериментальной вакцины, изучали по показателю «Специфическая активность» согласно ФС 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инaktivированная жидкая⁷, где отмечено, что препарат должен вызывать у золотистых хомячков образование специфических антител, выявляемых в реакции микроагглютинации со штаммами лептоспир в титре не менее чем 1:100, защищать не менее 3 из 4 животных от заражения вирулентной культурой. В эксперименте на каждую серию вакцины использовали по 3 золотистых хомячка для иммунизации экспериментальной вакциной и по две группы золотистых хомячков по 4 особи в каждой (4 иммунизированных и 4 неиммунизированных (контрольных)) для проведения теста активной защиты⁸.

Золотистым хомячкам массой (22±3) г однократно внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл экспериментальной вакцины. Через 20 сут после иммунизации у животных забирали кровь, собирали ее во флаконы (пробирки) и инкубировали в термостате в течение 30–40 мин при температуре (37±1) °С, затем выдерживали в холодильнике при температуре (6±2) °С в течение 24 ч. Для выявления специфических антител полученную иммунную сыворотку крови отбирали в стерильные пробирки и проводили реакцию микроагглютинации. В качестве антигенов использовали штаммы лептоспир, входящие в состав экспериментальной вакцины. Учет результатов реакции проводили

⁶ European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123). Strasbourg; 1986.

⁷ Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS No. 170). Strasbourg; 1998.

⁸ Фармакопейная статья 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инaktivированная жидкая, суспензия для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁸ Там же.

визуально по условной системе оценок трех крестов⁹. Для определения защитных свойств экспериментальной вакцины 4 золотистым хомячкам массой (22±3) г однократно внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл вакцины. Через 20 сут 4 иммунизированных и 4 неиммунизированных (контрольных) животных заражали внутрибрюшинно культурой *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов с содержанием 180×190 клеток лептоспир в темном поле зрения при увеличении ×200 в объеме 1 мл. Наблюдение за животными вели в течение 7 сут. Отбор образцов экспериментальной вакцины для данного эксперимента осуществляли методом случайного отбора¹⁰.

6. Оценку серий экспериментальной вакцины по показателю «Специфическая безопасность» проводили микробиологическим методом (метод прямого посева) на среду Терских. По 0,2 мл экспериментальной вакцины засеивали в 3 бактериологические пробирки с 7 мл фосфатно-сывороточной среды Терских. Пробирки помещали в термостат и выдерживали при температуре (28±1) °C в течение 20 сут. Через указанный промежуток времени делали мазки и микроскопировали в темном поле зрения при увеличении ×200. Просматривали не менее 30 полей зрения. Критерием оценки теста на специфическую безопасность являлось отсутствие в посевах живых лептоспир.

7. Оценку серий экспериментальной вакцины по показателю «Аномальная токсичность» проводили биологическим методом в соответствии с ОФС 1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность в тесте для иммунобиологических лекарственных препаратов¹¹.

8. Статистическая обработка данных. Результаты обрабатывали с помощью программы Microsoft Office Excel. Определяли среднее геометрическое значение титров антител.

При подсчете количества клеток лептоспир в экспериментальной вакцине проводили статистическую обработку данных с помощью программы Microsoft Office Excel. Определяли среднее арифметическое значение (*M*) и стандартное отклонение (*SD*).

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы проводили исследования по оценке вирулентных свойств изучаемых штаммов. Золотистые хомячки, зараженные *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов, пали на пятые сутки. У погибших животных при вскрытии была отмечена выраженная желтушность и многочисленные кровоизлияния на слизистых оболочках и в подкожной клетчатке, наиболее интенсивные в области скелетных мышц, почек, печени, желудка, селезенки. Наблюдался выраженный отек почечной и печеночной ткани, деструктивные и некротические изменения паренхимы органов. Почки были увеличены и имели размеры 11,3×6 мм при норме 7,5×4 мм у хомячков в возрасте 3 недель. При посеве коркового слоя почек на среду Терских выделялась культура лептоспир. Идентификация лептоспир, выделенных при посеве на среде Терских, показала, что культура соответствует серогруппе *Canicola*.

У животных, зараженных *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм Собака 2000, на пятые сутки было отмечено легкое угнетение, снижение аппетита. У животных этой группы на пятые сутки клинические признаки заболевания не проявлялись. При вскрытии хомячков обнаружена невыраженная желтушность

слизистых покровов и подкожной клетчатки. Макроскопических изменений внутренних органов не выявлено. При посеве коркового слоя почек животных на среду Терских не выделялась культура лептоспир.

Животные контрольной группы на пятые сутки клинических признаков заболевания не проявляли, при внешнем осмотре степень физической активности находилась в пределах физиологической нормы, поедаемость корма была нормальной, при взвешивании потери массы тела отмечено не было. При вскрытии животных отмечены чистые слизистые покровы, положение внутренних органов брюшной полости без изменений. Печень и почки красно-коричневого темного цвета, консистенция — плотная, эластичная; имели характерный рисунок на разрезе. Серозная оболочка кишечника гладкая, блестящая, без видимых изменений. Серозная оболочка желудка без очаговых поражений, некрозов, кровоизлияний, язв. Желтушность внутренних органов отсутствовала. Макроскопических изменений внутренних органов не выявлено. При посеве коркового слоя почек животных на среду Терских не выделялась культура лептоспир.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что наиболее вирулентным был *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов.

Следующим этапом работы было получение пяти серий экспериментальной вакцины, которые производили в соответствии с производственным регламентом на вакцину лептоспирозную концентрированную инактивированную жидкую, на базе лаборатории по научной разработке, внедрению и выпуску микробиологических и вирусологических препаратов ФБУН РостовНИИМП Роспотребнадзора.

Для стандартизации смеси лептоспир, входящих в состав экспериментальной вакцины, был проведен подсчет микробных клеток (табл. 1). Количество клеток лептоспир в дозе 0,5 мл в экспериментальной вакцине составляла $(20,9 \pm 2,5) \times 10^6$, что соответствует требованиям, предъявляемым к применяемой для профилактики заболевания вакцине лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, то есть не менее $(20 \pm 2) \times 10^6$ микробных клеток.

Далее были проведены исследования серий экспериментальной вакцины по показателю «Специфическая активность», а именно проведена сравнительная оценка образования специфических антител к лептоспирам, входящим в состав экспериментальной вакцины, и лептоспирам, входящим в состав вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, применяемой для профилактики заболевания (табл. 2).

Образование специфических антител у лабораторных животных после иммунизации экспериментальной вакциной (табл. 2) не изменяется при введении в ее состав *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов, также отсутствует отрицательная конкуренция, приводящая к изменению антигенных свойств выпускаемой вакцины.

Проведены исследования оценки защитных свойств экспериментальной вакцины (по показателю «Специфическая активность»), в результате были получены следующие данные:

- золотистые хомячки, входящие в группу животных, иммунизированных экспериментальной вакциной, после заражения культурой *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов на седьмые сутки клинических признаков заболевания не проявляли;

⁹ Там же.

¹⁰ Общая фармакопейная статья 1.1.0004.15 Отбор проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹¹ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0004.15 Аномальная токсичность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 1. Результаты подсчета клеток лептоспир пяти серий экспериментальной вакцины
Table 1. Enumeration of leptospiral cells in five batches of the experimental vaccine

Номер серии экспериментальной вакцины Experimental vaccine batch number	Среднее арифметическое число (M) клеток лептоспир в поле зрения Arithmetic mean (M) of leptospiral cells per field of view	Среднее арифметическое число (M) клеток лептоспир Arithmetic mean (M) of leptospiral cells	Стандартное отклонение (SD) Standard deviation (SD)	Количество клеток лептоспир в экспериментальной вакцине (K) Number of leptospiral cells in the experimental vaccine (K)
1	212	234,4	28,4	$(20,9 \pm 2,5) \times 10^6$
2	284			
3	228			
4	224			
5	224			

Таблица 2. Сравнительная характеристика образования специфических антител к лептоспирам, входящим в состав экспериментальной вакцины и вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, применяемой для профилактики лептоспироза

Table 2. Formation of specific antibodies to leptospirae used as components in the experimental vaccine and in the leptospirosis liquid concentrated inactivated vaccine

Название препарата Product	Количество серий Number of batches	Среднее геометрическое значение титров антител к лептоспирам Geometric mean of antibody titers to leptospirae				
		<i>L. interrogans copenhageni</i> (Крыса 2/466) <i>L. interrogans copenhageni</i> (Krysa2/466)	<i>L. interrogans grippotyphosa</i> (Мишкет 30/469) <i>L. interrogans grippotyphosa</i> (Mishket 30/469)	<i>L. interrogans pomona mozdok</i> (48B/470)	<i>L. interrogans sejiro</i> (Mus musculus 751/471)	<i>L. interrogans canicola</i> штамм № 480 Удалов <i>L. interrogans canicola</i> (Udalov 480)
Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая, применяемая для профилактики заболевания Leptospirosis liquid concentrated inactivated vaccine used for disease prevention	5	1:151	1:200	1:229	1:174	—
Экспериментальная вакцина со штаммом <i>L. interrogans</i> серогруппы <i>Canicola</i> (№ 480 Удалов) Experimental vaccine including <i>L. interrogans</i> serovar <i>Canicola</i> (Udalov 480)	5	1:131	1:174	1:263	1:151	1:151

Примечание. «—» означает, что в составе вакцины лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой, применяемой для профилактики заболевания, отсутствует *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов.

Note. — *L. interrogans* serovar *Canicola* (Udalov 480) is not used as a component in the currently produced liquid concentrated inactivated human vaccine.

- золотистые хомячки, входящие в группу животных, не иммунизированных экспериментальной вакциной (контрольную), пали на пятые сутки.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что *L. interrogans canicola* штамм № 480 Удалов в составе экспериментальной вакцины вызывает образование антител в защитных титрах не менее 1:100, что соответствует требованиям, предъявляемым к вакцине лептоспирозной концентрированной инактивированной жидкой¹².

В результате проверки серий экспериментальных вакцин, полученных с использованием *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов, по показателю «Специфическая безопасность» было установлено, что препарат не содержит живых лептоспир.

В ходе исследования серий экспериментальных вакцин, полученных с использованием *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов, по показателю «Аномальная

токсичность» было выявлено, что у лабораторных животных (белые мыши и морские свинки) в течение 7 сут не наблюдалось изменений в области введения вакцин, падения массы тела, гибели животных, что свидетельствует о его нетоксичности и безопасности.

Заключение

Испытания полученной экспериментальной вакцины показали, что включение в ее состав *L. interrogans* серогруппы *Canicola* штамм № 480 Удалов не приводит к изменению свойств вакцины; вакцина соответствует требованиям, изложенным в ФС 3.3.1.0014.15 Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая по показателям «Аномальная токсичность», «Специфическая безопасность» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания.

Введенный в состав вакцины штамм *L. interrogans* серогруппы *Canicola* вызвал образование антител в защитных

¹² Вакцина лептоспирозная концентрированная инактивированная жидкая, суспензия для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

титрах не менее 1:100, что свидетельствует о достаточной антигенности экспериментальной вакцины и подтверждает целесообразность его включения в выпускаемую отечественную лептоспирозную вакцину для повышения ее эпидемиологической эффективности.

Вакцина с обновленным составом штаммов микроорганизмов будет наиболее актуальна для регионов, в которых присутствуют природные и антропогенные резервуары *L. interrogans* серогруппы *Canicola*.

Вклад авторов. **А. А. Троценко** — разработка концепции эксперимента, микробиологические посевы, получение экспериментальных серий вакцины, постановка реакции микроагглютинации, определение специфической безопасности, редактирование текста; **М. В. Коврижко** — микробиологические посевы, получение экспериментальных серий вакцины, постановка реакции микроагглютинации, определение специфической безопасности, редактирование текста рукописи; **Э. А. Яговкин** — разработка концепции эксперимента, составление текста рукописи; **В. С. Ванжа** — определение аномальной токсичности, оценка вирулентных свойств штаммов микроорганизмов; **А. А. Решетов** — статистическая обработка результатов, подготовка табличного материала.

Authors' contributions. **Aleksandr A. Trotsenko**—elaboration of the experiment, carrying out microbiological culturing, production of the experimental vaccine batches, performing the microagglutination test, assessment of specific safety, editing of the text; **Marina V. Kovrizhko**—carrying out microbiological culturing, production of the experimental vaccine batches, performing the microagglutination test, assessment of specific safety, editing of the text; **Eduard A. Yagovkin**—elaboration of the experiment, drafting of the paper; **Vladislav S. Vanzha**—assessment of abnormal toxicity, evaluation of the virulent properties of the strains; **Aleksandr A. Reshetov**—statistical processing of the results, preparation of the tables.

Благодарности. Исследования проводились без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without financial support.

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

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in the article.

Литература/References

1. Вачаев БФ, Яговкин ЭА, Ананьина ЮВ, Юрьева ИЛ, Саяпина ЛВ, Кондратенко ВФ. Перспективы применения и совершенствования лептоспирозной вакцины для людей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*.

2012;(4):68–72. [Vachayev BF, Yagovkin EA, Ananyina YuV, Yuryeva IL, Sayapina LV, Kondratenko VF. Prospects of application and improvement of leptospiral vaccine for people. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2012;(4):68–72 (In Russ.)]

2. Verma R, Khanna P, Chawla S. Whole-cell inactivated Leptospirosis vaccine: future prospects. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(4):763–5. <https://doi.org/10.4161/hv.23059>
3. Xu Y, Ye Q. Human leptospirosis vaccines in China. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(4):984–93. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1405884>
4. Felix CR, Siedler BS, Barbosa LN, Timm GR, McFadden J, McBride AJA. An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives. *Expert Opin Drug Discov*. 2020;15(2):179–88. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1694508>
5. Levett PN. Systematics of *Leptospiraceae*. In: Adler B, eds. *Leptospira and Leptospirosis*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 387. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015. P. 11–20.
6. Ананьина ЮВ. Лептоспирозы людей и животных. Тенденции распространения и проблемы профилактики. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010;(2):13–6. [Ananyina YuV. Human and animal leptospiroses: prevalence trends and preventive measures. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*. 2010;(2):13–6 (In Russ.)]
7. Стоянова НА, Бадра Б, Токаревич НК. Эпизоотическая ситуация по лептоспирозу и ее эпидемиологическое проявление в условиях Санкт-Петербурга. В кн.: *Диагностика, профилактика и лечение лептоспироза людей и животных*. М.; 2007. С. 63–4. [Stoyanova NA, Badra B, Tokarevich NK. Epizootic situation in leptospirosis and its epidemic manifestation in the conditions of St. Petersburg. In: *Diagnostika, profilaktika i lechenie leptospiroza lyudei i zhivotnykh*. Moscow; 2007. P. 63–4 (In Russ.)]
8. Соболева ГЛ, Ананьина ЮВ, Непоклонова ИВ. Актуальные вопросы лептоспироза людей и животных. *Российский ветеринарный журнал*. 2017;8:14–8. [Soboleva GL, Ananyina YuV, Nepoklonova IV. Actual problems of human and animal leptospirosis. *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal = Russian Veterinary Journal*. 2017;8:14–8 (In Russ.)]
9. Lelu M, Muñoz-Zanzi C, Higgins B, Galloway R. Seroepidemiology of leptospirosis in dogs from rural and slum communities of Los Rios Region, Chile. *BMC Vet Res*. 2015;11(31). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0341-9>
10. Власова НП, Фоменко АС. К определению количества лептоспир в жидких питательных средах. В кн.: *Актуальные проблемы лептоспироза*. М.; 1979. С. 3. [Vlasova NP, Fomenko AS. Determination of the amount of leptospira in liquid nutrient media. In: *Topical problems of leptospirosis*. Moscow; 1979. P. 3 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Троценко Александр Александрович. Aleksandr A. Trotsenko. SPIN-код РИНЦ: 3902-9200

Коврижко Марина Владимировна. Marina V. Kovrizhko. SPIN-код РИНЦ: 9954-5142

Яговкин Эдуард Александрович. д-р мед. наук. Eduard A. Yagovkin, Dr. Sci. (Med.). SPIN-код РИНЦ: 8743-4099

Ванжа Владислав Сергеевич. Vladislav S. Vanzha. SPIN-код РИНЦ: 5732-2813

Решетов Александр Анатольевич. Aleksandr A. Reshetov. SPIN-код РИНЦ: 9511-4405

Статья поступила 14.12.2020

После доработки 11.02.2021

Принята к печати 26.02.2021

Received 14 December 2020

Revised 11 February 2021

Accepted 26 February 2021



Подписку на журнал
«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»
можно оформить в любом отделении АО «Почта России»

Подписной индекс издания:

- с любого номера в региональных агентствах подписки
«Урал-Пресс» (www.ural-press.ru) — 57941
- по объединенному каталогу
«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) — T57941



ISSN 2221-996X



9 772221 996004