

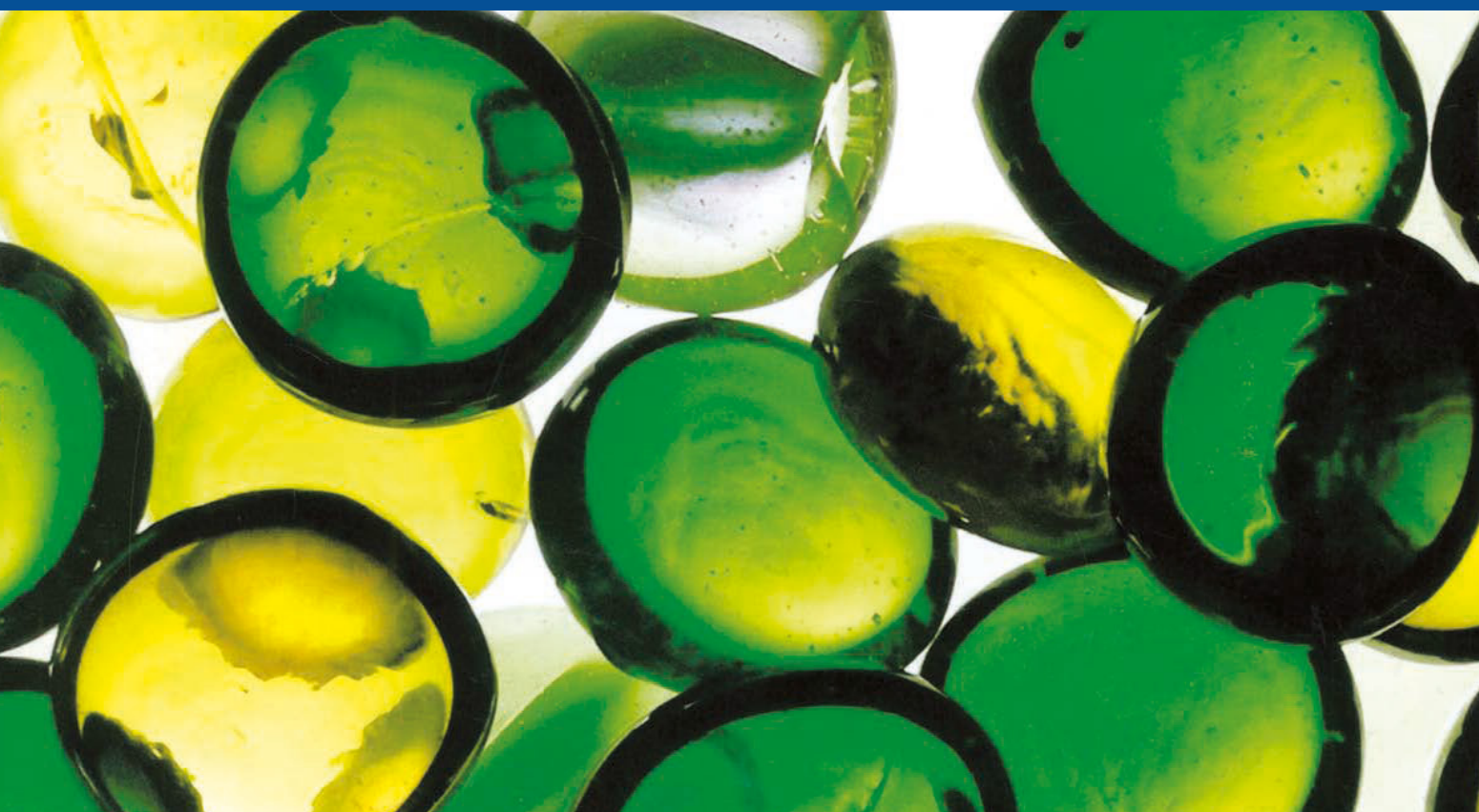
БИО ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

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

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

Том 21, № 2
Апрель — июнь 2021



BIOp Preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment

В НОМЕРЕ

Методы *in vitro* для выявления вируса бешенства и оценка их использования
в производстве антирабического иммуноглобулина

Модификация и валидация методики оценки невидимых механических включений
на основе метода Култера в растворах для парентерального введения

Включен в наукометрическую базу данных Science Index
on-line версия журнала www.biopreparations.ru

Архив журнала размещен в российских и международных реферативных и индексных базах данных: Chemical Abstracts (CAS), Russian Science Citation Index (RSCI) на платформе Web of Science, 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, № 2
Апрель — июнь 2021

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

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

Volume 21, No. 2
April — June 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: **Физико-химическая биология** (Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), Молекулярная генетика, Биоинженерия); **Клиническая медицина** (Педиатрия, Инфекционные болезни, Фтизиатрия); **Медико-биологические науки** (Фармакология, клиническая фармакология, Химиотерапия и антибиотики, Клиническая иммунология, аллергология, Клиническая лабораторная диагностика).



Л. А. Тарасевич

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

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: **Physicochemical biology** (Biotechnology (including bionanotechnology), Molecular genetics, Bioengineering); **Clinical Medicine** (Pediatrics, Infectious diseases, Phthisiology); **Medical and Life Sciences** (Pharmacology, clinical pharmacology, Chemotherapy and antibiotics, Clinical immunology, allergology, Clinical pathology).

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

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

БИОПРЕПАРАТЫ

Том 21, № 2
Апрель — июнь 2021

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Методы *in vitro* для выявления вируса бешенства и оценка их использования в производстве антирабического иммуноглобулина

Ю. К. Гаврилова, С. В. Генералов, Е. Г. Абрамова, А. К. Никифоров 76

Брюшнотифозные вакцины. История создания и современные вакцинные препараты

М. В. Абрамцева, Е. О. Неманова, Н. С. Алехина, Т. И. Немировская 85

Лекарственные препараты фактора VIII, актуальные вопросы разработки, клинического исследования и применения (часть 2)

Ж. И. Авдеева, А. А. Солдатов, В. П. Бондарев, В. Д. Мосягин, В. А. Меркулов 97

Оригинальные статьи

Модификация и валидация методики оценки невидимых механических включений на основе метода Култера в растворах для парентерального введения

А. А. Воропаев, О. В. Фадейкина, Д. С. Давыдов, А. А. Мовсесянц 108

Действие препарата Кагоцел® на экспрессию генов Toll-подобных рецепторов системы врожденного иммунитета в ТНР-1 моноцитах человека с разным уровнем дифференцировки

Т. М. Соколова, В. В. Полосков 116

Методические материалы

Методические аспекты разработки нормативной документации на биомедицинский клеточный продукт

Е. В. Мельникова, О. А. Рачинская, О. В. Меркулова, И. С. Семенова,
Е. О. Кожевникова, В. А. Меркулов 122

Хроника

Государственная премия Российской Федерации в области науки и технологий 2020 года 136

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

Типография ООО «БЕАН»: 603003, Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1, корп. 5

Подписано в печать: 24.06.2021

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

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

CONTENTS

Reviews

***In vitro* methods for rabies virus detection, and evaluation of their use in the production of rabies immunoglobulin**

Yu. K. Gavrilova, S. V. Generalov, E. G. Abramova, A. K. Nikiforov 76

Typhoid vaccines. Historical aspects of typhoid vaccine development, and currently available products

M. V. Abramtseva, E. O. Nemanova, N. S. Alekhina, T. I. Nemirovskaya 85

Factor VIII products: key aspects of development, clinical research and use (part 2)

Zh. I. Avdeeva, A. A. Soldatov, V. P. Bondarev, V. D. Mosyagin, V. A. Merkulov 97

Original Articles

Modification and validation of the test procedure for determination of sub-visible particulate matter in parenteral solutions, using the Coulter method

A. A. Voropaev, O. V. Fadeikina, D. S. Davydov, A. A. Movsesyants 108

The effect of Kagocel® on gene expression of Toll-like receptors of innate immunity in THP-1 human monocytes with different levels of differentiation

T. M. Sokolova, V. V. Poloskov 116

Methodical Approaches

Methodological aspects of the development of product files for biomedical cell products

E. V. Melnikova, O. A. Rachinskaya, O. V. Merkulova, I. S. Semenova, E. O. Kozhevnikova, V. A. Merkulov . . . 122

Chronicle

2020 Russian Federation National Award for outstanding achievements in science and technology . . . 136

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 "BEAN": 1/5 Barricad St., Nizhny Novgorod 603003

Passed for printing: 24 June 2021

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

Методы *in vitro* для выявления вируса бешенства и оценка их использования в производстве антирабического иммуноглобулина

Ю. К. Гаврилова^{1,*}, С. В. Генералов¹, Е. Г. Абрамова^{1,2}, А. К. Никифоров^{1,2}

¹ Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
ул. Университетская, д. 46, Саратов, 410005, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова»,
Театральная пл., 1, Саратов, 410012, Российская Федерация

Применение современных высокочувствительных методов исследования биологического материала с целью выявления вируса бешенства и антирабических антител актуально не только для диагностики данного заболевания и области экспериментальных исследований, но и для производства антирабических лекарственных препаратов, применяемых для постэкспозиционной профилактики бешенства. Цель работы — анализ существующих в настоящее время методов детекции вируса бешенства и антирабических антител с последующей оценкой возможности применения указанных методов на контрольных этапах производства препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Поиск современных высокочувствительных методов контроля *in vitro*, способных конкурировать с биологическим методом — основным методом контроля свойств препарата антирабического иммуноглобулина, является важным аспектом совершенствования технологии производства и повышения качества препарата для профилактики бешенства. В ходе аналитического исследования было выявлено, что в условиях производства антирабического иммуноглобулина в качестве самостоятельных методов, а также в виде альтернативы применяемому в производстве биологическому методу на белых мышах возможно применение метода флуоресцирующих антител, иммуноферментного анализа, методов с применением клеточных культур, атомно-силовой микроскопии, проточной цитометрии. Выбор в пользу указанных методов исследования был обусловлен высокой степенью их чувствительности, специфичностью, скоростью постановки, экономичностью, простотой исполнения и автоматизированным процессом учета результатов.

Ключевые слова: вирус бешенства; методы *in vitro*; ИФА; FAVN-тест; RFFIT; клеточная культура; антирабический иммуноглобулин

Для цитирования: Гаврилова ЮК, Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Никифоров АК. Методы *in vitro* для выявления вируса бешенства и оценка их использования в производстве антирабического иммуноглобулина. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(2):76–84. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-76-84

* Контактное лицо: Гаврилова Юлия Кирилловна; ylia-93@list.ru

In vitro methods for rabies virus detection, and evaluation of their use in the production of rabies immunoglobulin

Yu. K. Gavrilova^{1,*}, S. V. Generalov¹, E. G. Abramova^{1,2}, A. K. Nikiforov^{1,2}

¹ Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”
of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing,
46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russian Federation

² Saratov State Vavilov Agrarian University,
1 Teatralnaya Sq., Saratov 410012, Russian Federation

Current highly sensitive methods for rabies virus and rabies antibodies detection in biological material can be used not only for diagnosis and experimental research, but also for the production of antirabies medicines used for postexposure prophylaxis. The aim of the study was to analyse existing methods for rabies virus and rabies antibodies detection and to assess the potential for using these methods at the control stages during production of heterologous antirabies immunoglobulin obtained from equine serum. The search for cutting-edge highly sensitive *in vitro* control methods that could compete with the biological method, which is the main method used in antirabies immunoglobulin control, is an important prerequisite for improvement of the production technology and the quality of antirabies medicines. The study demonstrated that the following test methods can be used in the production of antirabies immunoglobulin: fluorescent antibody technique, enzyme-linked immunosorbent assay, cell culture methods, atomic force microscopy, and flow cytometry. These methods could be used alone or as an alternative to the biological method in white mice. These methods were chosen because of their high sensitivity, specificity, rapid and easy implementation, cost-effectiveness, and automatic recording of test results.

Key words: rabies virus; *in vitro* methods; ELISA; FAVN test; RFFIT; cell culture; antirabies immunoglobulin

For citation: Gavrilova YuK, Generalov SV, Abramova EG, Nikiforov AK. *In vitro* methods for rabies virus detection, and evaluation of their use in the production of rabies immunoglobulin. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(2):76–84. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-76-84

* Corresponding author: Yuliya K. Gavrilova; ylia-93@list.ru

Препарат антирабического иммуноглобулина (АИГ) предназначен для экстренной специфической профилактики бешенства у людей, входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. Согласно единой во всем мире схеме профилактики бешенства у людей введение данного препарата назначают перед началом антирабической вакцинации в случае получения укусов или множественных повреждений вследствие контакта с потенциально инфицированным бешенством животным¹. Единственным производителем препарата АИГ на территории России является ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. С 2004 г. на базе данного учреждения налажен серийный выпуск препарата гетерологичного АИГ из сыворотки крови лошади [1]. На сегодняшний день общий объем выпускаемого ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора лекарственного средства АИГ составляет около 400 л в год, что удовлетворяет ежегодную потребность населения Российской Федерации в данном препарате на 80% [2].

Процесс производства препарата состоит из ряда этапов, часть которых связана с работой с фиксированным вирусом бешенства (ВБ). Качество их выполнения контролируют биологическими методами с применением лабораторных белых мышей². Контролируемыми параметрами при этом являются активность и специфичность используемого штамма ВБ, полнота инактивации антигенного материала, специфическая активность иммунных лошадиных сывороток и готового препарата АИГ.

Для выявления ВБ биологическая проба на белых мышах впервые была применена в 1935 г. Л. Т. Webster и J. R. Dawson³. Выбор исследователей в пользу методов *in vivo* основан на высокой степени их чувствительности, достоверности и надежности. Однако их выполнение требует использования большого количества животных, длительного времени получения результатов [3, 4]. Более того, эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) призывают к отказу от исследований с применением животных⁴. Указанные обстоятельства ставят перед исследователями задачу поиска альтернативного решения среди современных методов *in vitro*.

В России методы *in vitro* к настоящему времени нашли применение при диагностическом исследовании материала на содержание ВБ. Согласно ГОСТ 26075–2013⁵ для диагностики материала применяют метод размножения вируса на чувствительной культуре клеток с последующим окрашиванием флуоресцирующими антителами, иммуноферментный анализ, реакцию диффузной преципитации, полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Применение методов выявления ВБ и антирабических антител *in vitro* на различных этапах производства АИГ в настоящее время остается перспективной задачей для исследования.

Цель работы — анализ существующих в настоящее время методов детекции ВБ и антирабических антител с последующей оценкой возможности применения указанных методов на контрольных этапах производства препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади.

Методы исследования, основанные на выявлении антигенов вируса бешенства и антирабических антител

Гистологическое исследование

Гистологическое исследование материала на содержание ВБ включает окрашивание мазков-отпечатков мозговой ткани с последующим выявлением методом световой микроскопии характерных специфических включений — телец Бабеша–Негри. Включения представляют собой структуры, состоящие из фосфопротеинов и нуклеопротеинов, и принимают активное участие в процессе транскрипции вирусного генома и репликации вирусных частиц [5]. Открытие специфических включений А. Negri в 1903 г.⁶ и последующее подтверждение их важной роли в диагностике бешенства L. Negri-Luzzani в 1913 г.⁷ послужили началом долгого пути формирования комплекса диагностических методов лабораторного обнаружения вируса бешенства. Наличие в опытных образцах четко очерченных овальных или продолговатых гранулированных включений характерного розово-красного цвета считают абсолютным диагностическим признаком заболевания, вызываемого ВБ. В то же время большинство штаммов фиксированного ВБ не образуют телец Бабеша–Негри, данное обстоятельство ограничивает применение гистологических исследований в производстве АИГ.

Иммуногистохимический экспресс-тест

Иммуногистохимический экспресс-тест, разработанный центром по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) и применяемый при гистологических исследованиях, обладает большей чувствительностью по сравнению с методом обнаружения телец Бабеша–Негри [6]. Метод основан на обнаружении нуклеопротеина ВБ в материале с помощью конъюгата биотинилированных моноклональных антител к нуклеопротеину ВБ, комплекса стрептавидин-пероксидазы и хромогенного субстрата. Результаты анализа, проведенного при помощи данного теста, учитывают с помощью световой микроскопии. Данная модификация имеет те же преимущества, что и традиционный гистохимический анализ: быстрое получение результата (в течение 1 ч), экономичность, отсутствие необходимости в приобретении сложного дорогостоящего оборудования. К дополнительным возможностям модифицированного иммуногистохимического теста следует отнести высокую чувствительность и специфичность, которые неоднократно показаны в сравнении с методами, основанными на применении флуоресцирующих антител [7], а также возможность исследования образцов, длительно хранившихся в глицерине или в замороженном состоянии. Существенным недостатком теста является ограниченность выпуска наборов реагентов, используемых для его постановки и одобренных ВОЗ. В настоящее время заказ диагностических наборов возможен исключительно через сотрудничество с CDC [8]. Следует отметить, что гистологические исследования непосредственно не связаны с обнаружением цельных вирионов. Для визуализации последних единственным возможным методом является электронная микроскопия [9].

¹ Бешенство в Российской Федерации. Информационно-аналитический бюллетень. Омск; 2019.

² Фармакопейная статья 3.3.1.0038.15 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ Webster LT, Dawson JR. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. Exp Biol Med. 1935;32(4):570–3.

⁴ WHO Expert Committee on biological standardization. WHO Technical Report Series No. 1024 (17th report); 2020.

⁵ ГОСТ 26075–2013. Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства.

⁶ Negri A. Contributo allo studio dell'eziologia della rabbia. Boll Soc Med-Chir Pavia. 1903;2:88–115.

⁷ Negri-Luzzani L. Le diagnostic de la rage par la demonstration du parasite specifique. Resultats de dix ans d'expériences. Ann Inst Pasteur. 1913;27:1039–64.

Электронная микроскопия

Метод электронной микроскопии позволяет получать данные относительно размеров, формы вирусов, их расположения в клетке, а также внутриклеточных изменений, возникающих в результате инфицирования вирусом. Электронная микроскопия позволяет работать с неидентифицированным материалом, а имеющиеся комплексные подходы по очистке и концентрированию вирусосодержащих суспензий [10] открывают возможность применения метода не только для фундаментальных исследований, но и для производственных задач [11]. В качестве основных факторов, ограничивающих активное применение электронной микроскопии на контрольных этапах производства АИГ, следует указать высокую стоимость оборудования и необходимость в специализированном помещении для работы с электронным микроскопом.

Метод флуоресцирующих антител

Метод флуоресцирующих антител (МФА) применяют для обнаружения вируса в материале с помощью меченных флуоресцентными красителями антител к цельному вирусу или его белкам. Образующиеся в результате взаимодействия вирусного антигена с антирабическими антителами специфически флуоресцирующие комплексы детектируют при помощи люминесцентной микроскопии. В России при исследовании материала на содержание ВБ методом флуоресцирующих антител применяют специфические поликлональные флуоресцирующие антирабические антитела производства ФГБНУ «ЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань), ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) и ФГБНУ ВНИИБП (г. Щелково). К наиболее распространенным красителям, применяемым для флуоресцентного мечения антител, принадлежит флуоресцеинизотиоцианат. Он довольно легко конъюгируется с антителами, что делает его особенно привлекательным для исследователей, сталкивающихся с необходимостью самостоятельного получения диагностических конъюгатов. В литературе имеются данные о возможности повышения показателя специфичности при исследовании материала МФА с использованием флуоресцирующих моноклональных антител к нуклеопротеину ВБ [12]. Исследование МФА в среднем занимает не более 6 ч, метод обладает высокой степенью чувствительности, порог которой составляет около 3,8 Ig ЛД₅₀/мл, и специфичности. В производстве АИГ МФА может быть применен для подтверждения бешенства у лабораторных животных на этапах приготовления рабического антигена, а также при контроле специфической активности АИГ.

Другим аспектом применения флуоресцирующих антител является анализ клеточных культур, инфицированных ВБ. Данный метод позволяет осуществлять контроль репродукции ВБ в клеточных культурах, например, при разработке и производстве культуральных вакцин [13], а также в исследованиях по получению культурального антигена, предназначенного для гипериммунизации продуцентов антирабической сыворотки.

В экспериментальных исследованиях выявление ВБ осуществляют на клеточных линиях ВНК (клетки почки сирийского хомячка), А-72 (клетки фибросаркомы собаки), ПС (клетки почки сайги), Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки), MDBK (клетки почки быка) и др. В диагностических исследованиях применение клеточных линий мышинной нейробластомы (CCL-131) и невриномы Гассерова узла крысы

(НГУК-1) являются альтернативной заменой постановке биопробы на белых мышах [14]. В производстве антирабических препаратов клеточные культуры используют для накопления ВБ, оценки полноты инактивации вируса, контроля иммуногенности антирабических вакцин и специфической активности АИГ⁸. Применение клеточных культур на этапах производства антирабических препаратов открывает перспективы сокращения числа лабораторных животных, задействованных в контрольных методах исследования. Проведение исследований на клеточных культурах является актуальным и для производства гетерологичного АИГ при контроле специфической активности антирабических сывороток и готового препарата иммуноглобулина.

Исследование вируснейтрализующей активности: RFFIT и FAVN-тесты

Культуры восприимчивых к ВБ клеток также нашли применение при определении вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и антител. К наиболее распространенным методам следует отнести RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test) и FAVN-тест (fluorescent antibody virus neutralization test), суть которых заключается в осуществлении реакции нейтрализации (РН) ВБ на чувствительной клеточной культуре [15, 16]. Одним из главных отличий FAVN-теста от RFFIT является применение 96-луночных культуральных микропланшетов вместо 8-луночных слайд-камер, что позволяет увеличить количество исследуемых образцов при условии сохранения времени постановки теста. На основании результатов проведенных исследований установлено, что методы с применением клеточных культур обладают высокой степенью корреляции с методом нейтрализации ВБ на белых мышах [17]. При исследовании уровня вируснейтрализующих антител методами FAVN и RFFIT рекомендовано использование клеточной линии ВНК-21 и штамма вируса бешенства CVS-11. Существуют модификации этих методов, отличающиеся используемыми клеточной культурой и штаммом вируса [14, 18, 19]. С позиции повышения мер биобезопасности актуальными представляются модификации указанных методов, предполагающие использование непатогенных штаммов ВБ или близкородственных вирусов, например вируса везикулярного стоматита [20]. Другим аспектом совершенствования методов FAVN и RFFIT является применение генно-модифицированных штаммов ВБ, продуцирующих флуоресцирующий белок [21]. Такой подход позволяет исключить этап окрашивания клеточной культуры и сократить время исследования при условии сохранения надежности анализа *in vitro*.

Методы FAVN и RFFIT успешно применяют за рубежом для контроля антирабических препаратов⁹. В России эти методы используют для оценки уровня содержания антител у вакцинированных животных в аккредитованных ветеринарных лабораториях. Разработка и внедрение подобных методов в производство антирабических препаратов в настоящее время являются актуальными вопросами, требующими дополнительного изучения [22]. В ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора разработана модификация FAVN-теста с использованием штамма Москва 3253_{Vero} ВБ и клеточной линии Vero с целью дальнейшего применения в производстве гетерологичного АИГ при определении показателя специфической активности иммунных сывороток и готового препарата иммуноглобулина [23].

⁸ Annex 2. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. WHO; 2005.

⁹ 01/2015:0723 Human rabies immunoglobulin. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2020.

Rabies immune globulin. USP41–NF36; 2019.

Brazilian Pharmacopoeia 6th ed.; 2019.

Метод проточной цитометрии

Результат исследования инфицированных ВБ клеточных культур с использованием флуоресцентной микроскопии в значительной степени зависит от человеческого фактора, в особенности при анализе большого числа проб. Проведение исследований методами с автоматическим учетом флуоресценции в значительной степени увеличивает точность анализа. Одним из таких методов является проточная цитометрия. Благодаря возможности анализа интенсивности флуоресценции каждой отдельной клетки в популяции инфицированной клеточной культуры, указанный метод нашел применение для обнаружения различных вирусов [24], в том числе ВБ и его белков [25, 26]. Разработаны подходы определения данным методом уровня защитных антител в сыворотках крови животных [27]. В собственных исследованиях также была показана эффективность применения проточной цитометрии для оценки специфической активности АИГ [28].

Метод образования бляшек

Анализ субстанций, содержащих ВБ, на клеточных культурах возможен и без использования флуоресцентных тест-систем. К таким методам следует отнести метод образования бляшек, основанный на образовании погибших под влиянием вируса клеток в монослойных культурах, залитых агаром. При больших разведениях вируса, включающих множественное инфицирование клеток или слияние групп зараженных клеток, каждая бляшка соответствует вирусной частице, содержащейся в исходной жидкости. Данный способ позволяет оценить количество вируса в бляшкообразующих единицах (БОЕ)¹⁰. Указанный метод не нашел широкого практического применения в силу своих недостатков — длительности и трудоемкости, в особенности при анализе материала с высоким содержанием вируса¹¹. Применение метода бляшек также ограничено способностью штамма ВБ оказывать цитопатическое действие на клеточную культуру, проявляющееся в деструктивных изменениях отдельных клеток или всего клеточного монослоя, наблюдаемых с применением световой микроскопии.

Метод определения цитопатического действия

Активность ВБ, а также антирабических сывороток определяют и по цитопатическому действию. Учет результата при этом составляет от 5 до 7 сут. Следует отметить, что чувствительность метода определения активности вируса по его цитопатическому действию обычно ниже, чем у других методов, в том числе метода образования бляшек [29]. Более того, к концу срока наблюдения происходит отмирание клеток, в том числе неинфицированных, что затрудняет учет результатов.

Метод атомно-силовой микроскопии

Повысить чувствительность обнаружения деструктивного воздействия вируса на клеточную культуру возможно за счет использования метода атомно-силовой микроскопии, который позволяет исследовать наноразмерную структуру различных поверхностей, в том числе биологических объектов. В экспериментах с применением атомно-силовой микроскопии было показано увеличение шероховатости поверхности клеток перевиваемых линий Vero в результате воздействия на них ВБ [30]. В этой связи применение атомно-силовой микроскопии перспективно и для контроля полноты инактивации вирусосодержащих субстанций, а также при определении активности антирабических сывороток и иммуноглобулина [31].

Необходимо отметить, что представленные выше методические подходы к определению активности ВБ и уровню содержания антирабических антител предполагают использование живого вируса. Исключение возможности работы с патогенным биологическим агентом, например при определении антигенной активности инактивированной субстанции, создает предпосылки разработки и внедрения соответствующих методов *in vitro*.

Реакция диффузионной преципитации

Классическим методом для прямого обнаружения антигенов ВБ является реакция диффузионной преципитации (РДП) [32]. Этот методический прием основан на образовании линии преципитации в агаровом слое вследствие взаимодействия вирусного антигена со специфическим антителом. В России для проведения диагностических исследований материала на ВБ в РДП применяют Набор компонентов для диагностики бешенства животных в реакции диффузионной преципитации производства ФГБНУ ВНИТИБП (г. Щелково). Детекция ВБ при постановке РДП возможна при условии присутствия в образце вируса в концентрации не менее 4,5 Ig ЛД₅₀/мл, что указывает на достаточно низкую чувствительность метода по сравнению с биологической пробой на белых мышах [33]. Указанное обстоятельство затрудняет использование РДП при контроле этапов производства препарата АИГ, несмотря на экономичность, скорость и простоту исполнения.

Иммуноэлектрофорез

Более совершенным методом анализа по сравнению с РДП является иммуноэлектрофорез, использование которого показано при исследовании активности антирабических сывороток. Согласно экспериментальным данным, при сравнении результатов данного теста и реакции нейтрализации на мышах коэффициент корреляции составил 79,7% [34]. Успешное применение иммуноэлектрофореза было показано при оценке содержания гликопротеина ВБ в вакцинах [35]. Данные обстоятельства указывают на возможность применения иммуноэлектрофореза для оценки эффективности гипериммунизации продуцентов антирабических сывороток, а также качества антигенного материала, вводимого продуцентам.

Серологические методы

Применение в производстве гетерологичного АИГ таких классических серологических методов, как реакция гемагглютинации (РГА), реакция связывания комплемента (РСК), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), имеет ограничения вследствие ряда факторов.

Несмотря на такие преимущества РГА и РНГА, как возможность получения результатов в короткие сроки и простоту выполнения, методы характеризуются более низкой степенью чувствительности по сравнению с твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА) [36]. К недостаткам РНГА следует отнести и использование нестабильных биологических компонентов для разработки диагностикума. Более удобным является использование латексных частиц вместо эритроцитов. Реакция агглютинации латексных частиц зарекомендовала себя как экспрессный и высокоспецифичный метод, позволяющий проводить анализ вне лаборатории [37]. При исследовании специфических антител в сыворотках крови лошадей-продуцентов показана высокая корреляция результатов метода с RFFIT [38]. Значительное влияние на результат реакции оказывают размер латексных частиц, условия адсорбции, время реакции, условия агглютинации (рН, ионная сила, температура).

¹⁰ Жданов ВМ, Гайдамович СЯ. Общая и частная вирусология. М.: Медицина; 1982.

¹¹ Троценко НИ, Белоусова РВ, Преображенская ЗА. Практикум по ветеринарной вирусологии. М.: Колос; 2000.

Реакция связывания комплемента в качестве метода исследования антирабических антител не может дать объективную оценку реального титра вируснейтрализующих антител, поскольку при анализе возможно обнаружение антител, образующихся в ответ на введение экспериментальному животному нуклеокапсида ВБ и не обладающих вируснейтрализующей активностью [39].

Иммуноферментный анализ

Для исследования антигенной активности ВБ и его компонентов, а также для оценки уровня специфических антител в антирабических сыворотках активно используют различные варианты ИФА, среди которых наиболее распространен твердофазный сэндвич-ИФА. В настоящее время модификации наборов для ИФА отличаются диагностическими компонентами, среди которых в зависимости от задач могут присутствовать как цельный вирус, так и его отдельные антигены, как правило, гликопротеин либо нуклеопротеин. Антитела, входящие в набор, могут отличаться специфичностью к антигенам вируса [40]. Разработаны наборы для ИФА с использованием антиидиотипических антител, позволяющие осуществлять исследования без вирусных антигенов [41]. Для детекции антирабических антител наиболее часто применяют непрямой ИФА.

В России при постановке ИФА для обнаружения ВБ в патогенном материале применяют конъюгат антирабических антител с пероксидазой (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань). ИФА можно охарактеризовать как метод со средней степенью чувствительности: положительную реакцию отмечают при наличии в образце ВБ в концентрации свыше 3,3 ЛД₅₀/мл [32]. Результаты, получаемые при исследовании образцов методом ИФА, достаточно хорошо коррелируют с результатами МФА [40]. Преимуществом ИФА является возможность выявления в образце инаktivированного ВБ, а также его отдельных антигенов. Более того, метод позволяет проводить количественную оценку содержания антигена ВБ или антител к нему, присутствующих в исследуемом образце.

При анализе антирабических сывороток чувствительность и специфичность этого метода сопоставима с данными параметрами для РН на культуре клеток [42]. В работе M. Stantic-Pavlinic с соавт. [4] показано наличие корреляции между результатами, полученными методом непрямого ИФА и в FAVN-тесте, но при этом отмечена более низкая степень чувствительности ИФА в сравнении с тестом на культуре клеток.

Указанные обстоятельства позволяют применять ИФА для оценки качества антирабических препаратов, что подтверждено результатами исследований специфической активности вакцин и их компонентов [43, 44] и сывороточных препаратов [45]. Следует отметить, что при использовании моноклональных антител к антигенному сайту III гликопротеина ВБ с помощью ИФА стало возможно контролировать содержание иммуногенных компонентов вакцины и вируснейтрализующих антител в сывороточных препаратах [46, 47].

Дот-иммуноанализ — разновидность ИФА, позволяющая проводить быстрое исследование образцов без необходимости использования какого-либо оборудования. При данном анализе для адсорбции антигенов или антител в качестве носителя применяют нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ)¹². Нерастворимые продукты реакции при специфическом взаимодействии антигенов и антител проявляются на поверхности мембраны

в виде хорошо различимых ярких пятен, что позволяет осуществлять визуальный учет результата.

Для выявления продуктов реакции дот-анализа все чаще применяют наночастицы коллоидных металлов, в частности, золота или серебра [48, 49]. Активное использование диагностических конъюгатов на основе наночастиц коллоидных металлов связано с их высокой интенсивностью окрашивания, позволяющей производить учет результатов реакции без помощи какого-либо оборудования. Постановка дот-анализа проста в выполнении и характеризуется низкой стоимостью относительно других экспресс-тестов. Оценка применения данного теста в производстве гетерологичного АИГ дана в работе Н.А. Шараповой¹³. Разработанная на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора диагностическая тест-система на основе наночастиц коллоидного золота позволяет эффективно определять активность антирабических сывороток и иммуноглобулина, а результаты данного теста коррелируют с результатами теста *in vivo*.

Иммунохроматографический анализ

Применение коллоидных наночастиц имеет место и при разработке иммунохроматографических тест-систем. Для проведения иммунохроматографического анализа (ИХА) отсутствует необходимость в каком-либо лабораторном оборудовании: исследуемый материал, подготовленный согласно инструкции тестового набора, вносят в тестовое устройство в заданном объеме и ожидают получения результата. Максимальное время ожидания результата теста составляет 10 мин. Появление линии в тестовой зоне устройства после внесения образца свидетельствует об успешной постановке теста, а появление линии в зоне контроля — о присутствии в опытном образце ВБ [50] или антирабических антител, в зависимости от вида теста. Применение высокоспецифичных ИХА-тест-систем для выявления антирабических антител с чувствительностью 0,5 МЕ/мл обосновано при исследовании иммуногенности антирабических вакцин [51]. В исследованиях S. Shiota с соавт. [52] показано применение ИХА-теста для выявления антирабических вируснейтрализующих антител (RAPINA) при исследовании большого количества образцов сывороток крови человека. При этом данные исследований свидетельствовали о средней степени корреляции между результатами RAPINA и RFFIT-тестом. Простота исполнения, высокая чувствительность, возможность исключения манипуляций с живым вирусом и клеточной культурой позволяют рассматривать ИХА-тесты в качестве успешного дополнения к комплексу контрольных методов исследования, используемых в производстве антирабических препаратов.

Молекулярно-генетические методы исследования вируса бешенства

В настоящее время методы молекулярной генетики получили большое распространение для диагностики и типирования микроорганизмов, в том числе лиссавирусов. Методы молекулярной генетики являются высокочувствительными и позволяют быстро получать результат при работе практически с любым видом патологического материала [53]. Особенностью молекулярно-генетических методов при работе с ВБ является проведение этапа обратной транскрипции. Для диагностических исследований разработаны наборы для ОТ-ПЦР, позволяющие учитывать результат как с помощью

¹² Коллинз У, ред. Новые методы иммуноанализа. М.: Мир; 1991.

¹³ Шарапова НА. Конструирование диагностикума с использованием наночастиц золота для определения активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в дот-иммуноанализе: дис. ... канд. биол. наук. Саратов; 2013.

гель-электрофореза, так и с помощью флуоресцентных меток [54]. Метод ОТ-ПЦР эффективен при обнаружении низких концентраций ВБ в образце, перспективен в осуществлении прижизненной диагностики бешенства [55], а также при проведении штаммовой дифференциации ВБ [56]. Применение ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов позволяет определять выход продукта реакции после каждого цикла амплификации, а также рассчитывать относительную концентрацию субстрата на основании анализа стандартной кинетической кривой, построенной по полученным данным¹⁴. Указанные особенности явились основанием для применения ОТ-ПЦР-РВ в производстве антирабических препаратов, в частности, для количественной оценки содержания антигена в материале для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки¹⁵. Неоднократно отмечено использование ОТ-ПЦР-РВ в комплексе с методами иммунофлуоресценции для оценки полноты инактивации вируса при изготовлении вакцин [57–59].

Перспективным направлением применения молекулярно-генетических методов является оценка стабильности производственных штаммов ВБ, используемых при изготовлении антирабических препаратов [60]. Для проведения подобных исследований используют методы ПЦР и полногеномное секвенирование. Полногеномное секвенирование вакцинных штаммов ВБ активно проводят как в России [61, 62], так и за рубежом [63, 64]. Актуальность подобных исследований обусловлена повышенной изменчивостью ВБ при его репродукции. Сравнение генетических последовательностей позволяет оценить возможность реверсии штаммов ВБ, используемых при оральной вакцинации животных [65], а также контролировать стабильность иммуногенных эпитопов вакцинных штаммов ВБ [60], что имеет значение и для штаммов, используемых в производстве сывороточных антирабических препаратов.

Заключение

Обзор методов исследования и выявления ВБ и антирабических антител показал их широкое применение в сферах диагностики бешенства у людей и животных и производства препаратов для профилактики данного заболевания. Применительно к процессу производства препарата гетерологичного АИГ следует отметить значимость методов исследования с применением культуры клеток, МФА, ИФА, атомно-силовой микроскопии и проточной цитометрии. Такие свойства, как скорость постановки тестов, высокая степень чувствительности, специфичность, возможность одновременного исследования большого количества проб и автоматизация процесса учета результатов, составляют преимущества данных методов в сравнении с биологическим методом на белых мышах, являющимся в настоящее время основным методом контроля активности гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Как результат использования методов *in vitro* следует рассматривать потенциальное снижение уровня биологического риска при работе с вирусом бешенства. Применение указанных перспективных тестов *in vitro* позволит расширить перечень методов контроля качества препарата антирабического иммуноглобулина в соответствии с требованиями ведущих зарубежных фармакопей и рекомендациями ВОЗ по применению методов *in vitro*, а также обозначить возможные пути дальнейшего совершенствования технологии производства препарата с целью повышения качества конечного продукта.

Вклад авторов. Ю. К. Гаврилова — написание текста, оформление рукописи, сбор и систематизация данных научной литературы; С. В. Генералов — идея аналитического обзора, редактирование и переработка рукописи, доработка текста, формулировка выводов; Е. Г. Абрамова — редактирование и переработка рукописи, окончательное утверждение рукописи для публикации; А. К. Никифоров — окончательное утверждение рукописи для публикации.

Authors' contributions. Yuliya K. Gavrilova—writing of the text, formatting of the paper, scientific literature review and systematisation; Sergey V. Generalov—elaboration of the study idea, revision and editing of the paper, finalisation of the text, formulation of conclusions; Elena G. Abramova—revision and editing of the paper, final approval of the paper version to be published; Aleksey K. Nikiforov—final approval of the paper version to be published.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

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. Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Лобовикова ОА, Еремин СА, Васин ЮГ, Михеева ТА и др. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина — итоги первых пяти лет. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010;(3):58–62. [Abramova EG, Nikiforov AK, Lobovikova OA, Eremin SA, Vasin YuG, Mikheeva TA, et al. Heterologous anti-rabies immunoglobulin — results of the first five years of production. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2010;(3):58–62 (In Russ.)] [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-3\(105\)-58-62](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-3(105)-58-62)
2. Онищенко ГГ, Попова АЮ, Ежлова ЕБ, Демина ЮВ, Пакскина НД, Писцов МН и др. Эпидемиологическая обстановка и вопросы идентификации вируса бешенства среди людей на территории Российской Федерации в период 2002–2015 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(3):27–32. [Onishchenko GG, Popova AYU, Ezhlova EB, Demina YuV, Pakskina ND, Pistsov MN, et al. Epidemiological situation on and problems of identification of rabies virus in humans in the territory of the Russian Federation during the period of 2002–2015. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(3):27–32 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-27-32>
3. Kuzmin IV. Virus isolation in animals: the mouse inoculation test. In: Rupprecht Ch, Nagarajan Th, eds. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention*. Vol. 2. San Diego: Elsevier Academic Press; 2015. P. 13–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801919-1.00002-6>
4. Stantić-Pavlinić M, Hostnik P, Levičnik-Stezinar S, Zaletel-Kragelj L. Vaccination against rabies and protective antibodies — comparison of ELISA and fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) assays. *Vet Arhiv*. 2006;76(4):281–9.
5. Lahaye X, Vidy A, Pomier C, Obiang L, Harper F, Gaudin Y, Blondel D. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: evidence that NBs are sites of

¹⁴ Ребриков ДВ, Саматов ГА, Трофимов ДЮ, Семенов ПА, Савилова АМ, Кофиади ИА и др. ПЦР «в реальном времени». М.: БИОНОМ. Лаборатория знаний; 2009.

¹⁵ Матвеева ЖВ. Разработка и совершенствование биотехнологических приемов приготовления рабического антигена для производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина: дис. ... канд. биол. наук. Саратов; 2013.

- viral transcription and replication. *J Virol.* 2009;83(16):7948–58. <https://doi.org/10.1128/JVI.00554-09>
6. Niezgodna M, Rupprecht CE. *Standard Operating Procedure for the Direct Rapid Immunohistochemistry Test (DRIT) for the Detection of Rabies Virus Antigen*. National Laboratory Training Network Course. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2006.
7. Madhusudana SN, Subha S, Thankappan U, Ashwin YB. Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. *Viral Sin.* 2012;27(5):299–302. <https://doi.org/10.1007/s12250-012-3265-6>
8. Mani RS, Madhusudana SN. Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances. *Sci World J.* 2013;569712. <https://doi.org/10.1155/2013/569712>
9. Horwitz JA, Jenni S, Harrison SC, Whelan SPJ. Structure of a rabies virus polymerase complex from electron cryo-microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(4):2099–107. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918809117>
10. Зайцев БН, Таранов ОС, Рудометова НБ, Щербак-ова НС, Ильичев АА, Карпенко ЛИ. Оптимизированный метод подсчета количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2019;23(3):337–42. [Zaitsev BN, Taranov OS, Rudometova NB, Shcherbakova NS, Ilyichev AA, Karpenko LI. An optimized method for counting viral particles using electron microscopy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2019;23(3):337–42 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18699/VJ19.498>
11. Петрова ИД, Зайцев БН, Таранов ОС. Концентрирование вирусов и электронная микроскопия. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2020;24(3):276–83. [Petrova ID, Zaitsev BN, Taranov OS. Concentration of viruses and electron microscopy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2020;24(3):276–83 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18699/VJ20.620>
12. Грибенча СВ, Козлов АЮ, Костина ЛВ, Елаков АЛ, Лосич МА, Цибезов ВВ и др. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. *Вопросы вирусологии.* 2013;58(5):38–43. [Gribench SV, Kozlov AYU, Kostina LV, Elakov AL, Losich MA, Tsibezov VV, et al. Production of the monoclonal antibodies to the rabies virus nucleoprotein. *Voprosy virusologii = Problems of Virology.* 2013;58(5):38–43 (In Russ.)]
13. Rourou S, Ben Zakkour M, Kallel H. Adaptation of Vero cells to suspension growth for rabies virus production in different serum free media. *Vaccine.* 2019;37(47):6987–95. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.092>
14. Хисматуллина НА, Гулюкин АМ, Шуралев ЭА, Хаертынов КС, Чернов АН, Филимонова МН и др. Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток нейроны Гассерова узла крысы (НГУК-1). *Гены и клетки.* 2014;9(3):276–80. [Khismatullina NA, Gulyukin AM, Shuralev EA, Khaertynov KS, Chernov AN, Filimonova MN, et al. Rapid diagnostic test of rabies using rat Gasser's ganglion neurinoma cell culture (RGGN-1). *Geny i kletki = Genes and Cells.* 2014;9(3):276–80 (In Russ.)]
15. Cliquet F, Wasniewski M. The fluorescent antibody virus neutralization test. In: Rupprecht Ch, Nagarajan Th, eds. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention*. Vol. 2. San Diego: Elsevier Academic Press; 2015. P. 217–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801919-1.00018-X>
16. Yager ML, Moore SM. The rapid fluorescent focus inhibition test. In: Rupprecht Ch, Nagarajan Th, eds. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention*. Vol. 2. San Diego: Elsevier Academic Press; 2015. P. 199–215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801919-1.00017-8>
17. Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods.* 1998;212(1):79–87. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00212-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00212-3)
18. Баркова ЕП, Нагиева ФГ, Никулина ВГ, Лисаков АН. Быстрый культуральный метод для индикации антигенов вируса бешенства в инфицированных клеточных культурах. *Инфекция и иммунитет.* 2013;3(4):323–6. [Bar-kova EP, Nagieva FG, Nikulina VG, Lisakov AN. The rapid culture method for the indication of rabies virus antigen in infected cell cultures. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity.* 2013;3(4):323–6 (In Russ.)]
19. Bedeković T, Lemo N, Lojkić I, Mihaljević Ž, Jungić A, Cvetnić Ž, et al. Modification of the fluorescent antibody virus neutralization test — elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. *J Virol Methods.* 2013;189(1):204–8. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.01.022>
20. Moeschler S, Locher S, Conzelmann KK, Krämer B, Zimmer G. Quantification of *Lyssavirus*-neutralizing antibodies using vesicular stomatitis virus pseudotype particles. *Virus-es.* 2016;8(9):254. <https://doi.org/10.3390/v8090254>
21. Qin S, Volokhov D, Rodionova E, Wirblich C, Schnell MJ, Chizhikov V, Dabrazhynetskaya A. A new recombinant rabies virus expressing a green fluorescent protein: a novel and fast approach to quantify virus neutralizing antibodies. *Biologicals.* 2019;59:56–61. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2019.03.002>
22. Мовсесянц АА, Олефир ЮВ. Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(1):10–6. [Movsesyants AA, Olefir YuV. Current challenges of preventive vaccination against rabies. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2019;19(1):10–6 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-10-16>
23. Гаврилова ЮК, Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Савицкая ЛВ, Галкина МВ, Кочкин АВ. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции. *Биотехнология.* 2018;34(4):83–8. [Gavrilova YuK, Generalov SV, Abramova EG, Savitskaya LV, Galkina MV, Kochkin AV. Express analysis of activity of anti-rabies serum and anti-rabies immunoglobulin in cell cultures by immunofluorescence method. *Biotechnologiya = Biotechnology.* 2018;34(4):83–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-4-83-88>
24. Hanners NW, Eitson JL, Usui N, Richardson RB, Wexler EM, Konopka G, Schoggins JW. Western Zika virus in human fetal neural progenitors persists long term with partial cytopathic and limited immunogenic effects. *Cell Reports.* 2016;15(11):2315–22. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.075>
25. Fontana D, Prieto C, Kratje R, Etcheverrigaray M. Target cells for antibodies detection in rabies vaccine control. *Vaccine.* 2014;32(24):2805–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.030>
26. Rupprecht ChE, Fooks AR, Abela-Ridder B. Demonstration of *Lyssavirus* antigens by flow cytometry. In: Rupprecht ChE, Fooks AR, Abela-Ridder B. *Laboratory Techniques in Rabies*. 5th ed., Vol. 1. Geneva: WHO; 2018. P. 169–75.
27. Vengatesan D, Raj GD, Raja A, Ramadass P, Gunaseelan L. Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry. *Cytometry.* 2006;70B(5):335–43. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20104>
28. Генералов СВ, Кравцов АЛ, Кожевников ВА, Гаврилова ЮК, Абрамова ЕГ, Никифоров АК. Проточная цитометрия при анализе вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина. *Инфекция и иммунитет.* 2019;9(1):107–14. [Generalov SV,

- Kravtsov AL, Kozhevnikov VA, Gavrilova YuK, Abramova EG, Nikiforov AK. Flow cytometry for the analysis of virus-neutralizing activity of antirabies serum and immunoglobulin drug. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2019;9(1):107–14 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-107-114>
29. Жилин ЕС, Акматова ЭК, Сансызбай АР. Выбор системы определения биологической активности вируса бешенства штамм «VRC-RZ2». *Известия ВУЗов Кыргызстана*. 2013;(4):131–8. [Zhilin ES, Akmatova EK, Sansyzbai AR. The choice of system of determination of biological activity of rabies virus strain “VRC-RZ2”. *Izvestiya VUZov Kyrgyzstana = Bulletin of Universities of Kyrgyzstan*. 2013;(4):131–8 (In Russ.)]
30. Генералов СВ, Ерохин ПС, Красовская ТЮ, Осина НА, Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Щербакова СА. Изучение ультраструктуры поверхности клеток линии Vero, инфицированных вирусом бешенства (RABV, Lissavirus, Rhabdoviridae). *Вопросы вирусологии*. 2017;62(5):227–32. [Generalov SV, Erokhin PS, Kravtsovskaya TYU, Osina NA, Abramova EG, Nikiforov AK, Shcherbakova SA. A study of the ultrastructure of the surface of the transplantable line Vero cells infected with the rabies virus (RABV, Lissavirus, Rhabdoviridae). *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2017;62(5):227–32 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-227-232>
31. Генералов СВ, Ерохин ПС, Абрамова ЕГ, Осина НА, Савицкая ЛВ, Кузнецов ОС и др. Способ определения специфической активности антирабического иммуноглобулина на клеточной культуре с применением атомно-силовой микроскопии. Патент Российской Федерации № 2688334; 2019. [Generalov SV, Erokhin PS, Abramova EG, Osina NA, Savitskaya LV, Kuznetsov OS, et al. Method for determining specific activity of anti-rabies immunoglobulin on cell culture using atomic force microscopy. Patent of the Russian Federation No. 2688334; 2019 (In Russ.)]
32. Гулюкин АМ. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза. *Вопросы вирусологии*. 2014;59(3):5–10. [Gulyukin AM. Significance of modern methods for laboratory detection of rabies agents and identification of the zoonose immunological survey. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2014;59(3):5–10 (In Russ.)]
33. Недосеков ВВ. Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики бешенства. *Ветеринарная патология*. 2002;1:41–7. [Nedosekov VV. Comparative evaluation of methods for laboratory diagnosis of rabies. *Veterinarnaya patologiya = Veterinary Pathology*. 2002;1:41–7 (In Russ.)]
34. Silva LHQ da, Bissoto CE, Carvalho C de, Cardoso TC, Pinheiro DM, Perri SHV. Comparison between the counter immunoelectrophoresis test and mouse neutralization test for the detection of antibodies against rabies virus in dog sera. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(2):259–61. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000200020>
35. Волкова РА, Рунова ВМ, Романова ЛН, Храпова ИС, Эльберт ЛБ, Мальдов ДГ. Применение ракетного иммуноэлектрофореза для определения гликопротеина в концентрированных антирабических вакцинах. *Вопросы вирусологии*. 1994;39(2):68–71. [Volkova RA, Runova VM, Romanova LN, Hrapova IS, El'bert LB, Mal'dov DG. The use of rocket immunoelectrophoresis for the determination of glycoprotein in concentrated rabies vaccines. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 1994;39(2):68–71 (In Russ.)]
36. De Franco M, Massa S, Vassão RC, Siqueira M, Sant'Anna OA. Polygenic control of antibody production and correlation with vaccine induced resistance to rabies virus in high and low antibody responder mice. *Arch Virol*. 1996;141(8):1397–406. <https://doi.org/10.1007/BF01718243>
37. Madhusudana SN, Saraswati S. Development and evaluation of a latex agglutination test for rabies antibodies. *J Clin Virol*. 2003;27(2):129–35. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00135-x](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00135-x)
38. Saengseesom W, Kasempimolporn S, Akewan S, Ouisuan S, Sitprijia V. Use of latex agglutination test to determine rabies antibodies in production of rabies antisera in horses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2010;41(6):1387–92.
39. Сугобаева БП, Дадабаева ЖС, Сайдудин ТС. Выявление рабических антител с помощью РСК. В кн.: *Диагностика, лечение и профилактика инфекционных болезней животных Казахстана*. Алма-Ата; 1989. С. 45–53. [Sugobaeva BP, Dadabaeva ZhS, Sajdulidin TS. Detection of rabid antibodies using CFT. In: *Diagnostics, Treatment and Prevention of Infectious Diseases in Kazakhstan*. Alma-Ata; 1989. P. 45–53 (In Russ.)]
40. Сухарьков АЮ, Назаров НА, Метлин АЕ. Диагностика бешенства животных методом иммуноферментного анализа, сравнение прямого и непрямого сэндвич-варианта. *Ветеринария Кубани*. 2011;(6):12–4. [Sukharkov AYU, Nazarov NA, Metlin AE. Diagnostics of animal rabies by enzyme immunoassay. Comparison of direct and indirect sandwich ELISA options. *Veterinaria Kubani = Kuban Veterinary Medicine*. 2011;(6):12–4 (In Russ.)]
41. Жилин ЕС, Кошметов ЖК, Татыбаева АТ, Матвеева ВМ, Алиева АБ, Мыктыбаева ГБ. Способ получения антиидиотипических антител к антигенам вируса бешенства. Патент Республики Казахстан № 27436; 2013. [Zhilin ES, Koshemetov ZhK, Tatybaeva AT, Matveeva VM, Alieva AB, Myktybaeva GB. Method for producing antiidiotypic antibodies to antigens of the rabies virus. Patent of the Republic of Kazakhstan No. 27436; 2013 (In Russ.)]
42. Shankar BP. Advances in diagnosis of rabies. *Veterinary World*. 2009;2(2):74–8.
43. Цетлин ЕМ, Волкова ВА. Отработка оптимальной схемы учета результатов при применении иммуноферментной тест-системы для определения антигенной активности культуральной антирабической вакцины. *Вопросы вирусологии*. 1996;(1):21–4. [Cetlin EM, Volkova VA. Development of the optimal scheme for recording the results when using the enzyme immunoassay test system to determine the antigenic activity of the cultural rabies vaccine. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 1996;(1):21–4 (In Russ.)]
44. Маркова ЕВ, Матвеева ИН, Попова ВМ. Инновационный подход к количественной оценке гликопротеина в вакцинах против бешенства. *Таврический вестник аграрной науки*. 2017;(2):17–28. [Markova EV, Matveeva IN, Porova VM. An innovative approach to quantitative evaluation of glycoprotein in vaccines against rabies. *Tavricheskiy vestnik agrarnoy nauki = Tavrichesky Bulletin of Agrarian Science*. 2017;(2):17–28 (In Russ.)]
45. Salvi NC, Deopurkar RL, Waghmare AB, Khadilkar MV, Kallikar MY, Gade SK, Mohite LS. Validation of indirect ELISA for quantitative testing of rabies antibodies during production of antirabies serum using equines. *Proc Vaccinol*. 2010;2(1):3–11. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2010.03.001>
46. Jallet C, Tordo N. *In Vitro* ELISA test to evaluate rabies vaccine potency. *J Vis Exp*. 2020;159:e59641. <https://doi.org/10.3791/59641>
47. Korimbocus J, Dehay N, Tordo N, Cano F, Morgeaux S. Development and validation of a quantitative competitive ELISA for potency testing of equine anti rabies sera with other potential use. *Vaccine*. 2016;34(28):3310–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.086>
48. Dykman LA, Khlebtsov NG. Immunological properties of gold nanoparticles. *Chem Sci*. 2017;8(3):1719–35. <https://doi.org/10.1039/C6SC03631G>
49. Asgary V, Shoari A, Baghbani-Arani F, Shandiz SAS, Khosravi MS, Janani A, et al. Green synthesis and evaluation of silver nanoparticles as adjuvant in rabies veterinary vac-

- cine. *Int J Nanomedicine*. 2016;(11):3597–605. <https://doi.org/10.2147/IJN.S109098>
50. Kasempimolporn S, Saengseesom W, Huadsakul S, Boonchang S, Sitprija V. Evaluation of a rapid immunochromatographic test strip for detection of *Rabies virus* in dog saliva samples. *J Vet Diagn Invest*. 2011;23(6):1197–201. <https://doi.org/10.1177/1040638711425576>
51. Wang H, Feng N, Yang S, Wang C, Wang T, Gao Y, et al. A rapid immunochromatographic test strip for detecting rabies virus antibody. *J Virol Methods*. 2019;170(1–2):80–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.09.002>
52. Shiota S, Mannen K, Matsumoto T, Yamada K, Yasui T, Takayama K, et al. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies. *J Virol Methods*. 2009;161(1):58–62. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.05.018>
53. David D, Yakobson B, Rotenberg D, Dveres N, Davidson I, Stram Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet Microbiol*. 2002;87(2):111–8. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00041-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00041-X)
54. Дедков ВГ, Девяткин АА, Полещук ЕМ, Сафонова МВ, Маркелов МЛ, Шипулин ГА. Разработка и апробация набора реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени. *Вопросы вирусологии*. 2016;61(5):235–40. [Dedkov VG, Deviatkin AA, Poleshchuk EM, Safonova MV, Markelov ML, Shipulin GA. Development and evaluation of the RT-PCR kit for the rabies virus diagnosis. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2016;61(5):235–40 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-235-240>
55. Nagaraj T, Vasanth JP, Desai A, Kamat A, Madhusudana SN, Ravi V. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *J Clin Virol*. 2006;36(1):17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.01.009>
56. Bourhy H, Reynes J, Dunham E, Dacheux L, Larrous F, Huong VTQ, et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *J Gen Virol*. 2008;89(11):2673–81. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003913-0>
57. Moreira BLC, Pereira LA, Gimenez APL, Inagaki JMF, Raboni SM. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for the quantification of rabies virus as quality control of inactivated rabies vaccines. *J Virol Methods*. 2019;270:46–51. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.025>
58. Moreira BLC, Gimenez APL, Inagaki JMF, Raboni SM. Inactivated rabies vaccines: Standardization of an *in vitro* assay for residual viable virus detection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(3):e0008142. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008142>
59. Sekar T, Premkumar AA, Mohan GC, Sekar B, Sundaran B, Sivakumar S. Quantification of rabies virus by Real Time PCR in comparison with mouse inoculation test (MIT) and fluorescent antibody test (FAT). *Madridge J Vaccines*. 2019;3(1):80–5. <https://doi.org/10.18689/mjv-1000118>
60. Игнатьев ГМ, Оксанич АС, Антонова ЛП, Самарцева ТГ, Мосолова СВ, Мефед КМ и др. Молекулярно-генетическое исследование стабильности и подтверждение подлинности штамма Внуково-32, применяемого для производства вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(2):107–15. [Ignatyev GM, Oksanich AS, Antonova LP, Samartseva TG, Mosolova SV, Mefed KM, et al. Molecular genetic testing of stability and identification of Vnukovo-32 strain used for production of the cultural concentrated purified inactivated dry rabies vaccine. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):107–15 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-107-115>
61. Тучков ИВ, Краснов ЯМ, Горьев АА, Матвеева ЖВ, Степанов АВ, Майоров НВ, Никифоров АК. Нуклеотидная последовательность и филогенетический анализ G гликопротеина российского фиксированного штамма «Москва 3253» вируса бешенства. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013;4:73–5. [Tuchkov IV, Krasnov YM, Goryaev AA, Matveeva ZV, Stepanov AV, Mayorov NV, Nikiforov AK. Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of G glycoprotein of the rabies virus strain “Moscow 3253” from Russia. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2013;4:73–5 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-4-73-75>
62. Лосич МА, Зайкова ОН, Непоклонова ИВ, Гребенникова ТВ, Верховский ОА, Одноров АИ, Алипер ТИ. Молекулярно-биологическая характеристика вакцинного штамма ERA-CB 20M вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2018;63(5):224–32. [Losich MA, Zajkova ON, Nepoklonova IV, Grebennikova TV, Verhovskij OA, Odnorov AI, Aliper TI. Molecular and biological characteristics of vaccinaly ERA-CB 20M of rabies virus. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2018;63(5):224–32 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-224-232>
63. Tao X, Han N, Guo, Z, Tang Q, Rayner S, Liang G. Molecular characterization of China human rabies vaccine strains. *Virol Sin*. 2013;28(2):116–23. <https://doi.org/10.1007/s12250-013-3314-9>
64. Zhu S, Wang C, Zhang P, Li H, Luo S, Guo C. Sequencing and molecular characterization of CTNCEC25, a China fixed rabies virus vaccine strain CTN-1 adapted to primary chicken embryo cells. *Virol J*. 2014;11:176. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-176>
65. Зайкова ОН, Гребенникова ТВ, Гулюкин АМ, Шабейкин АА, Полякова ИВ, Метлин АЕ. Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей. *Вопросы вирусологии*. 2017;62(3):101–8. [Zaykova ON, Grebennikova TV, Gulyukin AM, Shabaykin AA, Polyakova IV, Metlin AE. Molecular-genetic characterization of field isolates of rabies virus identified in the territory of Vladimir, Moscow, Tver, Nizhny Novgorod and Ryazan regions. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2017;62(3):101–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-101-108>

Об авторах / Authors

Гаврилова Юлия Кирилловна. Yuliya K. Gavrilova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7919-3412>

Генералов Сергей Вячеславович, канд. биол. наук. Sergey V. Generalov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1461-5383>

Абрамова Елена Геннадьевна, д-р биол. наук. Elena G. Abramova, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8798-1547>

Никифоров Алексей Константинович, д-р биол. наук. Aleksey K. Nikiforov, Dr. Sci. (Biol.). SPIN-код РИНЦ: 3202-3979

Поступила 15.02.2021

После доработки 24.03.2021

Принята к публикации 10.06.2021

Received 15 February 2021

Revised 24 March 2021

Accepted 10 June 2021

Брюшнотифозные вакцины.

История создания и современные вакцинные препараты

М. В. Абрамцева*, Е. О. Неманова, Н. С. Алехина, Т. И. Немировская

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

Брюшной тиф — острое инфекционное заболевание, вызываемое возбудителем *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серотип *Typhi* (*S. Typhi*), по-прежнему является одной из основных причин заболеваемости населения в эндемичных экономически средне- и слаборазвитых странах Азии и Африки. Индустриальные страны могут быть подвержены вспышкам брюшного тифа ввиду стремительно развивающегося международного туризма, а также стихийных бедствий. В условиях прогрессирующей резистентности *S. Typhi* к антимикробным препаратам, высокой эпидемиологической нагрузки и невозможности обеспечения удовлетворительных санитарно-гигиенических условий в ряде регионов, наряду с внедрением новых протоколов лечения заболевания, актуальной задачей мирового здравоохранения является развитие вакцинопрофилактики брюшного тифа. Цель работы — освещение основных аспектов истории создания брюшнотифозных вакцин, систематизация данных о лицензированных вакцинных препаратах и перспективных направлениях разработки новых вакцин. В статье описана эпидемиологическая картина брюшного тифа в мире и в Российской Федерации. Изложен мировой опыт создания вакцинных препаратов от момента получения убитой брюшнотифозной вакцины до этапа производства конъюгированных вакцин. Приведена информация об отечественных и зарубежных вакцинах, представленных на мировом фармацевтическом рынке. Обозначены основные тенденции в сфере разработки вакцинных препаратов против заболевания, вызываемого *S. Typhi*. Сделан вывод о необходимости повышения эффективности ранее разработанных вакцин, а также создания новых, комбинированных вакцинных препаратов против брюшного тифа.

Ключевые слова: брюшной тиф; вакцинопрофилактика; брюшнотифозные вакцины; живые аттенуированные вакцины; полисахаридные вакцины; конъюгированные вакцины; Vi-капсульный полисахарид

Для цитирования: Абрамцева МВ, Неманова ЕО, Алехина НС, Немировская ТИ. Брюшнотифозные вакцины. История создания и современные вакцинные препараты. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(2):85–96. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-85-96

* **Контактное лицо:** Абрамцева Марина Витальевна; Abramtceva@expmed.ru

Typhoid vaccines. Historical aspects of typhoid vaccine development, and currently available products

M. V. Abramtseva*, E. O. Nemanova, N. S. Alekhina, T. I. Nemirovskaya

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

Typhoid fever is an acute infectious disease caused by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* (*S. Typhi*), which is still extremely common in endemic low- and middle-income countries of Asia and Africa. Industrialised countries may also be affected by typhoid fever outbreaks due to booming international tourism, and natural disasters. Given *S. Typhi* progressive resistance to antibiotics, high epidemiological burden, and lack of adequate sanitation and hygiene in a number of regions, the introduction of new treatment protocols and the improvement of preventive vaccination are critical tasks in global healthcare. The aim of the study was to highlight the main historical aspects of the typhoid vaccine development, to summarise data on the licensed vaccines and promising approaches to the development of new typhoid vaccines. The paper describes the current epidemiological situation of typhoid fever globally and in the Russian Federation. It dwells upon the global experience in typhoid vaccine development from the production of an inactivated vaccine to the development of conjugated vaccines. The paper summarises data on Russian and foreign-made typhoid fever vaccines currently available in the global pharmaceutical market. It outlines the main trends in the development of vaccines against the disease caused by *S. Typhi*. The paper demonstrates the need for improving the efficacy of existing vaccines and development of new typhoid combination vaccines.

Key words: typhoid fever; preventive vaccination; typhoid vaccines; live attenuated vaccines; polysaccharide vaccines; conjugated vaccines; Vi capsular polysaccharide

For citation: Abramtseva MV, Nemanova EO, Alekhina NS, Nemirovskaya TI. Typhoid vaccines. Historical aspects of typhoid vaccine development, and currently available products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(2):85–96. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-85-96

* **Corresponding author:** Marina V. Abramtseva; Abramtceva@expmed.ru

Брюшной тиф является одним из наиболее распространенных инфекционных заболеваний бактериальной природы, оказывающим значительную социально-экономическую нагрузку на эндемичные по данному заболеванию регионы.

Наиболее подвержены брюшному тифу экономически средне- и слаборазвитые страны, обладающие неудовлетворительными санитарно-гигиеническими условиями. Существенно осложняют ситуацию происходящие на этих территориях военные конфликты или природные катастрофы. Однако активно развивающийся международный туризм, а также стихийные бедствия могут стать причиной возникновения завозных случаев брюшного тифа, в том числе и в индустриальных странах [1, 2].

Неуклонно возрастающая антибиотикорезистентность бактерий, в том числе возбудителей кишечных инфекций, существенно усложняет борьбу с кишечными заболеваниями и, по оценкам ВОЗ, является проблемой мирового масштаба, а разработка вакцинных препаратов против заболеваний, вызываемых данными возбудителями, — одной из приоритетных задач современного здравоохранения.

Цель работы — освещение основных аспектов истории создания брюшнотифозных вакцин, систематизация данных о лицензированных вакцинных препаратах и перспективных направлениях разработки новых вакцин.

Брюшной тиф. Этиология и эпидемиологическая картина

Возбудитель брюшного тифа, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серотип *Typhi* (*S. Typhi*), был идентифицирован в 1880 г. немецким патологоанатомом К. Эбертом, представляет собой подвижную грамтрицательную неспорообразующую палочку, относится к факультативным анаэробам [3]. *S. Typhi* содержит термостабильный О-антиген, Vi-антиген и жгутиковый Н-антиген. При разрушении бактериальной клетки высвобождается эндотоксин, обуславливающий клиническую картину заболевания.

Брюшной тиф относят к группе кишечных инфекций и типичным антропонозам. Источником инфекции в естественных условиях служит человек (больной, реконвалесцент или бактерионоситель). Для брюшного тифа характерен фекально-оральный механизм передачи возбудителя, который может осуществляться водным, пищевым и контактно-бытовым путем. Существенная роль в распространении возбудителя брюшного тифа принадлежит хроническим бактерионосителям, особенно в случае их присутствия на эпидемически значимых объектах: детские учреждения, объекты здравоохранения, общественного питания, водоснабжения и т. д.¹ Причиной возникновения вспышек брюшного тифа может служить потребление воды из открытых водоемов и технической воды, используемой на промышленных предприятиях, а также пищевых продуктов, в которых *S. Typhi* способны сохраняться в течение длительного времени. Фактором передачи могут также являться окружающие предметы.²

Пристальное внимание к вопросам санитарии и повышение уровня жизни населения позволили существенно снизить общее число случаев заболевания брюшным тифом. В 2017 г. в мире было выявлено 10,9 млн случаев, более 116 тыс. — с ле-

тальным исходом, что практически в два раза ниже статистических данных 1990 г. [4]. Однако, несмотря на общемировую тенденцию по снижению случаев брюшного тифа, ряд территорий до сих пор испытывает серьезную социально-экономическую нагрузку, вызванную данным заболеванием. Наиболее эндемичными по брюшному тифу являются регионы преимущественно со средним и низким уровнем экономического развития, с неудовлетворительными санитарно-гигиеническими условиями и высокой плотностью населения, такие как Азия, Африка, Латинская Америка, Карибские острова и Океания [4, 5]. Наиболее подвержены данному заболеванию дети в возрасте от 2 до 14 лет [6], преимущественно от 2 до 4 лет [7].

В Российской Федерации³, Северной Америке, Европе, Австралии [4] выявляют единичные случаи заболевания с редкими эпидемическими вспышками, незначительными по своим масштабам. В Российской Федерации преимущественное количество больных регистрируют среди лиц, прибывающих из стран, эндемичных по брюшному тифу [8]. В период с 2005 по 2018 г. заболеваемость брюшным тифом и паратифами А, В, С на территории Российской Федерации снизилась с 0,15 до 0,01 на 100 тыс. населения⁴. Преобладание завозного брюшного тифа на территории Российской Федерации требует особого внимания в области профилактической и клинической медицины в связи с огромным количеством трудовых мигрантов, в частности из Таджикистана и Узбекистана [9].

Опыт лечения брюшного тифа показал, что возбудитель заболевания способен вырабатывать устойчивость к вновь применяемым антимикробным препаратам в течение довольно непродолжительного периода времени. Широкое распространение штаммов *S. Typhi*, резистентных к антибиотикам первой линии (ампицилин, хлорамфеникол, триметоприм/сульфаметоксазол), в конце 1980-х гг. привело к введению в терапию брюшного тифа фторхинолонов⁵. Начиная с 2000-х гг. стали появляться сообщения о возникновении штаммов, устойчивых к данной группе препаратов, в частности к ципрофлоксацину и гатифлоксацину. Штаммы, устойчивые к фторхинолонам, преобладают в Южной Азии и Африке. Согласно рекомендациям ВОЗ 2018 г.⁶, этиотропная терапия брюшного тифа проводится такими препаратами, как азитромицин и цефалоспорины (цефиксим, цефтриаксон), однако анализ результатов лечения данного заболевания в эндемичном регионе Средней Азии (середина 1990-х — середина 2000-х гг.) и в Санкт-Петербурге во время эпидемической вспышки (2006 г.), проведенный А. Н. Коваленко с соавт., показал, что никакие известные антимикробные препараты, в том числе комбинации различных антибиотиков, не давали стопроцентной гарантии предотвращения развития рецидивов или повторного выделения возбудителя при контрольном исследовании [10].

В ряде регионов зарегистрированы спорадические случаи устойчивости возбудителей к азитромицину. Вспышка брюшного тифа в Пакистане в 2016–2017 гг., вызванная штаммом *S. Typhi*, устойчивым к цефтриаксону, продемонстрировала острую необходимость в смене схем лечения в эндемичных регионах и применении превентивных мер по контролю заболевания, в том числе иммунизации населения⁷.

¹ Ющук НД, Венгеров ЮА, ред. Инфекционные болезни: Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.

² Там же.

³ Шаповал ИН, Никитина СЮ, Агеева ЛИ, Александрова ГА, Зайченко НМ, Кириллова ГН и др., ред. Здравоохранение в России. 2019. Статистический сборник. М.: Росстат; 2019.

⁴ Там же.

⁵ Typhoid vaccines: WHO position paper — March 2018. Wkly Epidemiol. Rec. 2018;93(13):153–72.

⁶ Там же.

⁷ Там же.

Опыт создания вакцинных препаратов против брюшного тифа

Плодотворный период 1870-х и 1880-х гг. привел к разработке инактивированных вакцин против брюшного тифа, чумы и холеры. R. Pfeiffer и W. Kolle в Германии, а также A. Wright в Великобритании работали над созданием убитых вакцин против брюшного тифа [11]. Результаты ранних работ по разработке убитой брюшнотифозной вакцины послужили импульсом к созданию инактивированных парентеральных цельноклеточных вакцин⁸ [12].

В 1898 г. в одном из полков русской армии В. К. Высоковичем была успешно применена «гретая» брюшнотифозная вакцина, содержащая инактивированные нагреванием бактериальные клетки⁹, а с 1915 г. иммунизация брюшнотифозной вакциной ряда частей русской армии, а также учрежденный военного ведомства стала проводиться в обязательном порядке [13].

В 1916 г. в систему противозидемической защиты русской армии была внедрена иммунизация комбинированной тифо-паратифозной А и В (TAB) вакциной¹⁰. В 1930-е гг. плановая вакцинация взрослого населения в СССР включала схему прививок против брюшного тифа, паратифов А и В, столбняка. В рамках научно-исследовательской работы по теоретическому и экспериментальному обоснованию комплексной и ассоциированной иммунизации была разработана химическая поливакцина против брюшного тифа, паратифов А и В, дизентерии Флекснера и Зонне, холеры, столбняка. Впоследствии данная вакцина была заменена на химическую вакцину TABTe, направленную на формирование иммунитета к брюшному тифу, паратифам А и В, столбняку. Широкие испытания на добровольцах TABTe показали эпидемиологическую целесообразность и иммунологическую эффективность вакцины [14].

В 1954–1967 гг. в Югославии, Гайане, Польше и СССР были проведены полевые испытания двух вакцинных препаратов, произведенных из инактивированных ацетоном (вакцина К), а также нагреванием и фенолом (вакцина Л) клеток *S. Typhi*. Эти испытания продемонстрировали, что инактивированные цельноклеточные брюшнотифозные вакцины обеспечивают высокий уровень защиты; при этом вакцина К обладает большим защитным действием, чем вакцина Л [15].

Было сделано много попыток идентифицировать и выделить протективные антигены из брюшнотифозных вакцин. В исследовании вакцин К и Л было продемонстрировано, что только антитела к антигену Н в некоторой степени отражают эффективность исследованных вакцин, в то время как антительные ответы на О- и Vi-антигены не свидетельствуют об их эффективности для человека. Таким образом, ни один отдельно взятый компонент в составе данных вакцинных препаратов не был идентифицирован в качестве протективного [16]. В связи с тем что наряду с сомнительной протективной активностью инактивированные парентеральные цельноклеточные вакцины обладали высокой реактогенностью, они не получили широкого практического применения и были исключены из программ рутинной иммунизации населения [17].

Важный шаг в направлении создания брюшнотифозных вакцин был сделан R. Germanier и E. Firger, когда они получили аттенуированный штамм *S. Typhi* Gal E Ty21a [18]. Этот штамм в дальнейшем с успехом использовался для создания безопасных и эффективных живых вакцин. Контролируемое полевое испытание вакцины против брюшного тифа, полученной на основе данного штамма, было проведено в городе Александрия (Египет) в 1978–1981 гг. В исследовании приняли участие 32 388 детей. Участники исследования были разделены на две сравнимые по размерам группы: одну группу иммунизировали тремя дозами вакцины, а другую, контрольную — тремя дозами плацебо. Каждая доза вакцины содержала от 10^8 до 10^9 живых бактерий штамма Ty21a. После проведения иммунизации за детьми из обеих групп в течение трех лет велось наблюдение и каждый случай, вызывающий подозрение на заболевание брюшным тифом, исследовался с помощью бактериологических и серологических методов. Эффективность вакцины оценивалась по числу подтвержденных случаев брюшного тифа в обеих группах. Заболеваемость брюшным тифом составила 4,9 случая на 10 тыс. детей в год в контрольной группе и 0,2 случая на 10 тыс. детей в год в иммунизированной группе. Эти результаты показали, что использованная схема иммунизации обеспечивает защиту на период, по меньшей мере, в три года.

В 1980-х гг. в городе Сантьяго (Чили) были проведены рандомизированные плацебо-контролируемые испытания пероральной живой брюшнотифозной вакцины на основе штамма Ty21a в капсулах с кишечнорастворимым покрытием. В исследовании принимали участие 109 тыс. школьников. Введение трех доз вакцины в течение одной недели показало эффективность на уровне 67% в течение трех лет [19, 20]. Вакцина на основе штамма Ty21a обеспечивала такой же уровень защиты, как и парентеральная вакцина, произведенная из инактивированных нагреванием и фенолом клеток. При этом пероральная живая аттенуированная вакцина практически не вызывала побочных реакций.

Штамм Ty21a использовался для создания следующего поколения усовершенствованных пероральных живых вакцин. В частности, более удобной для широкомасштабного применения оказалась вакцина, расфасованная в двухкамерные саше, содержащие лиофилизированную вакцину и бикарбонат-аскорбатный буфер. Содержимое обоих саше непосредственно перед применением смешивалось со 100 мл питьевой воды. Полевое испытание в Сантьяго (использовались три дозы, по одной дозе каждый день) показало более высокую защитную эффективность, чем у капсулированной формы. Защитный эффект вакцины составил 77% в течение трех лет [11].

Наряду с работами по созданию живых аттенуированных вакцин были предприняты попытки использовать для иммунизации очищенные О- и Vi-антигены. В 1954 г. M. Landy впервые было проведено исследование на добровольцах, целью которого было выяснение возможности замены цельноклеточной вакцины отдельно взятыми очищенными антигенами О и Vi. Было показано, что введение отдельных антигенов в виде одной инъекции приводит к образованию более высоких средних геометрических значений титров (geometric mean titres, GMT) антител класса IgG к О- и Vi-антигенам, чем введение цельноклеточных вакцин. Особенно это было выражено

⁸ Yugoslav Typhoid Commission: A controlled field trial of the effectiveness of acetone-dried and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia. Bull World Health Organ. 1964;30:623–30.

Polish Typhoid Commission: Controlled field trials and laboratory studies on the effectiveness of typhoid vaccines in Poland 1961–64. Final report. Bull World Health Organ. 1966;34(2):211–22.

⁹ Елкин ИИ, ред. Общая и частная эпидемиология (руководство для врачей). М.: Медицина. Т. 1; 1973.

¹⁰ Разгулин СА. Научное обоснование нового подхода к профилактике кишечных антропонозов у военнослужащих в эндемичных районах: дис. ... д-ра мед. наук. Пермь; 2006.

по отношению к Vi-антигену. Также продемонстрировано, что введение очищенного Vi-антигена вызывает более продолжительный антителеный ответ, чем введение цельноклеточной вакцины [21].

Брюшнотифозная Vi-полисахаридная очищенная вакцина была разработана М. Landy с соавт. [21], а позднее усовершенствована группой ученых под руководством К. Н. Wong [16].

Последующие работы по созданию конъюгированных вакцинных препаратов против брюшного тифа [22, 23] позволили существенно продвинуться в вопросе профилактики данного заболевания и расширить охват вакцинируемого населения за счет детей младше двух лет, у которых полисахаридные неконъюгированные вакцины не индуцируют эффективный иммунный ответ [24].

Широкое распространение вирулентных штаммов *S. Typhi*, не содержащих Vi-антиген, и, как следствие, неэффективность Vi-полисахаридных вакцин в профилактике заболеваний, вызываемых такими возбудителями, сменили вектор разработок в сторону создания новых вакцин, основанных на других антигенах [25].

Значительный вклад в разработку вакцинных препаратов внесли исследования, касающиеся поисков новых носителей и техник связывания антигена с носителем для создания конъюгатов [26].

Современные тенденции вакцинопрофилактики брюшного тифа

В мире лицензированы три типа вакцин против брюшного тифа: конъюгированная вакцина (typhoid conjugate vaccine, TCV), неконъюгированная Vi-полисахаридная вакцина (Vi polysaccharide vaccine, ViPS) и живая аттенуированная вакцина¹¹. Живая аттенуированная и неконъюгированная вакцины рекомендованы ВОЗ с 2008 г.¹² В октябре 2017 г. схожие рекомендации по применению рутинной иммунизации в эндемичных регионах были даны Стратегической консультативной группой экспертов ВОЗ в отношении конъюгированных вакцин (TCV)¹³, а в конце декабря 2017 г. ВОЗ провела преквалификацию первой Vi-конъюгированной со столбнячным анатоксином вакцины против брюшного тифа Typhbar-TCV[®] (Bharat Biotech, India)¹⁴. Вакцина Typhbar-TCV[®] зарегистрирована в Индии, Камбодже, Непале и Нигерии [27]. В декабре 2020 г. преквалификацию ВОЗ прошла вторая Vi-конъюгированная брюшнотифозная вакцина TYPHIBEV[®] (Biological E. Limited (BE), Индия), в состав которой входит Vi-полисахарид, конъюгированный с нетоксичным производным дифтерийного токсина CRM197¹⁵. Вакцина разработана совместно с GlaxoSmithKline. Производство локализовано на территории Индии.

Согласно рекомендациям ВОЗ, конъюгированную вакцину следует вводить внутримышечно детям в возрасте от 6 мес. и взрослым до 45 лет однократно в объеме 0,5 мл с содержанием 25 мкг Vi-капсульного полисахарида. Неконъюгированная Vi-полисахаридная вакцина вводится лицам в возрасте от 2 лет подкожно или внутримышечно, однократно в объеме 0,5 мл с содержанием Vi-капсульного полисахарида

25 мкг. Живая аттенуированная вакцина рекомендована лицам старше 6 лет орально в виде капсул путем поэтапного введения трех доз препарата (для Канады и США рекомендовано введение четырех доз препарата)¹⁶.

В работах ряда авторов продемонстрировано, что вакцина Typhbar-TCV[®] является более иммуногенной и эффективной по сравнению с неконъюгированной вакциной, а Vi-антитела, вырабатываемые при иммунизации данной вакциной, обладают более высокой авидностью, чем антитела, образующиеся при применении неконъюгированной вакцины [23, 28, 29]. Результаты исследования, проведенного среди лиц от 2 до 45 лет и включавшего в себя двукратную иммунизацию, показали, что спустя 6 недель после первичной иммунизации GMT антител класса IgG к Vi-полисахариду (GMT анти-Vi IgG) при применении Typhbar-TCV[®] составило 1292,5 ЕД/мл, а при иммунизации неконъюгированной вакциной — 411,1 ЕД/мл. Вторичная иммунизация была проведена спустя два года после начала исследования. Через шесть недель GMT анти-Vi IgG для конъюгированной и неконъюгированной вакцин составило 1685,3 и 445,6 ЕД/мл соответственно [23].

При однократной иммунизации лиц в возрасте от 2 до 45 лет спустя три года после вакцинации GMT анти-Vi IgG составило 282,3 ЕД/мл для вакцины Typhbar-TCV[®] и 228,8 ЕД/мл для неконъюгированной вакцины; через 5 лет GMT анти-Vi IgG — 190,1 и 153,7 ЕД/мл соответственно¹⁷.

GMT анти-Vi IgG у детей в возрасте от 6 до 23 мес. через шесть недель после однократной иммунизации Typhbar-TCV[®] составило 1937,4 ЕД/мл [23], при этом наличие высокого титра антител отмечалось у 84% иммунизированных детей до достижения ими 5-летнего возраста¹⁸.

Сравнительная оценка эффективности конъюгированной вакцины Typhbar-TCV[®] и неконъюгированной вакцины Typhim Vi[®] (Sanofi Pasteur, Inc, Франция) спустя 28 дней после первичной вакцинации лиц от 18 до 60 лет показала, что применение Typhbar-TCV[®] способствует индукции значительно более высокого титра IgG Vi-антител (GMT анти-Vi IgG составило 562,9 ЕД/мл, уровень сероконверсии 100%), чем применение Typhim Vi[®] (GMT анти-Vi IgG — 140,5 ЕД/мл, уровень сероконверсии 88,6%) [28].

Испытания вакцины Typhbar-TCV[®], проведенные на двух возрастных группах 6–23 мес. и 2–45 лет, показали, что спустя два года после однократной иммунизации серопротекция для обеих групп составила порядка 85% [29], что значительно выше серопротекции Vi-полисахаридных вакцин (59%) через два года после однократной вакцинации лиц в возрасте от 3 до 44 лет [30].

Оценка экономической эффективности применения различных стратегий иммунизации конъюгированными вакцинами против брюшного тифа показала, что рутинная иммунизация детей в возрасте до 1 года по расширенной программе иммунизации наиболее приемлема для регионов с ежегодной заболеваемостью более 50 случаев на 100 тыс. населения. При повышении значения данного показателя до 130 случаев на 100 тыс. населения рекомендовано применение программы иммунизации с последующей однократной ревакцинацией детей в возрасте от 5 до 14 лет [31]. Дальнейшие исследования

¹¹ Typhoid vaccines: WHO position paper. Wkly Epidemiol. Rec. WHO. 2008;83(6):49–60.

¹² Там же.

¹³ Summary of the October 2017 meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization. WHO. Geneva, Switzerland; 2017.

¹⁴ Typhoid vaccine prequalified. Typhbar TCV[®] from Bharat Biotech, World's first typhoid conjugate vaccine prequalified by WHO. WHO; 2018.

¹⁵ <https://www.biologicle.com/news.html>

¹⁶ Typhoid vaccines: WHO position paper — March 2018. Wkly Epidemiol. Rec. WHO. 2018;93(13):153–72.

¹⁷ Там же.

¹⁸ Там же.

показали, что рутинная иммунизация населения конъюгированными вакцинами против брюшного тифа экономически обоснована в регионах с частотой заболеваемости более 300 случаев на 100 тыс. населения [32].

По состоянию на 2018 г. суммарная емкость мирового рынка вакцинных препаратов против брюшного тифа составила 225 млн долларов США¹⁹. В 2019 г. данный показатель возрос до 262,8 млн долларов США. Наибольшую часть рынка заняли полисахаридные неконъюгированные вакцины (56,9%), далее — живые аттенуированные вакцины (31,27%), доля конъюгированных вакцинных препаратов — 6,13%²⁰.

Широкое применение в практике здравоохранения находят такие Vi-полисахаридные вакцины, как Typhbar[®], Typhim Vi[®], Typherix[®], Bio Typh[™], Shantiph[®], а также живая аттенуированная вакцина Vivotif[®] и комбинированные вакцины, содержащие Vi-капсульный полисахарид *S. Typhi* и антигенные частицы инактивированного возбудителя гепатита А (Hepatyrix[®], ViVAXIM[®] (табл. 1).

В Российской Федерации ООО «Гритвак» была разработана и зарегистрирована в 2006 г. вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная, торговое название ВИАНВАК^{®21}. Препарат представляет собой раствор капсульного полисахарида (Vi-антигена), извлеченного из супернатанта культуры *S. Typhi* штамм Ty-2 № 4446, обработанного рибонуклеазами и проназой и очищенного гель-фильтрацией. Наиболее близким аналогом данному препарату является вакцина Typhim Vi. В качестве консерванта используется фенол. Вакцина обеспечивает быстрое образование и интенсивное повышение уровня специфических антител к Vi-полисахариду в крови, которые через 1–2 недели обеспечивают защиту от инфекции в течение не менее 3 лет²².

Согласно данным по стандартизации протективной активности данного препарата при сравнении с брюшнотифозным стандартом США (Typhoid Vaccine USP Wyeth) — одна доза вакцины ВИАНВАК[®] содержит не менее 8 протективных единиц USP [33].

Безопасность препарата была подтверждена в доклинических исследованиях. Клинические исследования вакцины ВИАНВАК[®], проведенные с участием взрослых, подростков в возрасте 7–14 лет и детей в возрасте 2–6 лет, показали, что сероконверсия Vi-антител у взрослых достигает 71,6%, у детей и подростков — 84,6%²³.

Иммунизация вакциной ВИАНВАК[®] индуцирует возрастание уровней всех основных классов антител к Vi-антигену (IgG, IgA, IgM). Эффективность вакцины была достоверно подтверждена в условиях эпидемии брюшного тифа в Республике Таджикистан. В марте 1997 г. было привито более 18 тыс. военнослужащих. До начала вакцинации в январе–марте 1997 г. заболеваемость составляла 87 случаев в месяц (2 летальных случая), в течение 9 мес. после начала вакцинации (март–ноябрь 1997 г.) заболеваемость снизилась до 5,7 случаев в месяц при

отсутствии летальных исходов. В условиях пика эпидемии эффективность вакцины ВИАНВАК[®] составила не менее 72,3%²⁴.

Согласно инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата ВИАНВАК[®] иммунизация проводится однократно. Ревакцинация проводится по показаниям каждые три года. Нежелательные побочные реакции на введение вакцины расцениваются как слабые и могут проявляться в виде покраснения, болезненности в месте введения, небольшого повышения температуры, головной боли²⁵.

Вакцинация против брюшного тифа в Российской Федерации включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Иммунизацию проводят при угрозе возникновения эпидемии или вспышки (стихийные бедствия, крупные аварии на водопроводной и канализационной сети), а также в период эпидемии, при этом в угрожаемом районе проводят массовую иммунизацию населения. Плановая вакцинация показана лицам, занятым в сфере коммунального благоустройства, работающим с живыми культурами возбудителей брюшного тифа, населению, проживающему на территориях с хроническими водными эпидемиями брюшного тифа, контактными лицам в очагах брюшного тифа, а также лицам, выезжающим в гиперэндемичные по брюшному тифу регионы и страны²⁶.

Следует отметить, что в 1996 г. федеральным государственным унитарным предприятием «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России) была разработана вакцина брюшнотифозная спиртовая. Препарат представляет собой инактивированные этиловым спиртом лиофилизированные микробные клетки *S. Typhi* Ty-2 № 4446. Вакцина была зарегистрирована в России в 2001 г. под торговым наименованием Тифивак^{®27}. Однако в настоящее время вакцина Тифивак не производится.

Наряду с успешно применяемыми для профилактики брюшного тифа неконъюгированными вакцинными препаратами происходит активное внедрение конъюгированных вакцин. Помимо прошедших преqualфикацию ВОЗ вакцин Typhbar-TCV[®] и TyPHiBEV[®], лицензированы еще две конъюгированные со столбнячным анатоксином вакцины против брюшного тифа: PedaTyph[™], эффективность и безопасность которой были подтверждены рядом исследовательских работ [22, 34], и ZyVac-TCV[™], безопасность и иммуногенность которой оказались сопоставимы с такими же показателями для вакцины Typhbar-TCV[®] [35, 36] (табл. 1).

Двукратное увеличение суммарной емкости мирового рынка вакцинных препаратов против брюшного тифа (более 525 млн долларов США) прогнозируется к 2027 г.²⁸

¹⁹ Typhoid fever vaccines market size, trends, shares, insights and forecast — coherent market insights. <https://www.coherentmarketinsights.com/insight/request-sample/2552>

²⁰ Typhoid fever vaccines market forecast to 2027 — COVID-19 impact and global analysis by vaccine type (live attenuated vaccine, capsular polysaccharide vaccines, conjugate vaccine, others); route of administration (oral, injectable), and geography. <https://www.theinsightpartners.com/reports/typhoid-vaccines-market/>

²¹ <https://grls.rosminzdrav.ru>

²² Там же.

²³ Зверев ВВ, Хаитов РМ, ред. Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. Краткое издание. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014.

²⁴ Там же.

²⁵ <https://grls.rosminzdrav.ru>

²⁶ Приказ Минздрава России от 21.03.2014 № 125н (ред. от 03.02.2021) «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям».

²⁷ <https://grls.rosminzdrav.ru>

²⁸ Typhoid fever vaccines market forecast to 2027 — COVID-19 impact and global analysis by vaccine type (live attenuated vaccine, capsular polysaccharide vaccines, conjugate vaccine, others); route of administration (oral, injectable), and geography. <https://www.theinsightpartners.com/reports/typhoid-vaccines-market/>

Таблица 1. Брюшнотифозные вакцины, представленные на мировом фармацевтическом рынке
Table 1. Typhoid fever vaccines currently available in the global pharmaceutical market

Тип вакцины Vaccine type	Торговое наименование Vaccine	Производитель Manufacturer	Форма выпуска Dosage form	Состав (действующее вещество) Composition (active ingredient)	Путь введения. Доза Route of administration. Dosage regimen	Рекомендуемый возраст Recommended age	Источник Reference
Конъюгированные вакцины Conjugated vaccines	Typbar-TCV®	Bharat Biotech International Ltd., Индия Bharat Biotech International Ltd., India	Раствор для инъекций Solution for injection	1 доза (0,5 мл) содержит 25 мкг очищенного Vi-капсульного полисахарида <i>S. Typhi</i> Ty2, конъюгированного со столбнячным анатоксином 1 dose (0.5 mL) contains 25 µg of purified Vi capsular polysaccharide of <i>S. Typhi</i> Ty2 conjugated to tetanus toxoid	Внутримышечно. 1 доза (0,5 мл). Бустерная доза через 3 года после вакцинации. Профилактика становится эффективной через 2–3 недели после иммунизации A 0.5 mL dose for intramuscular injection. A booster dose may be given after 3 years. Prevention becomes effective in 2–3 weeks after immunisation	От 6 месяцев до 45 лет 6 months–45 years	Сноска ²⁹ Footnote ²⁹
	TYPHIBEV®	Biological E. Limited (BE), Индия Biological E. Limited (BE), India		1 доза (0,5 мл) содержит 25 мкг очищенного Vi-капсульного полисахарида, экспрессируемого <i>Citrobacter freundii</i> sensu lato 3056 и конъюгированного с CRM197 1 dose (0.5 mL) contains 25 µg of purified Vi capsular polysaccharide, expressed by <i>Citrobacter freundii</i> sensu lato 3056 and conjugated to CRM197	Внутримышечно. 1 доза (0,5 мл). Бустерная доза через 3 года после вакцинации. Профилактика становится эффективной через 2–3 недели после иммунизации A 0.5 mL dose for intramuscular injection. A booster dose may be given after 3 years. Prevention becomes effective in 2–3 weeks after immunisation	От 6 месяцев и старше 6 months and older	Сноска ³⁰ Footnote ³⁰
	PediaTyph™	Bio-Med Private Limited, Индия Bio-Med Private Limited, India		1 доза (0,5 мл) содержит 5 мкг очищенного Vi-капсульного полисахарида <i>S. Typhi</i> Ty2, конъюгированного со столбнячным анатоксином 1 dose (0.5 mL) contains 5 µg of purified Vi capsular polysaccharide of <i>S. Typhi</i> Ty2 conjugated to tetanus toxoid	Внутримышечно. 1 доза (0,5 мл). Бустерная доза через 2,5–3 года после вакцинации. Профилактика становится эффективной через 4 недели после иммунизации A 0.5 mL dose for intramuscular injection. A booster dose may be given after 2.5–3 years. Prevention becomes effective in 4 weeks after immunisation	От 3 месяцев и старше 3 months and older	Сноска ³¹ Footnote ³¹
	ZyVac-TCV™	Cadila Healthcare Ltd (Zydus), Индия Cadila Healthcare Ltd (Zydus), India		1 доза (0,5 мл) содержит 25 мкг очищенного Vi-капсульного полисахарида <i>S. Typhi</i> Ty2, конъюгированного со столбнячным анатоксином 1 dose (0.5 mL) contains 25 µg of purified Vi capsular polysaccharide of <i>S. Typhi</i> Ty2 conjugated to tetanus toxoid	Внутримышечно. 1 доза (0,5 мл). Бустерная доза через 3 года после вакцинации. Профилактика становится эффективной через 3 недели после иммунизации A 0.5 mL dose for intramuscular injection. A booster dose may be given after 3 years. Prevention becomes effective in 3 weeks after immunisation	От 6 месяцев до 45 лет 6 months–45 years	Сноска ³² Footnote ³²

²⁹ <https://www.bharatbiotech.com/typhartcv.html>

³⁰ https://www.biologicle.com/pdf/Product_VB_International_Marketing.pdf

³¹ <http://www.biomed.co.in/pedia-typh/>

³² <https://www.slideshare.net/gauravg/zyvac-tcv-the-indian-typhoid-conjugate-vaccine>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Тип вакцины Vaccine type	Торговое наименование Vaccine	Производитель Manufacturer	Форма выпуска Dosage form	Состав (действующее вещество) Composition (active ingredient)	Путь введения. Доза Route of administration. Dosage regimen	Рекомендуемый возраст Recommended age	Источник Reference
Неконтюгированные полисахаридные вакцины Unconjugated polysaccharide vaccines	Typhbar®	Bharat Biotech International Ltd., Индия Bharat Biotech International Ltd., India	Раствор для инъекций Solution for injection	1 доза (0,5 мл) содержит 25 мкг очищенного Vi-капсульного полисахарида <i>S. Typhi</i> Ty2 1 dose (0.5 mL) contains 25 µg of purified Vi capsular polysaccharide of <i>S. Typhi</i> Ty2	Внутримышечно. 1 доза (0,5 мл). Бустерная доза через 3 года после вакцинации. Профилактика становится эффективной через 3 недели после иммунизации A booster dose may be given after 3 years. Prevention becomes effective in 3 weeks after immunisation	От 2 лет 2 years and older	Сноска ³³ Footnote ³³
	Typhim Vi®	Sanofi Pasteur, Inc, Франция Sanofi Pasteur, Inc, France			Внутримышечно. 1 доза (0,5 мл). Бустерная доза через 2 года после вакцинации. Профилактика становится эффективной через 2 недели после иммунизации A booster dose may be given after 2 years. Prevention becomes effective in 2 weeks after immunisation	От 2 лет 2 years and older	Сноска ³⁴ Footnote ³⁴
	Typhex®	GlaxoSmithKline, Великобритания GlaxoSmithKline, the United Kingdom			Внутримышечно. 1 доза (0,5 мл). Бустерная доза через 3 года после вакцинации. Профилактика становится эффективной через 2 недели после иммунизации A booster dose may be given after 3 years. Prevention becomes effective in 2 weeks after immunisation	От 2 лет 2 years and older	Сноска ³⁵ Footnote ³⁵
	Bio Typh™	Bio-Med Private Limited, Индия Bio-Med Private Limited, India			Внутримышечно или подкожно. 1 доза (0,5 мл). Бустерная доза через 3 года после вакцинации. Профилактика становится эффективной через 2-3 недели после иммунизации A booster dose may be given after 3 years. Prevention becomes effective in 2-3 weeks after immunisation	От 2 лет 2 years and older	Сноска ³⁶ Footnote ³⁶

³³ <https://www.bharatbiotech.com/typhbar.html>

³⁴ <https://www.sanofi.us/en/products-and-resources/vaccines>

³⁵ <https://www.gsk.com/en-gb/products/our-vaccines/#q-t>

³⁶ <http://www.biomed.co.in/bio-typh/>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Тип вакцины Vaccine type	Торговое наименование Vaccine	Производитель Manufacturer	Форма выпуска Dosage form	Состав (действующее вещество) Composition (active ingredient)	Путь введения. Доза Route of administration. Dosage regimen	Рекомендуемый возраст Recommended age	Источник Reference
Некониюгированные полисахаридные вакцины Unconjugated polysaccharide vaccines	Shantyrif®	Shanta Biotech, Индия Shanta Biotech, India	Раствор для инъекций Solution for injection	1 доза (0,5 мл) содержит 25 мкг очищенного Vi-капсульного полисахарида S. Typhi Ty2 1 dose (0.5 mL) contains 25 µg of purified Vi capsular polysaccharide of S. Typhi Ty2	Внутримышечно. 1 доза (0,5 мл). Бустерная доза через 3 года после вакцинации. A 0.5 mL dose for intramuscular injection. A booster dose may be given after 3 years	От 2 лет 2 years and older	Сноска ³⁷ Footnote ³⁷
	Hepatyrif®	GlaxoSmithKline, Великобритания GlaxoSmithKline, the United Kingdom	Суспензия для инъекций Suspension for injection	1 доза (1,0 мл) содержит 1440 ЕД вирусного антигена инактивированного вируса гепатита А (штамм HM175) и 25 мкг Vi-капсульного полисахарида S. Typhi Ty2 1 dose (1.0 mL) contains Hepatitis A virus (HM175 strain) 1440 units and Vi polysaccharide of S. Typhi Ty2 25µg	Внутримышечно. 1 доза (1,0 мл). Бустерная доза через 3 года после вакцинации. Профилактика становится эффективной через 2 недели после иммунизации. A 1.0 mL dose for intramuscular injection. A booster dose may be given after 3 years. Prevention becomes effective in 2 weeks after immunisation	От 15 лет 15 years and older	Сноска ³⁸ Footnote ³⁸
	VIVAXIM®	Sanofi Pasteur, Inc, Франция Sanofi Pasteur, Inc, France	Суспензия + Раствор для инъекций Suspension + solution for injection	Суспензию (0,5 мл) и раствор (0,5 мл) смешивают непосредственно перед иммунизацией. Раствор содержит 25 мкг очищенного Vi-капсульного полисахарида S. Typhi Ty2 Суспензия содержит 160 ЕД вирусного антигена инактивированного вируса гепатита А The suspension (0.5 mL) and the solution (0.5 mL) are mixed immediately prior to injection. The solution contains 25 µg of purified Vi capsular polysaccharide of S. Typhi Ty2. The suspension contains 160 units of Hepatitis A virus antigen	Внутримышечно. 1 доза (1,0 мл). Бустерная доза через 3 года после вакцинации. Профилактика становится эффективной через 2 недели после иммунизации. A 1.0 mL dose for intramuscular injection. A booster dose may be given after 3 years. Prevention becomes effective in 2 weeks after immunisation	От 16 лет 16 years and older	Сноска ³⁹ Footnote ³⁹

³⁷ <http://fisid.in/indian-vaccines-industry-addressing-human-health-challenges>

³⁸ <https://www.gsk.com/en-gb/products/our-vaccines/#e-h>

³⁹ <https://www.sanofi.ca/en/products-and-resources/vaccines>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Тип вакцины Vaccine type	Торговое наименование Vaccine	Производитель Manufacturer	Форма выпуска Dosage form	Состав (действующее вещество) Composition (active ingredient)	Путь введения. Доза Route of administration. Dosage regimen	Рекомендуемый возраст Recommended age	Источник Reference
Неконъюгированные полисахаридные вакцины Unconjugated polysaccharide vaccines	ВИАНВАК® VIANVAC®	ООО «Гритвак», Россия Gritvak, Russia	Раствор для инъекций Solution for injection	1 доза (0,5 мл) содержит 25 мкг очищенного Vi-капсульного полисахарида S. Typhi Ty2 No. 4446 1 dose (0.5 mL) contains 25 µg of purified Vi capsular polysaccharide of S. Typhi Ty2 No. 4446	Подкожно. 1 доза (0,5 мл). Бустерная доза через 3 года после вакцинации. Профилактика становится эффективной через 1–2 недели после иммунизации. A 0.5 mL dose for subcutaneous injection. A booster dose may be given after 3 years. Prevention becomes effective in 1–2 weeks after immunisation	От 3 лет 3 years and older	Сноска ⁴⁰ Footnote ⁴⁰
Живые аттенуированные вакцины Live attenuated vaccines	Vivotif®	Emergent Biosolutions, США Emergent Biosolutions, USA	Капсулы Capsules	1 капсула содержит S. Typhi Ty21a, жизнеспособные – (2–10)×10 ⁹ КОЕ; S. Typhi Ty21a, нежизнеспособные – (5–50)×10 ⁹ бактериальных клеток 1 capsule contains Viable S. Typhi Ty21a: (2–10)×10 ⁹ CFU; Non-viable S. Typhi Ty21a: (5–50)×10 ⁹ bacterial cells	Орально. По 1 капсуле на 1, 3, 5 и 7 день иммунизации. Профилактика становится эффективной через 1 неделю после завершения процесса иммунизации. Эффективность сохраняется в течение 5 лет после иммунизации Oral administration. One capsule is to be taken on days 1, 3, 5, and 7. Prevention becomes effective in 1 week after the completion of the immunisation schedule. Efficacy has been shown to persist for at least 5 years after immunisation	От 6 лет 6 years and older	Сноска ⁴¹ Footnote ⁴¹

⁴⁰ https://www.vidal.ru/drugs/vianvac__30172

⁴¹ <https://vivotif.com>

Ряд конъюгированных вакцинных препаратов находятся на различных стадиях разработки. Препарат Vi-rEPA, в состав которого входит Vi-полисахарид *S. Typhi*, конъюгированный с рекомбинантным экзопротеином A *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) (Ланчжоусский институт биологической продукции, Китай), успешно прошел рандомизированные клинические исследования [37, 38], проводится работа по его лицензированию [39]. Ведется исследование нескольких вакцинных препаратов, представляющих собой конъюгаты Vi-полисахарида *S. Typhi* штамм C6524 с дифтерийным токсином, технология получения которых была разработана Международным институтом вакцин при ООН в Южной Корее (IVI), а затем передана трем производственным компаниям: SK Bioscience, Корея (проведена II фаза клинических исследований [40], III фаза исследований — ноябрь 2019 г. — январь 2021 г.)⁴², Incepta Vaccines, Бангладеш (завершены доклинические исследования) [27], PT Bio Pharma, Индонезия (период проведения III фазы клинических исследований март 2020 г. — январь 2021 г.)⁴³.

Группой ученых Гарвардской медицинской школы на основе технологии PCMV (Protein Capsular Matrix Vaccine) синтезирована Vi-полисахаридная вакцина Typhax, в которой очищенный Vi-полисахаридный антиген заключен в глутаральдегид-катализированной матрице из перекрестно связанных α -поли-L-лизина (α -PLL) и белка CRM197. Вакцина показала безопасность и иммуногенность в доклинических исследованиях на мышах, кроликах и приматах [41], успешно завершена первая фаза клинических исследований [42].

В начале 2000-х гг. стали появляться сообщения о вирулентных штаммах *S. Typhi*, не содержащих Vi-антиген [43–45], при этом в период с 2000 по 2010 г. в эндемичных регионах была отмечена тенденция к постепенному вытеснению Vi-позитивных штаммов [25]. Ведутся разработки конъюгированного вакцинного препарата против Vi-негативных штаммов *S. Typhi*, основанного на O-специфичных полисахаридах (OSPs) [25].

Предприняты попытки создания вакцинных препаратов против возбудителей *S. Typhi* и *S. Paratyphi* A: комбинированной бивалентной вакцины на основе везикул внешних мембран (outer membrane vesicles, OMV) *S. Typhi* и *S. Paratyphi* A [46]; препарата на основе рекомбинантного белка STIV (rSTIV) внешней мембраны *S. Typhi* [47]; кандидата на основе рекомбинантного аттенуированного штамма *S. Paratyphi* A CMCC 50093, содержащего интегрированный в хромосому *viaB* locus с 10 генами, ответственными за биосинтез Vi-полисахарида [48].

Новые перспективы в поиске вакцинных кандидатов открывает обратная вакцинология (reverse vaccinology) — современный подход, включающий скрининг последовательностей генома, кодирующих белки патогена, и выбор белков для создания вакцинных препаратов с помощью вычислительных методов [49–51].

Данный подход был успешно применен E. Esmailnia с соавт. [52] с целью выявления поверхностных белков, обладающих наиболее иммуногенными, стабильными и защитными свойствами при анализе протеома *S. Typhi* Ty2. Перспективным кандидатом для разработки вакцинного препарата был выбран белок, кодируемый геном *steD*. Иммунизация мышей очищенным рекомбинантным белком и последующее введение летальной дозы *S. Typhi* показали высокие белок-специфичные титры антител у иммунизированных животных, а также 70% выживаемость после введения летальной дозы *S. Typhi* [52].

Заключение

Этиология брюшного тифа была установлена более 100 лет назад, однако это заболевание, характеризующееся преимущественно среднетяжелым и тяжелым, а в ряде случаев — рецидивирующим течением, по-прежнему представляет серьезную угрозу мировому здравоохранению.

В условиях, когда меры неспецифической профилактики (соблюдение санитарно-гигиенических норм, контроль за качеством питьевой воды и прочее) являются недоступными, а антимикробная терапия — неэффективной ввиду прогрессирующей антибиотикорезистентности возбудителя, вакцинация как средство превентивной медицины может служить наиболее предпочтительным инструментом в борьбе с инфекционными заболеваниями. Анализ современного состояния и тенденций развития вакцинопрофилактики брюшного тифа показал значительный прогресс в создании вакцин для различных групп населения, в том числе и для детей младше двух лет. Многие из разработанных вакцинных препаратов успешно прошли все стадии лицензирования и доступны на мировом рынке. Ввиду высокой эпидемиологической значимости заболевания повышение эффективности ранее разработанных вакцин, а также создание новых, комбинированных вакцинных препаратов против брюшного тифа остаются актуальными направлениями современной вакцинологии.

Вклад авторов. М. В. Абрамцева — разработка дизайна обзорно-аналитического исследования; сбор, анализ и систематизация данных литературы; формулировка выводов; оформление и редактирование рукописи; утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Е. О. Неманова — сбор, анализ и систематизация данных литературы; формулировка выводов; оформление и редактирование рукописи; Н. С. Алехина — сбор, анализ и систематизация данных литературы; оформление рукописи; Т. И. Немировская — утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Authors' contributions. Marina V. Abramtseva—elaboration of the study concept and design; data collection, analysis and systematisation; formulation of conclusions; formatting and editing of the text; approval of the final version of the paper for publication; Ekaterina O. Nemanova—data collection, analysis and systematisation; formulation of conclusions; formatting and editing of the text; Natalia S. Alekhina—data collection, analysis and systematisation; formatting of the text; Tatyana I. Nemirovskaya—approval of the final version 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. 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.

⁴² International Vaccine Institute. Immune non-inferiority and safety of a Vi-DT typhoid conjugate vaccine. 2019. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03933098>

⁴³ PT Bio Farma. Immunogenicity and safety of Vi-DT (Diphtheria Toxoid) typhoid conjugate vaccine (Phase III). 2019. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04051268>

Литература/References

- Liu Z, Lao J, Zhang Y, Liu Y, Zhang J, Wang H, Jiang B. Association between floods and typhoid fever in Yongzhou, China: effects and vulnerable groups. *Environ Res*. 2018;167:718–24. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.08.030>
- Porter CK, Olson S, Hall A, Riddle MS. Travelers' diarrhea: an update on the incidence, etiology, and risk in military deployments and similar travel populations. *Military Med*. 2017;182(Suppl2):4–10. <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-17-00064>
- Barnett R. Typhoid fever. *Lancet*. 2016;388(10059):2467. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32178-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32178-X)
- Stanaway J, Reiner R, Blacker BF, Goldberg EM, Khalil I, Troeger CE, et al. (GBD 2017 Typhoid and Paratyphoid Collaborators). The global burden of typhoid and paratyphoid fevers: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(4):369–81. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30685-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30685-6)
- Wain J, Hendriksen RS, Mikoleit ML, Keddy KH, Ochial RL. Typhoid fever. *Lancet*. 2015;385(9973):1136–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62708-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62708-7)
- Antillón M, Warren JL, Crawford FW, Weinberg DM, Kürüm E., Pak GD, et al. The burden of typhoid fever in low- and middle-income countries: a meta-regression approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2):e0005376. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005376>
- Marchello CS, Hong CY, Crump JA. Global typhoid fever incidence: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2019;68(Suppl_2):S105–16. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1094>
- Ратников НН, Акимкин ВГ, Азаров ИИ, Коваленко АН. Актуальность проблемы иммунопрофилактики брюшного тифа на опыте применения вакцины Вианвак в эндемичном по брюшному тифу регионе. *Медицинский алфавит*. 2016;2(32):24–8. [Ratnikov NN, Akimkin VG, Azarov II, Kovalenko AN. Relevance of typhoid fever immunoprophylaxis on experience of Vianvac vaccine in endemic typhoid region. *Meditsinskii alfavit = Medical Alphabet*. 2016; 2(32):24–8 (In Russ.)]
- Коваленко АН, Ратников НН, Бореико ЛО. Опыт применения брюшнотифозной вакцины Вианвак® в организованном коллективе постоянного пребывания на эндемичной по брюшному тифу территории. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2018;(S1):152–8. [Kovalenko AN, Ratnikov NN, Boreyko LO. Experience of use of typhoid vaccine Vianvac® in organized collective of constant stay in the territory, endemic on a typhoid. *Vestnik Rossiiskoi voenno-meditsinskoi akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2018;(S1):152–8 (In Russ.)]
- Коваленко АН, Иванов АМ, Одинаев НС, Рахманов МИ, Мурачев АА. Брюшной тиф: опыт последнего десятилетия. *Журнал инфектологии*. 2009;1(2/3):69–72. [Kovalenko AN, Ivanov AM, Odinaev NS, Rachmanov MI, Murachev AA. Typhoid fever: the experience of last decade. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*. 2009;1(2/3):69–72 (In Russ.)] <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2009-1-2-3-69-72>
- Plotkin SL, Plotkin SA. General aspects of vaccination. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines*. 6th ed. Saunders; 2013. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-49973-2>
- Hejfec LB, Salmin LV, Lejtman MZ, Kuz'minova ML, Vasil'eva AV, Levina LA, et al. A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the USSR. *Bull World Health Organ*. 1966;34(3):321–39.
- Лебедев СМ. К 100-летию введения в обязательном порядке профилактических прививок против брюшного тифа в войсках. *Военная медицина*. 2015;(4):152–4. [Lebedev SM. To 100 anniversary of introduction without fail preventive typhoid vaccinations in troops. *Voennaya meditsina = Military Medicine*. 2015;(4):152–4 (In Russ.)]
- Степанов НН, Комиссаров НВ, Лошаков ОД, Савельев АП, Мисников ОП, Шевченко АИ. Актуальные вопросы вакцинопрофилактики опасных инфекционных болезней в Вооруженных Силах Российской Федерации. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2018;(S1):191–5. [Stepanov NN, Komissarov NV, Loshakov OD, Savelyev AP, Misnikov OP, Shevchenko AI. Topical questions of vaccinal prevention of dangerous infectious diseases in Russian Federation Armed Forces. *Vestnik Rossiiskoi voenno-meditsinskoi akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2018;(S1):191–5 (In Russ.)]
- Stuhl L, Benda R, Frey N. A controlled field trial of the effectiveness of acetone-dried and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia. *Bull World Health Organ*. 1964;30(5):623–30.
- Wong KH, Feeley JC, Northrup RS, Forlines ME. Vi antigen from *Salmonella typhosa* and immunity against typhoid fever I. Isolation and immunologic properties in animals. *Infect Immun*. 1974;9(2):348–53. <https://doi.org/10.1128/IAI.9.2.348-353.1974>
- Levine MM, Ferreccio C, Black RE, Tacket CO, Germanier R. Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev Infect Dis*. 1989;11(Suppl3):S552–67. https://doi.org/10.1093/clinfids/11.supplement_3.S552
- Germanier R, Fiirer E. Isolation and characterization of Gal/E mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate for a live, oral typhoid vaccine. *J Infect Dis*. 1975;131(5):553–58. <https://doi.org/10.1093/infdis/131.5.553>
- Levine MM, Black RE, Ferreccio C, Germanier R. Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet*. 1987;329(8541):1049–52. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)90480-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)90480-6)
- Levine MM, Ferreccio C, Abrego P, Martin OS, Ortiz E, Cryz S. Duration of efficacy of Ty21a, attenuated *Salmonella typhi* live oral vaccine. *Vaccine*. 1999;17(Suppl_2):S22–7. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00231-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00231-5)
- Landy M, Gaines S, Seal JR, Whiteside JE. Antibody responses of man to three types of antityphoid immunizing agents: heat-phenol fluid vaccine, acetone-dehydrated vaccine, and isolated Vi and O antigens. *Am J Public Health*. 1954;44(12):1572–79. <https://doi.org/10.2105/ajph.44.12.1572>
- Mitra M, Shah N, Ghosh A, Chatterjee S, Kaur I, Bhat-tacharya N, Basu S. Efficacy and safety of vi-tetanus toxoid conjugated typhoid vaccine (PedaTyph™) in Indian children: school based cluster randomized study. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(4):939–45. <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1117715>
- Mohan VK, Varanasi V, Singh A, Pasetti MF, Levine MM, Venkatesan R, Ella KM. Safety and immunogenicity of a Vi polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine (Typhar-TCV) in healthy infants, children, and adults in typhoid endemic areas: a multicenter, 2-cohort, open-label, double-blind, randomized controlled phase 3 study. *Clin Infect Dis*. 2015;61(3):393–402. <https://doi.org/10.1093/cid/civ295>
- Poolman J, Borrow R. Hyporesponsiveness and its clinical implications after vaccination with polysaccharide or glyco-conjugate vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(3):307–22. <https://doi.org/10.1586/erv.11.8>
- Haque A. Significance of Vi negative isolates of *Salmonella Enterica* serovar Typhi. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1052:9–18. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7572-8_2
- Micoli F, Adamo R, Costantino P. Protein carriers for glycoconjugate vaccines: history, selection criteria, characterization and new trends. *Molecules*. 2018;23(6):1451. <https://doi.org/10.3390/molecules23061451>
- Syed AK, Saluja T, Cho H, Hsiao A, Shaikh H, Wartel TA, et al. Review on the recent advances on typhoid vaccine development and challenges ahead. *Clin Infect Dis*. 2020;71(Suppl2):S141–50. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa504>
- Jin C, Gibani MM, Moore M, Juel HB, Jones E, Meiring J, et al. Efficacy and immunogenicity of a Vi-tetanus toxoid conjugate

- vaccine in the prevention of typhoid fever using a controlled human infection model of *Salmonella Typhi*: a randomised controlled, phase 2b trial. *Lancet*. 2017;390(10111):2472–80. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32149-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32149-9)
29. Voysey M, Pollard AJ. Seroefficacy of Vi-polysaccharide tetanus toxoid typhoid conjugate vaccine (Typhar TCV). *Clin Infect Dis*. 2018;67(1):18–24. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1145>
 30. Milligan R, Paul M, Richardson M, Neuberger A. Vaccines for preventing typhoid fever. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;(5):CD001261. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001261.pub4>
 31. Lo NC, Gupta R, Stanaway JD, Garrett DO, Bogoch II, Luby SP, Andrews JR. Comparison of strategies and incidence thresholds for Vi conjugate vaccines against typhoid fever: a cost-effectiveness modeling study. *J Infect Dis*. 2018;218(Suppl4):S232–42. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix598>
 32. Bilcke J, Antillón M, Pieters Z, Kuylen E, Abboud L, Neuzil KM, et al. Cost-effectiveness of routine and campaign use of typhoid Vi-conjugate vaccine in Gavi-eligible countries: a modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(7):728–39. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30804-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30804-1)
 33. Ankudinov IV, Golovina ME, L'vov VL, Vaneeva NP, Verner IC, Yolkina SI, Aparin PG. Chromatographically purified Vi-capsular polysaccharide antigen for vaccination against Typhoid fever. *Med J Indones*. 1998;7(Suppl1):240–6. <https://doi.org/10.13181/mji.v7iSuppl.1125>
 34. Chinnasami B, Sadasivam K, Vivekanandhan A, Arunachalam P, Pasupathy S. A study on longevity of immune response after vaccination with *Salmonella Typhi* Vi conjugate vaccine (Pedatyph™) in children. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(5):SC01–3. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13302.5903>
 35. Vashishtha VM, Kalra A. The need & the issues related to new-generation typhoid conjugate vaccines in India. *Indian J Med Res*. 2020;151(1):22–34. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1890_17
 36. Kundu R, Kandulna AK, Nayak U, Jangid SK, Babu TR, Vukkala R, et al. Immunogenicity and safety of typhoid conjugate vaccine in healthy indian subjects: a randomized, active-controlled, comparative clinical trial. *Indian Pediatr*. 2020;57(7):625–30. <https://doi.org/10.1007/s13312-020-1890-y>
 37. Thiem VD, Lin F-YC, Canh DG, Son NH, Anh DD, Mao ND, et al. The Vi conjugate typhoid vaccine is safe, elicits protective levels of IgG anti-Vi, and is compatible with routine infant vaccines. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(5):730–5. <https://doi.org/10.1128/CI.00532-10>
 38. Szu SC. Development of Vi conjugate — a new generation of typhoid vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(11):1273–86. <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.845529>
 39. Sahastrabudhe S, Saluja T. Overview of the typhoid conjugate vaccine pipeline: current status and future plans. *Clin Infect Dis*. 2019;68(Suppl_1):S22–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy884>
 40. Capeding MR, Alberto E, Sil A, Saluja T, Teshome S, Kim DR, et al. Immunogenicity, safety and reactogenicity of a Phase II trial of Vi-DT typhoid conjugate vaccine in healthy Filipino infants and toddlers: a preliminary report. *Vaccine*. 2020;38(28):4476–83. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.074>
 41. Griffin TJ, Thanawastien A, Cartee RT, Mekalanos JJ, Killeen KP. *In vitro* characterization and preclinical immunogenicity of Typhax, a typhoid fever protein capsular matrix vaccine candidate. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(6):1310–16. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1599674>
 42. Cartee RT, Thanawastien A, Griffin IV TJ, Mekalanos JJ, Bart S, Killeen KP. A phase 1 randomized safety, reactogenicity, and immunogenicity study of Typhax: a novel protein capsular matrix vaccine candidate for the prevention of typhoid fever. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(1):e0007912. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007912>
 43. Saha MR, Ramamurthy T, Dutta P, Mitra U. Emergence of *Salmonella typhi* Vi antigen-negative strains in an epidemic of multidrug-resistant typhoid fever cases in Calcutta, India. *Natl Med J India*. 2000;13(3):164.
 44. Mehta G, Arya SC. Capsular Vi polysaccharide antigen in *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):1127–8. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.2.1127-1128.2002>
 45. Baker S, Sarwar Y, Aziz H, Haque A, Ali A, Dougan G, et al. Detection of Vi-negative *Salmonella enterica* serovar Typhi in the peripheral blood of patients with typhoid fever in the Faisalabad region of Pakistan. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4418–25. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4418-4425.2005>
 46. Howlader DR, Koley H, Sinha R, Maiti S, Bhaumik U, Mukherjee P, Dutta S. Development of a novel *S. Typhi* and *Paratyphi A* outer membrane vesicles based bivalent vaccine against enteric fever. *PLoS One*. 2018;13(9):e0203631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203631>
 47. Das S, Chowdhury R, Pal A, Okamoto K, Das S. *Salmonella Typhi* outer membrane protein STIV is a potential candidate for vaccine development against typhoid and paratyphoid fever. *Immunobiology*. 2019;224(3):371–82. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.02.011>
 48. Xiong K, Zhu C, Chen Z, Zheng C, Tan Y, Rao X, Cong Y. Vi Capsular polysaccharide produced by recombinant *Salmonella enterica* serovar *Paratyphi A* confers immunoprotection against infection by *Salmonella enterica* serovar *Typhi*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:135. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00135>
 49. Jaiswal AK, Tiwari S, Jamal SB, Barh D, Azevedo V, Soares SC. An *in silico* identification of common putative vaccine candidates against *Treponema pallidum*: a reverse vaccinology and subtractive genomics based approach. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2):402. <https://doi.org/10.3390/ijms18020402>
 50. Talukdar S, Bayan U, Saikia KR. In silico identification of vaccine candidates against *Klebsiella oxytoca*. *Comput Biol Chem*. 2017;69:48–54. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2017.05.003>
 51. Muruato LA, Tapia D, Hatcher CL, Kalita M, Brett PJ, Gregory AE, et al. Use of reverse vaccinology in the design and construction of nanoglycoconjugate vaccines against *Burkholderia pseudomallei*. *Clin Vaccine Immunol*. 2017;24(11):e00206–17. <https://doi.org/10.1128/CI.00206-17>
 52. Esmailnia E, Amani J, Gargari SLM. Identification of novel vaccine candidate against *Salmonella enterica* serovar *Typhi* by reverse vaccinology method and evaluation of its immunization. *Genomics*. 2020;112(5):3374–81. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.06.022>

Об авторах / Authors

Абрамцева Марина Витальевна. Marina V. Abramtseva. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0714-1303>

Неманова Екатерина Олеговна. Ekaterina O. Nemanova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2604-6379>

Алехина Наталья Сергеевна. Natalia S. Alekhina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1583-4887>

Немировская Татьяна Ивановна, канд. мед. наук. Tatyana I. Nemirovskaya, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>

Поступила 07.10.2020

После доработки 16.03.2021

Принята к публикации 10.06.2021

Received 7 October 2020

Revised 16 March 2021

Accepted 10 June 2021

Лекарственные препараты фактора VIII, актуальные вопросы разработки, клинического исследования и применения (часть 2)

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

Постоянная заместительная терапия препаратами свертывания крови при гемофилии А может привести к серьезным осложнениям, одной из причин которых является развитие «нежелательного» иммунного ответа на лекарственный препарат фактора свертывания крови VIII (FVIII), что приводит к потере эффективности проводимой терапии. Цель работы — систематизация и обобщение сведений о проявлении нежелательной иммуногенности плазменных и рекомбинантных лекарственных препаратов FVIII, формировании иммунологической толерантности, о современных подходах к разработке программы проведения клинических исследований этих препаратов на основе данных литературы, а также международных и российских руководств, включая обновленный документ Европейского агентства по лекарственным средствам. В обзоре представлены данные об оценке в ходе клинических исследований препаратов FVIII фармакокинетики, эффективности и безопасности, в том числе проявлений нежелательной иммуногенности. Особое внимание уделено рассмотрению молекулярных механизмов взаимодействия ингибиторов и FVIII. Проанализированы основные факторы (генетические особенности, состояние иммунной системы пациента, режим дозирования препарата и др.), влияющие на частоту и выраженность иммунного ответа на препарат. Изложены подходы к дизайну клинических исследований, в том числе касающиеся отбора пациентов и выбора показателей для исследований. Обоснована необходимость пострегистрационных исследований с целью сбора дополнительных клинических данных, касающихся как эффективности, так и безопасности рутинного применения препарата, включая дополнительную оценку иммуногенности и других нежелательных реакций. Сделан вывод о том, что успешность внедрения в клиническую практику качественных лекарственных препаратов FVIII обеспечивается гармонизацией требований, изложенных в отечественных и международных нормативных документах.

Ключевые слова: гемофилия А; препараты фактора VIII (препараты плазмы крови и рекомбинантные); проблемы безопасности, связанные с иммуногенностью; ингибиторы; клинические исследования

Для цитирования: Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Бондарев ВП, Мосягин ВД, Меркулов ВА. Лекарственные препараты фактора VIII, актуальные вопросы разработки, клинического исследования и применения (часть 2). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(2):97–107. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-97-107>

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

Factor VIII products: key aspects of development, clinical research and use (part 2)

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

Continuous replacement therapy with clotting factor products can lead to serious complications in haemophilia A patients. One of potential reasons of such complications is an undesirable immune response to a blood clotting factor VIII (FVIII) product, which undermines the treatment effectiveness. The aim of the study was to systematise and summarise data on undesirable immunogenicity of plasma-derived and recombinant FVIII products, formation of immunological tolerance, and modern approaches to the development of clinical trial programmes for such products. The analysis was based on scientific literature, as well as Russian and international guidelines, including the updated document of the European Medicines Agency. The paper presents clinical trial data on pharmacokinetics, efficacy, and safety of FVIII products, including data on manifestations of unwanted immunogenicity. It highlights molecular mechanisms of interaction between inhibitors and FVIII, and analyses the main factors (genetic characteristics, immune status of patients, dosage regimen, etc.) affecting the frequency and intensity of the immune response to the product. The authors summarised approaches to the clinical trial design, including selection of patients and studied parameters. They substantiate the need for post-authorisation studies to collect additional clinical data on both efficacy and safety of the routine use of the product, including additional assessment of immunogenicity and other adverse reactions. It is concluded that the successful use of high-quality FVIII products ensures by harmonisation of requirements of Russian and international regulatory documents.

Key words: haemophilia A; factor VIII products (plasma-derived and recombinant); immunogenicity-related safety issues; inhibitors; clinical trials

For citation: Avdeeva ZI, Soldatov AA, Bondarev VP, Mosyagin VD, Merkulov VA. Factor VIII products: key aspects of development, clinical research and use (part 2). *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(2):97–107. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-97-107>

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

Окончание. Начало статьи в журнале «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» 2021;21(1):39–49.

К серьезным тяжело протекающим орфанным заболеваниям относится гемофилия А, которая обусловлена дефектом гена фактора свертывания крови VIII (FVIII). FVIII является неэнзиматическим кофактором активированного FIX (FIXa), который при протеолитической активации образует с FIXa комплекс за счет нековалентной связи; указанный комплекс связывает и активирует FX. После активации FX выделяется из комплекса и запускает реакцию превращения протромбина в тромбин, который превращает фибриноген в основной компонент тромба — фибрин¹.

Согласно современным представлениям приблизительно у каждого второго пациента заболевание вызвано инверсиями в интроне 22 гена FVIII, в 5% случаев заболевание обусловлено инверсиями в интроне 1. Указанные дефекты гена FVIII сопровождаются нарушением синтеза фактора коагуляции или полным ее отсутствием, что и определяет сроки и степень выраженности клинических проявлений заболевания. Регулярно проводимая заместительная терапия препаратами FVIII (плазменными или рекомбинантными) позволяет обеспечить эффективность лечения и снизить риск осложнений, связанных с кровотечениями и последующим развитием артропатии и других последствий кровотечения. Поскольку источником получения плазменных препаратов FVIII является кровь доноров, объем которой ограничен, проводятся разработки новых биотехнологических препаратов и совершенствование технологии производства ранее утвержденных плазменных препаратов. Проводится разработка «нефакторной» терапии, восстанавливающей эффективность гемостатического баланса путем вмешательства в процесс коагуляции при гемофилии за счет использования препаратов, обеспечивающих прокоагулянтный профилактический эффект без замещения отсутствующего фактора свертывания крови.

Вопросы этиологии и патогенеза гемофилии освещены в ряде отечественных² и зарубежных³ руководств, а также научных публикациях [1–9].

В нашей предыдущей статье [10] приведены сведения о лекарственных препаратах факторов свертывания крови (плазменных и рекомбинантных), используемых в качестве заместительной терапии при указанной патологии. Приведена информация о перспективных разработках новых лекарственных препаратов, базирующихся на современных достижениях биотехнологии.

Следует отметить, что использование препаратов белковой природы в качестве заместительной терапии часто сопровождается высоким риском развития серьезных побочных реакций, в частности связанных с формированием иммунного

ответа на лекарственный препарат. Актуальными остаются вопросы, касающиеся путей снижения рисков проявления побочных эффектов при проведении терапии, изучения современных подходов для снижения иммуногенного потенциала препаратов, подходов к выбору эффективной и безопасной терапии, разработки оптимального дизайна при проведении клинических исследований (КИ).

Цель работы — систематизация и обобщение сведений о проявлении нежелательной иммуногенности плазменных и рекомбинантных лекарственных препаратов FVIII, формировании иммунологической толерантности, о современных подходах к разработке программы проведения клинических исследований этих препаратов на основе данных литературы, а также международных и российских руководств, включая обновленный документ Европейского агентства по лекарственным средствам.

Проявления «нежелательной» иммуногенности лекарственных препаратов FVIII

Биологические лекарственные препараты (БЛП) для лечения хронических заболеваний применяются у пациентов в течение длительного времени. Поскольку действующим веществом БЛП являются белки или гликопротеины, длительное их применение часто сопровождается формированием специфических антител (АТ) к препарату, что является проявлением их «нежелательной» иммуногенности. Формирование АТ, направленных против FVIII, так называемых ингибиторов, является наиболее тяжелым осложнением при лечении пациентов с гемофилией А [11–14].

Ингибиторы частично или полностью инактивируют FVIII, что приводит к неэффективности дальнейшей заместительной терапии, и повышают риск развития кровотечений на фоне профилактического введения препарата. Формирование ингибиторов провоцирует также развитие аллергических или анафилактических реакций. Развитие тяжелых аллергических реакций и анафилаксии прогнозируется приблизительно у 50% пациентов с наличием ингибиторов [12].

Частота обнаружения специфических АТ к факторам свертывания крови, индуцированных введением препаратов, составляет 10–15%, при тяжелой форме гемофилии А ингибиторы определяются приблизительно у 20–30% пациентов [11].

Вопросы, касающиеся механизмов формирования ингибиторов и стратегии лечения пациентов, во многом остаются нерешенными. Особенно важен вопрос выбора стратегии терапии ранее нелеченных пациентов (РНП) с тяжелой формой гемофилии, а также терапии пациентов с наличием ингибиторов.

¹ Воробьев АИ, Андреев ЮН, Баркаган ЗС, Буланов АЮ. Руководство по гематологии. 3-е изд. Т. 3. М.: Ньюдиамед; 2005.

² 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.

³ Srivastava A, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*. 2013;19(1):e1–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x>

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

Rayment R, Chalmers E, Forsyth K, Gooding R, Kelly AM, Shapiro S, et al. Guidelines on the use of prophylactic factor replacement for children and adults with Haemophilia A and B. *Br J Haematol*. 2020;190:684–95. <https://doi.org/10.1111/bjh.16704>

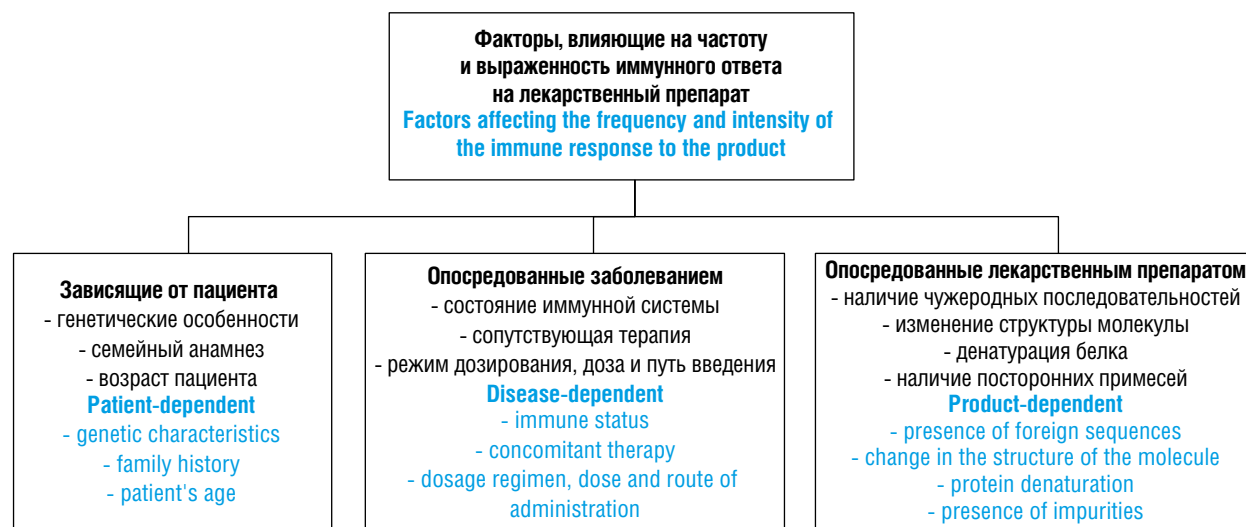


Рис. 1. Факторы, влияющие на частоту и выраженность иммунного ответа на лекарственный препарат.
Fig. 1. Factors affecting the frequency and intensity of the immune response to the product.

Согласно имеющимся данным основной причиной развития «нежелательного» иммунного ответа и формирования ингибиторов является многофакторность взаимосвязанных рисков, определяющих развитие иммунного ответа на БЛП, таких как генетические (неизменяемые) и негенетические (до некоторой степени изменяемые) факторы риска. Среди основных факторов риска, влияющих на частоту и выраженность иммунного ответа, выделяют факторы, зависящие от пациента, а также опосредованные заболеванием и свойствами БЛП [15]. На рисунке 1 приведены основные факторы риска проявления «нежелательной» иммуногенности БЛП. Мутацию гена FVIII считают основным фактором риска образования ингибиторов, при этом степень выраженности молекулярного дефекта гена определяет большую или меньшую степень риска формирования нежелательного иммунного ответа [16, 17].

С повышенным риском развития ингибиторов также связывают выявляемые полиморфизмы в генах регуляторных молекулярных структур, участвующих в иммунном ответе. В частности, это относится к изменчивости в промоторных областях генов, кодирующих интерлейкин-10 (IL-10), фактор некроза опухоли альфа (TNFα) [18, 19] и CTLA-4 (молекулы, участвующей в подавлении костимулирующего взаимодействия между CD80/CD86 на антигенпрезентирующих клетках и CD28 на активированных Т-клетках) [20].

Помимо генетических факторов выделяют переменные факторы риска формирования ингибиторов, которые включают: возраст при первом назначении препарата, интенсивность раннего лечения, выбор препарата, наличие воспаления. Установлено, что раннее интенсивное лечение повышает риск образования ингибиторов [21–23].

Развившееся воспаление, связанное с сильными кровотечениями и (или) хирургическим вмешательством, может давать так называемые сигналы иммунологической опасности, которые опосредуют и объясняют влияние интенсивности лечения на формирование ингибиторов [24].

В связи с этим современные стратегии лечения пациентов с гемофилией сосредоточены на предотвращении других иммунных стимулов, таких как сроки планового хирургического вмешательства или иммунизация, которые не должны проводиться в непосредственной временной близости от введения препарата [25].

Известно, что образование ингибиторов очень часто наблюдается у РНП с тяжелой формой гемофилии А, при этом в большинстве случаев они формируются в пределах первых 50 дней введения препарата (50 ДВ). При этом приблизительно у 1/3 из них АТ исчезают на фоне продолжающегося лечения тем же препаратом. Согласно современным представлениям, в случае, когда ингибиторы формируются у РНП, основными причинами развития ингибиторов являются факторы, связанные с пациентами (определенные типы мутаций в гене FVIII, семейный анамнез на наличие ингибиторов (генетическая предрасположенность) и интенсивное лечение).

В когортном исследовании S. C. Gouw с соавт. [26] проанализированы факторы риска развития ингибиторов у РНП с тяжелой формой гемофилии, наблюдавшихся в течение 11 лет, получавших интенсивное лечение препаратом FVIII по поводу купирования кровотечений или хирургического вмешательства, и пациентов на профилактическом лечении. Данные получены в течение первых 75 ДВ. Установлено, что интенсивное лечение препаратом FVIII в высоких дозах увеличивает риск формирования ингибиторов, при профилактическом лечении риск развития ингибиторов снижается, особенно у пациентов с мутациями гена, кодирующего продукцию FVIII, низкого риска [26]. Аналогичное заключение о том, что лечение высокими дозами препаратов FVIII и хирургическое вмешательство увеличивают риск развития ингибиторов при гемофилии А, сделано A. S. van Velzen с соавт. [27] на основании результатов проведенного когортного исследования INSIGHT, в котором из 2709 пациентов с гемофилией А были отобраны и проанализированы данные 75 пациентов с ингибиторами.

Вопрос о том, какие препараты FVIII, плазменные или рекомбинантные, более часто вызывают формирование ингибиторов, до настоящего времени дискутируется. В работах некоторых авторов [13, 28, 29] показано, что при использовании рекомбинантных препаратов FVIII наблюдается более частое формирование ингибиторов, чем при применении препаратов, полученных из плазмы крови доноров.

Менее выраженный иммуногенный потенциал плазменных препаратов FVIII, по мнению авторов, объясняется тем, что циркулирующий FVIII тесно связан с фактором Виллебранда (von Willebrand factor, vWF), который выполняет функцию шаперона; за счет данной связи иммуногенность FVIII существенно снижается [29]. Учитывая это, можно ожидать, что замести-

тельная терапия FVIII в комплексе с vWF может с меньшей вероятностью индуцировать образование ингибитора, чем чистый белок FVIII.

Растущая частота встречаемости нейтрализующих антител (ингибиторов) против терапевтического FVIII побудила исследователей к выяснению вопроса о том, связано ли это повышение с более частым введением рекомбинантных препаратов FVIII. Данные многоцентрового исследования RODIN [26], в которых оценивали факторы риска развития ингибитора, связанные с лечением пациентов детского возраста с тяжелой формой гемофилии А, получавших до 75 ДВ препаратов в течение 11-летнего периода, свидетельствуют о том, что и рекомбинантные, и плазменные препараты FVIII создавали аналогичные риски развития ингибитора. Однако ни содержание vWF в препаратах, ни замена одного препарата другим не были связаны со степенью риска развития ингибитора.

В статье J. Oldenburg. с соавт. [30] обобщены современные взгляды и результаты неклинических и клинических исследований иммуногенного потенциала рекомбинантных препаратов FVIII по сравнению с плазменными препаратами (концентратами FVIII). Авторы указывают, что результаты многочисленных исследований представляют косвенные доказательства того, что vWF, присутствующий в плазменных препаратах FVII, играет важную роль в защите экзогенного FVIII как на этапе формирования иммунного ответа при поглощении его антигенпрезентирующими клетками, так и при распознавании его клетками эффекторами иммунного ответа. В частности, указывается, что сформированные АТ к FVIII со специфичностью к домену C2 молекулы фактора проявляют меньшую ингибирующую активность в отношении FVIII, связанного с vWF. Однако вопрос об определенном вкладе присутствующего в циркуляции vWF в снижении риска формирования ингибиторов и в развитии иммунной толерантности остается открытым и все еще обсуждается.

Сформированные анти-FVIII АТ, как правило, относятся к иммуноглобулинам класса G (IgG1 или IgG4) [31, 32]. Отмечается, что анти-FVIII АТ подкласса IgG4 преимущественно выявляются у пациентов с высоким титром ингибиторов, тогда как АТ подкласса IgG1 — независимо от уровня титра специфических АТ [33].

Согласно имеющимся данным, иммунный ответ на FVIII является поликлональным. Существует множество эпитопов на молекуле FVIII, которые распознаются сформированными АТ; как правило, ингибиторы направлены к антигенным структурам, локализованным в доменах A2, C2 и A3–C1 FVIII [34]. АТ, которые связываются с доменами A2 и A3–C1, преимущественно влияют на сложные взаимодействия FVIII с FIXa, тогда как АТ, специфичные к антигенам домена C2, ингибируют связывание FVIII с фосфолипидами [35–38]. Имеются сообщения о том, что анти-C2-доменные АТ подавляют протеолитическое расщепление FVIII тромбином или FXa [39, 40]. Наиболее часто функционально активными нейтрализующими ингибиторами FVIII являются анти-A2 и анти-C2 АТ, которые инактивируют его прокоагулянтную активность [41–44].

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

Сформированные к лекарственному препарату АТ, частично или полностью инактивирующие FVIII, вызывают невосприимчивость пациентов к дальнейшей заместительной терапии и повышают риск развития кровотечений на фоне профилак-

тического введения препарата. Формирование IgE АТ может провоцировать развитие тяжелых аллергических реакций [12].

Пациенты, получающие препараты FVIII, должны находиться под тщательным контролем в отношении формирования ингибиторов (наблюдение за клиническими проявлениями, лабораторное тестирование).

В ряде научных сообщений обсуждаются вопросы, которые связаны с выяснением механизмов формирования ингибиторов при гемофилии, выбором оптимальных подходов к тактике лечения пациентов с целью профилактики развития ингибиторов, а также стратегии индукции иммунной толерантности (ИИТ) при ингибиторной форме гемофилии. Авторы подчеркивают сложность в проведении рандомизированных исследований по ИИТ у больных гемофилией с наличием ингибиторов и анализа результатов, поскольку они зависят от ряда факторов, включающих особенности пациента, схемы лечения, титры ингибиторов, длительность их выявления до начала терапии по ИИТ, режим дозирования лекарственного препарата и др. [45–48].

С целью ИИТ при формировании ингибиторов используют разные подходы, в частности, могут быть использованы как высокие, так и низкие дозы лекарственного препарата; по мнению авторов, однозначного решения данной проблемы до настоящего времени нет [47, 48].

Так, в опубликованной работе С. R. Nay с соавт. [49] проанализированы результаты КИ пациентов с гемофилией А с наличием ингибиторов при использовании режимов введения высоких (200 МЕ/кг/сут) и низких доз (50 МЕ/кг через сут) FVIII. Отмечено, что проведенное лечение было одинаково эффективным (примерно 70%), однако в группе пациентов, принимающих низкие дозы, в период исследования было больше случаев кровотечения [49].

Одним из подходов к выбору терапевтических средств для лечения и профилактики кровотечений у пациентов с ингибиторной формой гемофилии А является использование препаратов, эффект которых обусловлен шунтирующим механизмом действия. С этой целью, например, используют активированный протромбиновый комплекс, который включает несколько факторов: II, IX, X (преимущественно в неактивированной форме), а также активированный FVII (FVIIa). Также указывается на возможность использования рекомбинантного FVIIa с целью купирования или профилактики неконтролируемых кровотечений у пациентов с гемофилией при наличии ингибиторов и в терапии коагулопатий.

Наиболее сложной задачей является выбор препаратов для лечения пациентов с ингибиторами. Эмицизумаб — первое гуманизированное биспецифическое моноклональное антитело (MkAT), предназначенное для замены гемостатической функции активированного FVIII путем связывания активированного FIX и FX для активации FX и продолжения коагуляционного каскада. У большинства пациентов с ингибиторами и без них эмицизумаб снижал ежегодную частоту кровотечений почти до нуля и демонстрировал хороший профиль безопасности. Однако одновременное применение эмицизумаба и концентрата активированного протромбинового комплекса создает высокий риск развития тромботической микроангиопатии и тромбозомболических осложнений у пациентов. В обзоре G. Gelbenegger с соавт. [50] были обобщены опубликованные данные КИ эмицизумаба, а также проанализированы клинические последствия применения эмицизумаба в лечении гемофилии А.

В сообщении отечественных авторов указывается, что в России многие вопросы, связанные с оказанием медицинской

помощи пациентам с ингибиторной формой гемофилии, остаются нерешенными [6]. В целом представляется целесообразным для дальнейшего изучения сложных вопросов, касающихся рисков развития, механизмов формирования ингибиторов, разработки стратегии лечения гемофилии и прежде всего ингибиторной формы заболевания, развивать международное сотрудничество.

Основные положения, касающиеся принципов проведения клинических исследований лекарственных препаратов FVIII

КИ лекарственных препаратов FVIII как плазматических, так и рекомбинантных, проводят при их регистрации, что соответствует рутинным требованиям. При внесении значимых изменений в технологический процесс производства ранее зарегистрированных препаратов с целью его совершенствования и улучшения качества препарата (например, введение новых способов очистки целевого белка, включение дополнительных стадий инактивации или элиминации вирусов, использование для этих целей новых детергентов и др.) также необходимо проведение КИ.

Программа КИ в качестве основы использует требования, изложенные в руководствах по надлежащей клинической практике (GCP), в отечественных⁴ и международных документах⁵ с учетом рекомендаций, касающихся особенностей проведения КИ в детской популяции⁶, особенностей исследования БЛП⁷, а также исследований препаратов факторов свертывания крови⁸.

На основании научных достижений в плане изучения гемофилии, а также анализа опыта клинического применения лекарственных препаратов при данной патологии проводится регулярное обновление руководящих документов, касающихся указанных вопросов.

В июле 2018 г. ЕМА представило обновленное руководство по проведению КИ препаратов FVIII⁹, в котором регламентируются основные принципы разработки программы КИ плазматических и рекомбинантных лекарственных препаратов FVIII, представляемых для регистрации или утверждения изменений процесса производства препаратов, зарегистрированных ранее.

В документе ЕМА¹⁰ приведена подробная информация, касающаяся выбора пациентов. В частности, указывается, что при регистрации «нового» препарата обязательное проведение КИ с участием ранее не получавших лечения пациентов не требуется. Данное заключение сделано на основе накопленных

научных знаний и опыта клинического наблюдения, свидетельствующих о том, что набор для участия в КИ достаточного количества подходящих пациентов, особенно РНП, является проблематичным. Поэтому проведение достаточно информативных КИ у РНП для оценки важных характеристик отдельных препаратов считается затруднительным. Однако каждого РНП, которому вводят «новый» препарат, необходимо тщательно контролировать в отношении эффективности лечения и развития ингибиторов.

Эффективность препаратов должна быть доказана в процессе проведения КИ до его регистрации, с обязательством проведения последующих пострегистрационных исследований, с учетом того, что подобрать достаточное количество пациентов с гемофилией, относящейся к орфанным заболеваниям, затруднительно. Пострегистрационные исследования проводятся с целью сбора дополнительных клинических данных относительно эффективности и безопасности рутинного применения препарата, в том числе дополнительной оценки иммуногенности и других нежелательных реакций, а также влияния препарата на жизненно важные показатели¹¹.

Оценка эффективности и безопасности лекарственных препаратов FVIII, представляемых для регистрации

В КИ лекарственных препаратов FVIII, проводимых на этапе регистрации, включают, как правило, не менее 100 пациентов с гемофилией А. В исследование включают РЛП, которые до включения в исследование получили не менее 150 ДВ препарата фактора свертывания крови (уровень активности FVIII у пациентов должен быть менее 1%). Учитывая, что заболевание является орфанным, включение в исследование большего числа пациентов является затруднительным. В связи с этим указанное количество пациентов может быть рассмотрено как оптимальное и достаточное для объективной оценки результатов КИ в отношении эффективности и безопасности препарата.

В случае включения в исследование ВИЧ-положительных пациентов с гемофилией А необходима предварительная оценка их иммунного статуса с целью исключения признаков иммунодефицита. Иммунокомпетентность пациента подтверждается анализом следующих показателей: содержание CD4-лимфоцитов (не менее 200 клеток/мкл), вирусная нагрузка (менее 200 частиц/мкл или около 400 тыс. копий/мл)¹². Исследование должно продолжаться до тех пор, пока пациенты не получают как минимум 50 ДВ исследуемого препарата¹³.

⁴ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2012.

Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2013.

⁵ Guideline for good clinical practice E6(R1). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 1996.

ICH Topic E 8. General considerations for clinical trials. Note for guidance on general considerations for clinical trials (CPMP/ICH/291/95). EMEA; 1998. Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical product. WHO Technical Report Series, Annex 3, No. 850; 1995.

Guideline on the clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins (CHMP/EWP/89249/2004). EMEA; 2007.

⁶ ICH Topic E11. Clinical investigation of medicinal products in the paediatric population. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2000.

⁷ Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К.; 2013.

⁸ Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products (EMA/CHMP/BWP/144533/2009 rev.1); 2012.

Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products (EMA/CHMP/BWP/144533/2009 rev.1); 2015.

Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products (EMA/CHMP/BWP/144533/2009 rev. 2). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2018.

⁹ Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products (EMA/CHMP/BWP/144533/2009 rev. 2). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2018.

¹⁰ Там же.

¹¹ Там же.

¹² Там же.

¹³ Там же.

Разработка программы исследований препаратов FVIII должна исходить из поэтапного выбора пациентов при их включении в КИ, для возможности клинической оценки препарата на взрослых пациентах и детях старшего возраста до включения в КИ детей младшего возраста. Согласно рекомендациям документа ЕМА¹⁴ на первых этапах КИ следует проводить в группах, включающих РЛП в возрасте от 12 лет и старше. После того как параметры фармакокинетики (ФК), эффективность и безопасность будут оценены у 20 РЛП в возрасте от 12 лет и старше, получивших не менее 50 ДВ, в исследование включают детей в возрасте от 0 до 12 лет. При этом как минимум 25 пациентов должны быть в возрасте от 6 до 12 лет, получивших более 150 ДВ, и 25 пациентов — младше 6 лет, которые получили более 50 ДВ ранее применяемых препаратов FVIII. КИ с участием детей в возрасте от 0 до 12 лет следует начинать с изучения ФК с последующим исследованием эффективности и безопасности не менее 50 ДВ для каждого из 50 пациентов¹⁵.

Общие принципы проведения КИ с участием детей должны соответствовать требованиям, утвержденным правилами проведения педиатрических исследований¹⁶.

Согласно законодательству Российской Федерации¹⁷ КИ должны быть начаты на взрослых пациентах, затем последовательно в исследования включают детей старше 12 лет (12–18 лет) и только после завершения этих КИ — детей более младшего возраста (вначале дети 6–12 лет, затем — младше 6 лет).

Фармакокинетика

Исследования по оценке параметров ФК препарата FVIII начинают выполнять с участием как минимум 12 пациентов в возрасте от 12 лет и старше, у которых должны отсутствовать ингибиторы и не должно наблюдаться спонтанных кровотечений. КИ с участием детей в возрасте младше 12 лет начинают только после того, как будет доказана безопасность 50 ДВ препарата FVIII для каждого из 20 пациентов, участвующих в исследовании в группе пациентов старше 12 лет. При этом в исследование ФК последовательно включают вначале детей в возрасте от 6 до 12 лет, затем — младше 6 лет (по 12 пациентов каждой возрастной когорты)¹⁸.

Последовательность включения пациентов разных возрастных групп осуществляют согласно требованиям законодательства Российской Федерации¹⁹.

При исследовании ФК препаратов FVIII определяют следующие показатели: уровень восстановления активности FVIII, период полувыведения, площадь под кривой (AUC) и клиренс²⁰.

Для корректной оценки результатов исследования параметров ФК пациенты до введения исследуемого препарата не должны получать инфузионно любой другой препарат FVIII.

Указанный период между введениями препаратов должен составлять не менее четырех дней.

Поскольку результаты исследования в значительной степени зависят и от индивидуальных особенностей пациента, необходимо провести тщательный анализ сведений о результатах ФК исследований ранее применяемого лекарственного препарата FVIII. В этом случае могут быть проанализированы полные данные «исторического контроля» или показатели восстановления активности и периода полувыведения препарата.

Указанные сведения должны быть получены до первого введения нового исследуемого препарата FVIII²¹.

Пациентам старше 12 лет, как правило, вводят 25–50 МЕ/кг исследуемого препарата FVIII. Взятие образцов крови пациентов осуществляют непосредственно перед введением препарата (так называемый исходный уровень), через 10–15, 30 мин и 1 ч. Указанные сроки соответствуют интервалу времени, прошедшему после завершения инфузии. После завершения инфузии взятие образцов проводят через 3, 6, 9, 24, 28 и 32 ч. Через 48 ч после инфузии проводят дополнительное взятие образцов в том случае, если пациентам вводят препарат в дозе 50 МЕ/кг и более. Для пациентов младшего возраста время забора образцов крови может быть сокращено. Временные точки для оценки ФК в этом случае следующие: до инфузии препарата (исходный уровень), через 1, 10, 24 и 48 ч после инфузии²².

Сроки забора образцов должны быть обоснованными, в значительной степени они зависят от характеристик препарата FVIII. Так, в случае исследования препаратов с удлинённым периодом полувыведения время отбора образцов может быть скорректировано с целью адекватной оценки временного профиля восстановления активности.

У всех детей, участвующих в исследовании, следует контролировать потребление FVIII (рассчитывают величину доза/кг для профилактики или по требованию, например для купирования кровотечения), а также выработку ингибиторов.

При проведении КИ должно быть использовано не менее трех хорошо охарактеризованных серий лекарственного препарата, произведенных по установленному регламенту. Оценивая фармакокинетические параметры, определяют показатель восстановления активности препарата, т.е. учитывают максимальное значение уровня фактора (МЕ/мл и (или) МЕ/кг), зарегистрированное в 1-й ч после инфузии. Рекомендуется проводить определение активности препаратов, используя метод хромогенного анализа в соответствии с монографией Европейской фармакопеи для человеческого фактора свертывания крови VIII²³. Предпочтительно использовать один и тот же метод для анализа препарата и образцов плазмы крови пациента²⁴.

¹⁴ Там же.

¹⁵ Там же.

¹⁶ ICH Topic E11. Clinical investigation of medicinal products in the paediatric population. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2000.

¹⁷ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 13.07.2020) «Об обращении лекарственных средств»; ст. 43.

¹⁸ Там же.

¹⁹ Там же.

²⁰ Guideline for good clinical practice E6(R1). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 1996.

²¹ Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products (EMA/CHMP/BPWP/144533/2009 rev. 2). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2018.

²² Там же.

²³ 07/2014:20704 Assay of human coagulation factor VIII. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2020.

²⁴ Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products (EMA/CHMP/BPWP/144533/2009 rev. 2). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2018.

С целью получения дополнительной информации целесообразно проводить оценку полученных фармакокинетических данных в отдельных группах пациентов с учетом их массы тела, разделяя пациентов по этому признаку на группы: с нормальным диапазоном, избыточной или недостаточной массой тела²⁵.

У пациентов, принимающих участие в исследовании ФК, через 3–6 месяцев применения препарата в тех же дозах проводят повторное определение тех же параметров ФК, включая тестирование образцов на наличие ингибиторов²⁶.

Эффективность и безопасность

Клиническую эффективность терапии препаратами FVIII оценивают по эффективности профилактики кровотечений или эффективности терапии, проводимой по требованию для купирования уже развившегося кровотечения. Первоначально клиническая эффективность оценивается в течение как минимум 50 ДВ препарата как самим пациентом, так и лечащим врачом. В последующем, оценивая эффективность долгосрочной профилактики, учитывают частоту и интервалы между кровотечениями, а также количество курсов применения препарата FVIII в течение каждого полугодия²⁷.

Клиническую эффективность необходимо оценивать в отдельно выделенной группе пациентов с тяжелой формой гемофилии А, в которую включают не менее чем 50 РЛП. В указанную группу включают как минимум 5 пациентов, которым проведено не менее 10 хирургических вмешательств (в том числе обширные операции) на фоне проводимой терапии. При этом должна быть оценена эффективность гемостаза, проведен учет объема потери крови и оценена потребность в процедурах переливания крови²⁸.

У пациентов с тяжелой формой гемофилии А (уровень активности FVIII менее 1%), которым должна быть проведена обширная хирургическая операция в плановом порядке и которые получают непрерывную инфузионную терапию препаратом FVIII, эффективность и безопасность препарата необходимо оценивать как во время проведения операционного вмешательства, так и в последующий период (как минимум в течение 1 недели после операции).

Оценку клинической эффективности при профилактике спонтанных кровотечений (применение препарата по требованию, т.е. для купирования уже развившегося кровотечения) или в случае необходимости проведения хирургического вмешательства проводят путем расчета потребления FVIII с учетом количества инфузий и величины расхода препарата в МЕ/кг за 1 месяц и за 1 год, а также величины МЕ/кг на один случай применения препарата²⁹.

В отчете о результатах исследования должны быть приведены сведения о параметрах ФК с описанием используемого метода анализа, информация о суточной дозе FVIII с указанием способа и скорости введения, сведения о потреблении фактора, гемостатическом ответе и кровопотере, о потребности в переливании крови, а также данные с описанием местных и системных нежелательных реакций³⁰. Дизайн КИ представлен на рисунке 2.

Оценка иммуногенности. Формирование АТ, специфичных к FVIII, рассматривается в качестве основного серьез-

ного осложнения при лечении пациентов с гемофилией А. При этом отмечается, что пациенты с тяжелой формой гемофилии А подвержены более высокому риску появления ингибиторов по сравнению с пациентами, у которых заболевание проявляется в умеренной и легкой форме. Согласно клиническим наблюдениям чаще всего развитие специфических АТ наблюдается в период назначения первых 50 ДВ препарата.

Диагностика наличия ингибиторов FVIII основывается на клинических проявлениях и подтверждается при лабораторном исследовании ингибитора FVIII.

При проведении исследований по определению наличия ингибиторов у исследуемых пациентов с целью оценки иммуногенного потенциала лекарственного препарата необходимо учитывать следующие положения:

- формирование ингибиторов следует изучать у РЛП с тяжелой формой гемофилии А, получивших более 150 ДВ препарата (с уровнем FVIII менее 1%);
- исследование образцов сыворотки крови необходимо проводить перед первым введением препарата, после 10–15 ДВ, после 50–75 ДВ и в иные сроки в случае выявления симптомов, указывающих на возможность формирования ингибиторов;
- тестирование на наличие ингибиторов предпочтительно проводить при условии, когда уровень FVIII в плазме крови достиг базового значения;
- при проведении исследований необходимо использовать метод Бетезда (Bethesda) в модификации Неймегена (Nijmegen); проводить испытания следует централизованно в одной лаборатории;
- в случае положительного результата должно быть проведено повторное тестирование для подтверждения наличия ингибитора, используя второй отдельно взятый образец;
- выделяют следующие уровни АТ: «низкий титр» (значения Бетезда единиц (БЕ) от пороговых до $\geq 0,6$ БЕ) и «высокий титр» (значения >5 БЕ);
- при выявлении антител-ингибиторов необходимо определить класс иммуноглобулинов (IgE или IgG) и исследовать их функциональную активность, т.е. оценить нейтрализующие свойства АТ.

В клинический отчет по результатам исследования должна быть включена полная информация о всех пациентах, у которых выявлены ингибиторы, с оценкой их клинической значимости, указанием частоты выявления и количества ДВ препарата по отношению к формированию ингибиторов.

В целом иммуногенный потенциал препарата должен быть исследован до регистрации и подтвержден результатами пострегистрационного исследования, так как данные только предрегистрационных исследований недостаточны для полноценной оценки терапии препаратами FVIII, особенно иммуногенности. Это связано с ограниченным числом пациентов, участвующих в КИ, что, в свою очередь, обусловлено малой доступностью пациентов с гемофилией А при их включении в программу исследования³¹.

Согласно современным представлениям риск образования ингибиторов к исследуемому препарату при проведении

²⁵ Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products (EMA/CHMP/BPWP/144533/2009 rev. 2). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2018.

²⁶ Там же.

²⁷ Там же.

²⁸ Там же.

²⁹ Там же.

³⁰ Там же.

³¹ Там же.

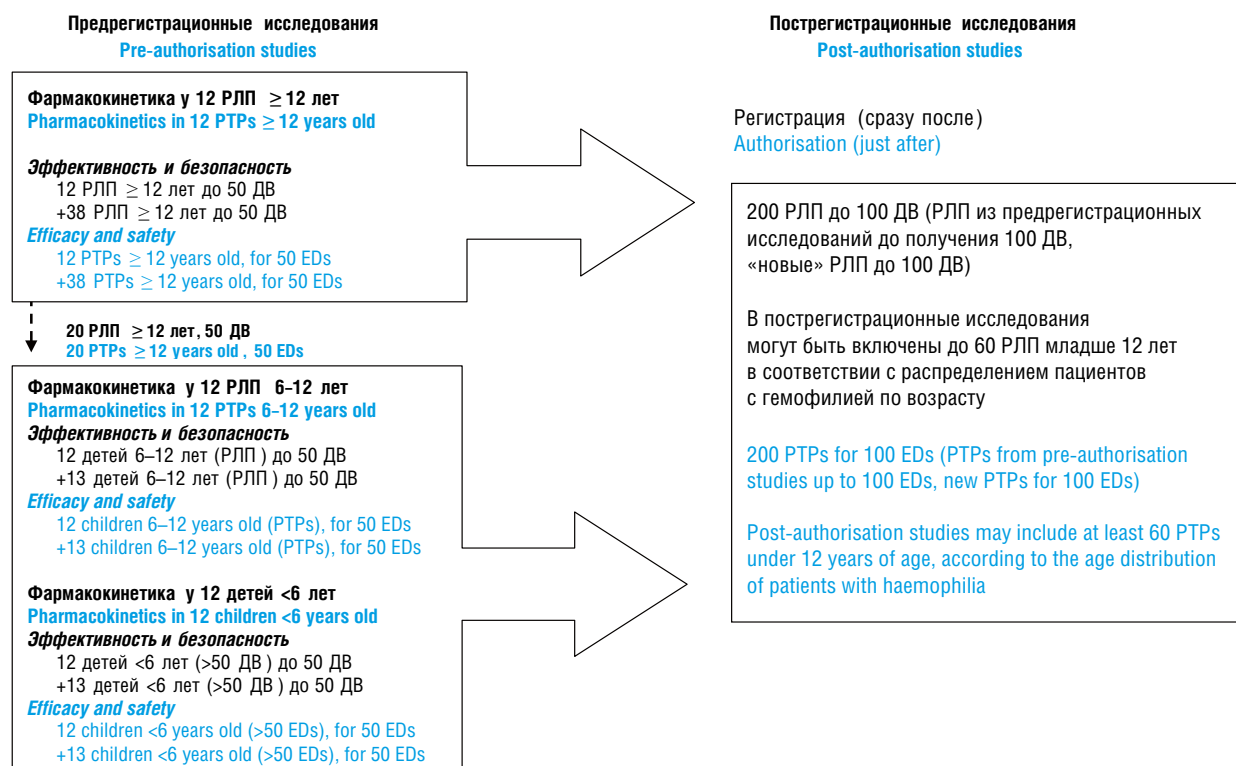


Рис. 2. Дизайн клинических исследований. РЛП — ранее леченные пациенты; ДВ — дни введения препарата³².
Fig. 2. Clinical trial design. PTPs—previously treated patients, EDs—exposure days³².

КИ следует оценивать у РЛП, поскольку пациенты, получавшие препарат длительно, должны быть иммунотолерантными к FVIII и поэтому рассматриваются как наиболее подходящие в качестве исследуемой популяции.

Научный комитет по стандартизации Международного общества по тромбозам и гемостазу рекомендует проводить КИ эффективности новых препаратов факторов свертывания крови с оценкой их иммуногенного потенциала с участием РЛП. Только после завершения регистрационных исследований, указывающих на эффективность нового препарата, в исследования с длительным наблюдением могут быть включены РЛП для оценки риска формирования ингибиторов и включения исследованных пациентов в национальные реестры.

Пострегистрационные исследования

Пострегистрационные исследования препарата FVIII необходимо проводить для получения дополнительных клинических данных и обеспечения согласованности (в долгосрочной перспективе) между предрегистрационными результатами КИ и результатами, полученными при рутинном применении. Протокол КИ включают в План управления рисками (ПУР).

Результаты предрегистрационных исследований необходимо учитывать при разработке программы пострегистрационного исследования, включающей исследования общей безопасности препарата FVIII и его клинической эффективности³³.

Особое внимание должно быть уделено изучению иммуногенности, включая формирование ингибиторов, а также данным, свидетельствующим об их формировании.

В пострегистрационные исследования препарата FVIII включают как минимум 200 пациентов. При применении плазменных препаратов, например изготовленных по известной технологии, в КИ может быть включено меньшее количество пациентов, однако для этого требуется соответствующее обоснование³⁴. Как правило, считается предпочтительным в КИ включать добровольцев тех стран и регионов, в которых предполагается практическое использование препарата³⁵.

В исследование включают РЛП различного возраста, получивших более 150 ДВ препарата, при этом 60 пациентов из 200 должны быть в возрасте младше 12 лет. Пациенты в возрасте до 12 лет могут быть включены в пострегистрационное исследование только после завершения предрегистрационных исследований с участием детей указанного возраста. Все пациенты из предрегистрационных КИ могут быть включены в следующие пострегистрационные исследования. Наблюдение за каждым пациентом должно продолжаться до получения им не менее 100 ДВ препарата³⁶.

Пациенты с тяжелой формой гемофилии, которым успешно проведена терапия с целью ИИТ, также могут быть включены в пострегистрационное исследование в связи с необходимостью оценки эффективности и безопасности препарата

³² Там же.

³³ Guideline for good clinical practice E6(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; 1996.

³⁴ Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products (EMA/CHMP/BWP/144533/2009 rev. 2). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2018.

³⁵ Там же.

³⁶ Там же.

для пациентов данной группы. При этом количество пациентов не должно превышать 25% всей исследуемой популяции³⁷.

Пострегистрационное исследование должно быть завершено в течение 4 лет. Отчет о выполнении исследований, который позволяет оценить качество, сроки и результативность проводимых исследований с целью возможной корректировки, предоставляется в уполномоченный орган через 2 года после регистрации препарата³⁸.

Заключение

Серьезным фактором риска при гемофилии А, особенно у ранее нелеченных пациентов препаратами FVIII, является формирование ингибиторов, что приводит к потере эффективности проводимой терапии и провоцирует развитие тяжелых осложнений. Многие вопросы, связанные с причинами формирования ингибиторов, подходами к разработке терапии с целью индукции иммунологической толерантности, выяснением механизмов, лежащих в ее основе, выбором новых подходов к лечению указанной патологии, разработкой новых лекарственных препаратов и совершенствованием технологии процесса производства ранее зарегистрированных препаратов, требуют дальнейшего решения.

Внедрение в клиническую практику новых лекарственных препаратов FVIII, применяемых для лечения гемофилии А, требует проведения КИ для оценки их эффективности и безопасности в соответствии с установленными регламентирующими требованиями и особенностями проведения исследований как в группе ранее леченных, так и нелеченных пациентов с гемофилией А. Успешность внедрения качественных лекарственных препаратов должна быть обеспечена гармонизацией требований, изложенных в отечественных и международных документах, касающихся данного вопроса.

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

Authors' contributions. **Zhanna I. Avdeeva**—collection and analysis of data from scientific literature and guidelines, writing of the text; **Aleksandr A. Soldatov**—compilation of scientific papers relevant to the topic of the review, editing of the text; **Vladimir P. Bondarev**—elaboration of the study concept, revision of the text; **Vyacheslav D. Mosyagin**—revision 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).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicity 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. А. Меркулов является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диа-

гностика, лечение», В. П. Бондарев является заместителем главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», Ж. И. Авдеева, В. Д. Мосягин являются членами редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Vadim A. Merkulov is the Editor-in-chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, Vladimir P. Bondarev is the Deputy Editor-in-chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. Zhanna I. Avdeeva, Vyacheslav D. Mosyagin, 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. *Basics of Clinical Hematology. Study guide*. Nizhny Novgorod: NizhGMA; 2013 (In Russ.)]
2. Бломбек М, Антонович Й, 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, Свирин 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, Габитов 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.)]
6. Зозуля НИ, Чернов МВ, Тарасова ИС, Румянцев АГ. Нерешенные вопросы оказания медицинской помощи пациентам с ингибиторной формой гемофилии. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2019;6(2):48–53. [Zozulya NI, Chernov VM, Tarasova IS, Rummyantsev AG. Unsolved issues of providing medical care to patients with hemophilia with inhibitors in Russia. *Rossiiskii zhurnal detskoi gematologii i onkologii*. 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: Lippincott Williams Wilkins; 2001.
9. DeLoughery TG. Hemophilia. In: DeLoughery TG, ed. *Hemostasis and thrombosis*. 2nd ed. Springer; 2019. P. 23–31. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19330-0_4
10. 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. [Avdeeva Zhi, Soldatov AA,

³⁷ Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*. 2013;19(1):e1–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x>

³⁸ Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products (EMA/CHMP/BPWP/144533/2009 rev. 2). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2018.

- 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 [In Russ.]] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-39-49>
11. Hay CRM. The epidemiology of factor VIII inhibitors. *Haemophilia*. 2006;12(s6):23–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01362.x>
12. Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia*. 2003;9(4):418–35. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2003.00780.x>
13. Agostini D, Rosset C, Botton MR, Kappel DB, Vieira IA, Gorziza RP, et al. Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients. *Haemophilia*. 2012;18(6):e416–8. <https://doi.org/10.1111/hae.12015>
14. Lillicrap D, Fijnvandraat K, Santagostino E. Inhibitors — genetic and environmental factors. *Haemophilia*. 2014;20(Suppl 4):87–93. <https://doi.org/10.1111/hae.12412>
15. Ghosh K, Shetty S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009;37(2):58–66. <https://doi.org/10.1007/s12016-009-8118-1>
16. Goodeve AC, Peake IR. The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. *Semin Thromb Hemost*. 2003;29(1):023–030. <https://doi.org/10.1055/s-2003-37936>
17. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*. 2006;12(s6):15–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01361.x>
18. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the *TNFA* gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*. 2006;108(12):3739–45. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024711>
19. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the *IL10* but not in the *IL1beta* and *IL4* genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*. 2006;107(8):3167–72. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3918>
20. Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the *CTLA-4* gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2007;5(2):263–5. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02290.x>
21. Astermark J. Basic aspects of inhibitors to factors VIII and IX and the influence of non-genetic risk factors. *Haemophilia*. 2006;12(s6):8–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01360.x>
22. Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, Ettinghausen CE, Tedgård U, van den Berg HM. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood*. 2007;109(11):4693–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-056317>
23. Gouw SC, van den Berg HM, le Cessie S, van der Bom JG. Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2007;5(7):1383–90. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02595.x>
24. Matzinger P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol*. 2007;8(1):11–3. <https://doi.org/10.1038/ni0107-11>
25. Kurnik K, Bidlingmaier C, Engl W, Chehadeh H, Reipert B, Auerswald G. New early prophylaxis regimen that avoids immunological danger signals can reduce FVIII inhibitor development. *Haemophilia*. 2010;16(2):256–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2009.02122.x>
26. Gouw SC, van den Berg HM, Fischer K, Auerswald G, Carcao M, Chalmers E, et al. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood*. 2013;121(20):4046–55. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457036>
27. van Velzen AS, Eckhardt CL, Peters M, Leebeek FWG, Escuriola-Ettingshausen C, Hermans C, et al. Intensity of factor VIII treatment and the development of inhibitors in non-severe hemophilia A patients: results of the INSIGHT case-control study. *J Thromb Haemost*. 2017;15(7):1422–9. <https://doi.org/10.1111/jth.13711>
28. Iorio A, Halimeh S, Holzhauser S, Goldenberg N, Marchesini E, Marcucci M, et al. Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *J Thromb Haemost*. 2010;8(6):1256–65. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03823.x>
29. Lacroix-Desmazes S, Repessé Y, Kaveri SV, Dasgupta S. The role of VWF in the immunogenicity of FVIII. *Thromb Res*. 2008;122(Suppl 2):S3–6. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(08\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(08)70002-1)
30. Oldenburg J, Lacroix-Desmazes S, Lillicrap D. Alloantibodies to therapeutic factor VIII in hemophilia A: the role of von Willebrand factor in regulating factor VIII immunogenicity. *Haematologica*. 2015;100(2):149–56. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.112821>
31. Fulcher CA, de Graaf Mahoney S, Zimmerman TS. FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood*. 1987;69(5):1475–80.
32. Reding MT, Lei S, Lei H, Green D, Gill J, Conti-Fine BM. Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb Haemost*. 2002;88(4):568–75.
33. van Helden PMW, van den Berg HM, Gouw SC, Kaijen PHP, Zuurveld MG, Mauser-Bunschoten EP, et al. IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A. *Br J Haematol*. 2008;14(4):644–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07232.x>
34. Prescott R, Nakai H, Saenko EL, Scharrer I, Nilsson IM, Humphries JE, et al. The inhibitor antibody response is more complex in hemophilia A patients than in most nonhemophilic patients with factor VIII autoantibodies. Recombinate and Kogenate Study Groups. *Blood*. 1997;89(10):3663–71.
35. Fijnvandraat K, Celie PH, Turenhout EA, ten Cate JW, van Mourik JA, Mertens K, et al. A human alloantibody interferes with binding of factor IXa to the factor VIII light chain. *Blood*. 1998;91(7):2347–52.
36. Fay PJ, Scandella D. Human inhibitor antibodies specific for the FVIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J Biol Chem*. 1999;274(42):29826–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.29826>
37. Arai M, Scandella D, Hoyer LW. Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies. Antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipid. *J Clin Invest*. 1989;83(6):1978–84. <https://doi.org/10.1172/JCI114107>
38. Zhong D, Saenko EL, Shima M, Felch M, Scandella D. Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood*. 1998;92(1):136–42.
39. Nogami K, Shima M, Nishiya K, Sakurai Y, Tanaka I, Gidding JC, et al. Human factor VIII inhibitor alloantibodies with a C2 epitope inhibit factor Xa-catalyzed factor VIII activation: a new anti-FVIII inhibitory mechanism. *Thromb Haemost*. 2002;87(3):459–65.
40. Meeks SL, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P. Non-classical anti-C2 domain antibodies are present in patients with factor VIII inhibitors. *Blood*. 2008;112(4):1151–3. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132639>
41. Astermark J, Voorberg J, Lenk H, DiMichele D, Shapiro A, Tjønnfjord G, Berntorp E. Impact of inhibitor epitope profile on the neutralizing effect against plasma-derived

- and recombinant factor VIII concentrates *in vitro*. *Haemophilia*. 2003;9(5):567–72. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2003.00802.x>
42. Gharagozlou S, Sharifian RA, Khoshnoodi J, Karimi K, Milani M, Okita DK, et al. Epitope specificity of anti-factor VIII antibodies from inhibitor positive acquired and congenital haemophilia A patients using synthetic peptides spanning A and C domains. *Thromb Haemost*. 2009;101(5):834–9.
43. Ananyeva NM, Lee TK, Jain N, Shima M, Saenko EL. Inhibitors in hemophilia A: advances in elucidation of inhibitory mechanisms and in inhibitor management with bypassing agents. *Semin Thromb Hemost*. 2009;35(8):735–51. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1245106>
44. Griffiths AE, Wang W, Hagen FK, Fay PJ. Use of affinity-directed liquid chromatography-mass spectrometry to map the epitopes of a factor VIII inhibitor antibody fraction. *J Thromb Haemost*. 2011;9(8):1534–40. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04397.x>
45. DiMichele D. Inhibitor development in haemophilia B: an orphan disease in need of attention. *Br J Haematol*. 2007;138(3):305–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06657.x>
46. Lillicrap D, Fijnvandraat K, Santagostino E. Inhibitors — genetic and environmental factors. *Haemophilia*. 2014;20(s4):87–93. <https://doi.org/10.1111/hae.12412>
47. DiMichele DM. Immune tolerance in haemophilia: the long journey to the fork in the road. *Br J Haematol*. 2012;159(2):123–34. <https://doi.org/10.1111/bjh.12028>
48. Cormier M, Batty P, Tarrant J, Lillicrap D. Advances in knowledge of inhibitor formation in severe haemophilia A. *Br J Haematol*. 2020;189(1):39–53. <https://doi.org/10.1111/bjh.16377>
49. Hay CR, DiMichele DM. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood*. 2012;119(6):1335–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-369132>
50. Gelbenegger G, Schoergenhofer C, Knoebl P, Jilma B. Bridging the missing link with Emicizumab: a bispecific antibody for treatment of hemophilia A. *Thromb Haemost*. 2020;120(10):1357–70. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1714279>

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 23.09.2020

После доработки 27.04.2021

Принята к публикации 10.06.2021

Received 23 September 2020

Revised 27 April 2021

Accepted 10 June 2021

Модификация и валидация методики оценки невидимых механических включений на основе метода Култера в растворах для парентерального введения

А. А. Воропаев*, О. В. Фадейкина, Д. С. Давыдов, А. А. Мовсесянц

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

Для определения невидимых механических включений (размером менее 100 мкм) в лекарственных формах для парентерального применения Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания предусматривает применение метода Култера в дополнение к счетно-фотометрическому методу и методу микроскопии. Использование предлагаемой апертурной трубки с отверстием диаметром 100 мкм не позволяет оценить весь диапазон размеров невидимых механических включений. Таким образом, актуальны исследования по подбору оптимальных параметров методики определения невидимых механических включений на основе метода Култера. **Цель работы:** модификация методики на основе метода Култера с использованием апертуры диаметром 200 мкм и проведение валидационных исследований модифицированной методики. **Материалы и методы:** исследования проводили с использованием анализатора размеров частиц Multisizer 4e, использовали суспензии стандартных латексных частиц с заданными размерами 10, 20, 43 мкм и стандартный образец счетной концентрации с содержанием $0,998 \times 10^6$ частиц/мл. В ходе валидации модифицированной методики оценивали следующие валидационные характеристики: правильность, повторяемость (сходимость), линейность. **Результаты:** проведенное исследование подтвердило возможность использования модифицированной методики с апертурой диаметром 200 мкм, основанной на методе Култера. Установлены валидационные характеристики модифицированной методики: правильность в сравнении со стандартным образцом счетной концентрации составила 5,3% (по отклонению от среднего значения); в сравнении со счетно-фотометрическим методом — 4,2%. Повторяемость (сходимость) результатов составила: 1% (по относительно стандартному отклонению) — при концентрации ≈ 10000 частиц в 1 мл и 7,6% — при концентрации ≈ 300 частиц в 1 мл. Показана линейность: коэффициент корреляции линейной зависимости более 0,99. **Выводы:** установлено соответствие критериям приемлемости по исследованным валидационным характеристикам модифицированной методики. Применение модифицированной методики позволит оценить весь требуемый диапазон размеров невидимых механических включений при оценке качества растворов для парентерального введения по показателю «Невидимые механические включения».

Ключевые слова: метод Култера; метод электрочувствительных зон; невидимые механические включения; растворы для парентерального введения

Для цитирования: Воропаев АА, Фадейкина ОВ, Давыдов ДС, Мовсесянц АА. Модификация и валидация методики оценки невидимых механических включений на основе метода Култера в растворах для парентерального введения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(2):108–115. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-108-115>

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

Modification and validation of the test procedure for determination of sub-visible particulate matter in parenteral solutions, using the Coulter method

A. A. Voropaev*, O. V. Fadeikina, D. S. Davydov, A. A. Movsesyants

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

The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th edition provides for determination of sub-visible particles (less than 100 μm in size) in parenteral dosage forms using the Coulter method, in addition to the light obscuration particle count test and microscopy. However, the proposed 100 μm aperture tube does not enable assessment of the whole range of sub-visible particle sizes. Therefore, research is needed to find optimal test conditions for determination of sub-visible particulate matter by the Coulter method. **The aim of the study:** modification of the Coulter-based procedure using a 200 μm aperture tube, and performance of validation studies. **Materials and methods:** Multisizer 4e Coulter counter, suspensions of reference latex particles (10 μm , 20 μm , and 43 μm), and a particulate count reference standard containing 0.998×10^6 particles/mL were used in the study. The following parameters were assessed during validation: accuracy, repeatability, linearity. **Results:** the study confirmed the feasibility of using the modified Coulter-based procedure with a 200 μm aperture tube. The following values were obtained during validation of the modified test procedure: accuracy was 5.3% (deviation from the mean value) as compared to the particulate count reference standard, and 4.2% as compared to the light obscuration method. Repeatability was 1% (relative standard deviation) for the particle concentration of approximately 10000 per 1 mL, and 7.6% for the particle concentration of approximately 300 per 1 mL. The study demonstrated the linearity of the procedure, the linear correlation coefficient was more than 0.99. **Conclusions:** the studied validation parameters of the modified test procedure were shown to comply with the acceptance criteria. The modified test procedure will enable assessment of the whole range of sub-visible particle sizes when testing parenteral solutions for particulate contamination: sub-visible particles.

Key words: Coulter method; electrical sensing zone method; sub-visible particulate matter; parenteral solutions

For citation: Voropaev AA, Fadeikina OV, Davydov DS, Movsesyants AA. Modification and validation of the test procedure for determination of sub-visible particulate matter in parenteral solutions, using the Coulter method. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(2):108–115. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-108-115>

*Corresponding author: Andrey A. Voropaev; voropaev@expmed.ru

Одним из методов определения невидимых механических включений в лекарственных формах для парентерального применения, предусмотренных Государственной фармакопеей Российской Федерации XIV издания¹, является метод Култера, или метод электрочувствительных зон, с использованием анализатора размеров частиц. В основе метода лежит измерение электрического тока при прохождении частицы через калиброванное отверстие, называемое апертурой, находящееся в апертурной трубке. Имеется широкий выбор апертур диаметром от 10 до 2000 мкм. Для оценки невидимых механических включений (10–100 мкм) возможно использование трубок с апертурами следующих диаметров: 100, 200, 280 и 400 мкм. Диаметр данного отверстия определяет возможный диапазон размеров измеряемых частиц, который обычно составляет 2–60% от размера апертуры² (табл. 1).

Под невидимыми частицами принято понимать частицы размером от 10 до 100 мкм. Таким образом, для проведения испытаний могут подойти апертурные трубки с диаметром апертуры 100, 200 мкм. Апертурные трубки с отверстием диаметром более 280 мкм используют только для определения размеров частиц, без подсчета количества частиц в определенном объеме.

В Государственной фармакопее Российской Федерации³ при описании метода электрочувствительных зон указано, что проводить испытания необходимо с использованием трубки с апертурой диаметром 100 мкм. Минусом использования данной трубки является диапазон размеров измеряемых частиц, который составляет от 2 до 60 мкм, позволяющий выявить не более 56% частиц, входящих в диапазон размеров невидимых механических включений (до 100 мкм). Использование трубки с апертурой диаметром 200 мкм имеет следующие преимущества.

1. Диапазон измерений перекрывает весь контролируемый диапазон размеров невидимых механических включений.

2. Электрическое сопротивление в апертуре прямо пропорционально зависит от ее диаметра, поэтому использование трубки с большим диаметром апертуры позволяет провести испытание большего количества материалов с различной электропроводностью. Электропроводность испытуемых образцов напрямую влияет на точность испытаний [1, 2]. Одним из способов решения проблемы электропроводности является модификация методики и подбор растворителя [3]. Однако до-

полнительные разведения препарата электролитом, отличным от входящего в комплект с препаратом, например использование 9% раствора натрия хлорида вместо воды для инъекций, могут вызывать искажения результата [4]. Использование трубки с апертурой диаметром 200 мкм в некоторых случаях может быть более простым решением данной проблемы.

3. Уменьшается время одного испытания, так как скорость потока исследуемого раствора выше в трубке с апертурой большего диаметра. Скорость анализа аналитической пробы объемом 1 мл при использовании трубки с апертурой диаметром 100 мкм составляет 25 с, тогда как при использовании трубки с апертурой диаметром 200 мкм — 6 с.

4. Уменьшается вероятность закупорки апертуры частицами максимального размера, не имеющими сферической формы⁴.

Цель работы: модификация методики на основе метода Култера с использованием апертуры диаметром 200 мкм и проведение валидационных исследований модифицированной методики.

Материалы и методы

Материалы:

- изотонический раствор Изотон II (Beckman Coulter Life Sciences, США);
- вода очищенная, полученная на установке Milli-Q Integral 10 (Millipore Corp., Франция);
- суспензии стандартных латексных частиц NIST (National Institute of Standards and Technology) Coulter® CC Size Standard с заданными размерами 10, 20, 43 мкм (серия 477062K; Beckman Coulter Life Sciences, США);
- стандартный образец счетной концентрации — суспензия латексных частиц для проверки концентрации (серия 7497044F; Beckman Coulter Life Sciences, США, концентрация $0,998 \times 10^6$ частиц/мл).

Методы

Метод электрочувствительных зон. Работу выполняли на анализаторе размеров частиц Multisizer 4e (Beckman Coulter Life Sciences, США). Объем аналитической пробы 1 мл, количество измерений 10, подсчет частиц размером более 5 мкм.

Таблица 1. Доступные апертурные трубки для Multisizer 4e и диапазон размеров измеряемых частиц
Table 1. Available aperture tubes for Multisizer 4e, and particle size range

Трубка с апертурой диаметром, мкм Tube aperture diameter, μm	Диапазон размеров измеряемых частиц, мкм Measured particle size range, μm
50	1–30
100	2–60
200	4–120
280	5,6–168
400	8–240

¹ Общая фармакопейная статья 1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

² Coulter principle short course. Beckman Coulter Inc.; 2014.

³ Общая фармакопейная статья 1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ ISO 13319 Determination of particle size distributions — Electrical sensing zone method, 2007.

Испытуемые образцы помещали в вialу Accuvette ST (Beckman Coulter Life Sciences, США).

Метод счетно-фотометрический. Испытания проводили на счетчике частиц в жидкости HIAC 9703+ (Beckman Coulter Life Sciences, США). Объем аналитической пробы 1 мл, количество измерений 10, подсчет частиц размером более 5 мкм сенсором HRLD150.

Подготовка проб для оценки влияния теплового шума в образцах с низкой электропроводностью. Изотон II фильтровали через шприцевой фильтр Minisart с диаметром пор 0,2 мкм производства Sartorius Stedim biotech, Франция. Растворы с различной концентрацией хлорида натрия готовили путем смешивания воды очищенной с профильтрованным Изотоном II:

- раствор А: 25% Изотон II, сопротивление 45 кОм;
- раствор Б: 1% Изотон II, сопротивление 460 кОм;
- раствор В: 0,5% Изотон II, сопротивление 812 кОм.

Подготовка суспензии стандартного образца счетной концентрации для проведения исследований. Тщательно перемешивали суспензию стандартных латексных частиц в течение 15 с. Ожидали 10 мин для оседания пены. После этого переносили 200 мкл суспензии в вialу Accuvette ST, добавляли 20 мл Изотона II и перемешивали без образования пузырьков. Концентрация частиц в подготовленной суспензии согласно паспорту составляет $0,998 \times 10^3$ частиц/мл с точностью 10%.

Приготовление серии разведений суспензий стандартных латексных частиц для оценки линейности. В лабораторный стакан с 800 мл электролита добавляли суспензию стандартных латексных частиц при постоянном перемешивании на магнитной мешалке счетчика HIAC 9703+. При этом измеряли количество частиц в 1 мл, доводя концентрацию частиц до верхнего предела измерения счетчика. После этого суспензию перемешивали в течение 10 мин и переносили 400 мл в другой стакан, содержащий 400 мл электролита, для получения двукратного разведения. Снова перемешивали в течение 10 мин и проводили следующее двукратное разведение. Таким образом готовили четыре разведения исходной суспензии.

Статистическая обработка результатов. Рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD), коэффициент корреляции (r) с помощью программы Excel [5].

Валидация. Валидацию методики, основанной на методе Култера, с использованием трубки с апертурой диаметром 200 мкм проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик⁵ по характеристикам: правильность, повторяемость, линейность. Оценку правильности проводили с использованием двух вариантов эксперимента: 1) анализ с использованием модельных смесей с известной концентрацией частиц; 2) сравнение результатов с данными, полученными

с использованием счетно-фотометрического метода, правильность которого была установлена ранее.

Результаты и обсуждение

Оценка влияния электропроводности образца

Для реализации принципа электрочувствительных зон в анализаторе размеров частиц Multisizer 4e используется стеклянная трубка, в стенке которой имеется микроотверстие (апертура). Перед проведением испытания в анализаторе частиц измеряют электрическое сопротивление исследуемого образца в апертуре. Данное сопротивление зависит от электропроводности исследуемого образца и размера апертуры. Электрическое сопротивление в растворах определяется по формуле (1):

$$R = \rho \times \left(\frac{l}{A} \right), \quad (1)$$

где R — сопротивление, ρ — удельное сопротивление раствора, l — расстояние между электродами, A — площадь поперечного сечения образца, в данном случае — это площадь апертуры. Исходя из этой формулы, сопротивление образца в апертуре прямо пропорционально зависит от диаметра апертуры. Максимальное сопротивление в апертуре ($R_{кр}$), допускаемое производителем, составляет 100 кОм. Для проведения исследований рекомендуется использовать образцы, сопротивление которых находится в диапазоне 5–40 кОм⁶.

Электрическое сопротивление уменьшается обратно пропорционально увеличению диаметра апертуры, что подтверждается экспериментальными данными измерения сопротивления в апертуре Изотона II и воды очищенной, представленными в таблице 2.

Как следует из приведенных в таблице 2 данных, для апертуры меньшего диаметра (100 мкм) сопротивление тока одного и того же образца выше в 2 раза, чем для апертуры большего диаметра (200 мкм).

Таким образом, для оценки невидимых механических включений в препаратах с низкой электропроводностью можно рекомендовать использовать трубки с апертурой большего диаметра (200 мкм), так как сопротивление исследуемого образца при использовании таких апертур будет меньше.

От размера апертуры зависит уровень так называемого теплового шума. Тепловой (или джонсоновский) шум — равновесный шум, обусловленный тепловым движением носителей заряда в проводнике, в результате чего на концах проводника возникает флуктуирующая разность потенциалов [6]. Тепловой шум проявляется чаще всего увеличением количества малых частиц, которое не согласуется с ожидаемым распределением частиц. Хотя эти частицы не принимаются в учет при оценке количества частиц нормируемого диапазона, подсчет малых частиц влияет на общий ход анализа. С уменьшением

Таблица 2. Электрическое сопротивление образцов при использовании трубки с апертурой диаметром 100 и 200 мкм
Table 2. Electrical resistance of samples when using 100 and 200 µm aperture tubes

Образец Sample	Электрическое сопротивление образца в трубке с апертурой 100 мкм, кОм Electrical resistance of the sample in a 100 µm aperture tube, kΩ	Электрическое сопротивление образца в трубке с апертурой 200 мкм, кОм Electrical resistance of the sample in a 200 µm aperture tube, kΩ
Изотон II Isotone II	14	7
Вода очищенная Purified water	1900	840

⁵ Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁶ Coulter principle short course. Beckman Coulter Inc.; 2014.

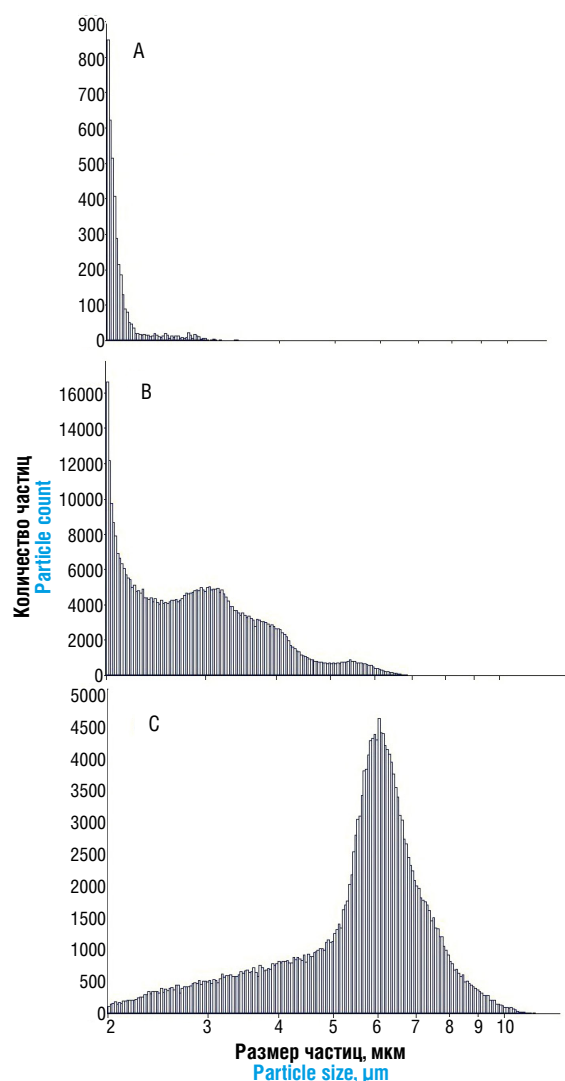


Рис. 1. Тепловой шум в образцах с различной концентраций натрия хлорида (апертура 200 мкм): А — 45 кОм, 25% Изотон II; В — 460 кОм, 1% Изотон II; С — 812 кОм, 0,5% Изотон II.

Fig. 1. Thermal noise in samples with different concentrations of sodium chloride (200 μm aperture): А—45 k Ω , 25% Isotone II; В—460 k Ω , 1% Isotone II; С—812 k Ω , 0.5% Isotone II.

электропроводности раствора максимум теплового шума будет смещаться к большему значению. На рисунке 1 представлены результаты измерений количества частиц в растворах, не содержащих частицы, но с различным электрическим сопротивлением (45, 460, 812 кОм). Низкая электропроводность образцов создает тепловой шум, который определяется как частицы. Тепловой шум, способный повлиять на результаты подсчета частиц размером 10–100 мкм, появляется при электрическом сопротивлении в апертуре более 800 кОм (рис. 1С). Хотя при достаточной электропроводности образца (рис. 1А и 1В) сигналы от шума не могут повлиять на результаты подсчета количества частиц в диапазоне 10–100 мкм, данные сигналы не позволяют провести анализ, так как исчерпывается лимит на количество импульсов (500 тысяч), которые могут быть проанализированы прибором в ходе одного измерения⁷.

⁷ Multisizer 4e User's Manual. Beckman Coulter Inc.; 2010.

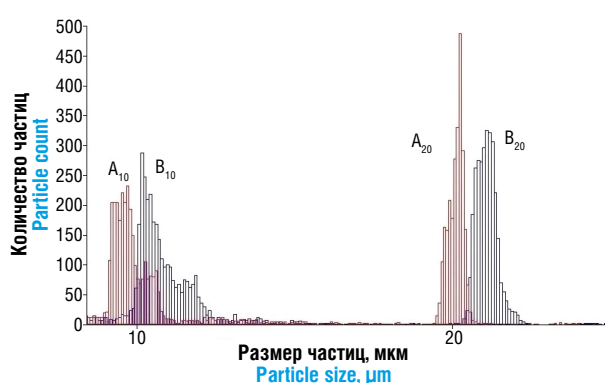


Рис. 2. Результат анализа суспензии стандартных латексных частиц 10 и 20 мкм: А₁₀, А₂₀ — количество частиц размерами 10 и 20 мкм, измерение проводили при силе тока 800 мА, усиление 4; В₁₀, В₂₀ — количество частиц размерами 10 и 20 мкм, измерение проводили при силе тока 1600 мА, усиление 2.

Fig. 2. Results of analysis of a suspension of 10 μm and 20 μm reference latex particles: А₁₀, А₂₀—the number of 10 μm and 20 μm particles measured at a current of 800 mA, gain 4; В₁₀, В₂₀—the number of 10 and 20 μm particles measured at a current of 1600 mA, gain 2.

Другим фактором, влияющим на проведение анализа, является концентрация частиц в образце: если концентрация частиц резко изменяется, то прибор это воспринимает как блокировку апертуры. В этом случае прибор прерывает ход измерения и сообщает об ошибке. Данный эффект проявляется как изменение количества частиц (особенно в нижнем пределе измерения), а также как резкое изменение концентрации частиц и (или) изменение скорости потока жидкости.

Таким образом тепловой шум из-за высокого электрического сопротивления блокирует ход анализа. Избежать влияния теплового шума можно, установив нижний порог определения частиц выше диапазона размеров малых частиц, равных 10 мкм. При проведении анализа образцов с низкой электропроводностью важно правильно выбрать параметры величины электрического импульса (силу тока, Current Aperture) и усиления (Gain), которые будут применяться во время испытания. При неправильном выборе этих параметров возможно получение неверных результатов по размеру частиц. На рисунке 2 представлены результаты двух анализов при разных значениях силы тока и усиления одного и того же образца с удельной электропроводностью 7 мСм/см и удельным сопротивлением 250 кОм/см. К образцу были добавлены стандартные образцы латексных частиц размером 10 и 20 мкм.

При анализе со стандартными параметрами, автоматически устанавливаемыми анализатором (сила тока 1600 мА, усиление 2, апертура диаметром 100 мкм), латексные частицы определяются со средним размером (мода) В₁₀ = 9,8 мкм и В₂₀ = 21,06 мкм, превышающим указанный в паспорте суспензий стандартных латексных частиц (мода): А₁₀ = 9,699 мкм и А₂₀ = 20,83 мкм соответственно.

Таким образом, важно выполнять предварительные настройки силы тока и усиления, используя раствор с той же электрической проводимостью, что и исследуемые образцы. При исследовании образцов с низкой электропроводностью в настройках прибора силу тока необходимо уменьшить, а усиление — увеличить.

Если испытуемые образцы имеют электропроводность ниже предельного значения, то возможно разведение образцов раствором натрия хлорида. При разведении необходимо учитывать следующие рекомендации.

1. Разведение раствором натрия хлорида не должно приводить к изменению физических свойств образца: выпадению осадка, растворению/разрушению конгломератов частиц.

2. Разведение должно быть таким, чтобы электрическое сопротивление образца в апертуре находилось в диапазоне 5–40 кОм.

3. Добавляемый к испытуемому образцу раствор электролита должен быть отфильтрован от частиц.

4. При расчете результатов необходимо учитывать коэффициент разведения и рассчитывать количество частиц на первоначальный объем.

5. Разведение должно быть минимальным и не влиять на статистическую точность анализа.

По результатам проведенных исследований мы предлагаем основанную на методе Култера методику оценки качества растворов для парентерального введения по показателю «Невидимые механические включения».

Описание модифицированной методики

Подготовка прибора. Определение проводят с использованием апертуры диаметром 200 мкм. В настройках программного обеспечения выбирают нижний предел диапазона размеров частиц, подлежащих анализу, равный 10 мкм, а верхний предел равный 100 мкм. Перед испытанием необходимо измерить сопротивление апертуры и выбрать подходящие силу тока и усиление электрического импульса.

Измерения проводят, устанавливая в программном обеспечении анализатора Multisizer 4e пороговую величину размеров измеряемых частиц, равную 10 мкм.

Подготовка образца для испытаний. Не менее 20 мл образца тщательно перемешивают, избегая загрязнения извне и образования пузырьков воздуха.

Измерение. Объем одной аналитической пробы (измеряемый объем) равен 1 мл. Проводят измерение трех аналитических проб. Принимают в расчет среднее по результатам измерений трех аналитических проб в образце.

Валидационные исследования при выполнении испытаний по показателю «Невидимые механические включения» с использованием модифицированной методики

В ходе данных исследований оценивали следующие валидационные характеристики: правильность, повторяемость и линейность. В руководстве по валидации рекомендовано планировать эксперимент так, чтобы соответствующие валидационные характеристики изучались одновременно, обеспечивая правильное и полное понимание возможностей аналитической методики⁸. Оценку валидационных характеристик модифицированной методики проводили тремя способами.

Способ 1. Использование суспензии стандартного образца счетной концентрации. Результаты должны совпадать с паспортными характеристиками стандартных образцов счетной концентрации. Относительная погрешность измерений между отдельными аналитическими пробами, не должна превышать $\pm 20\%$ для методики на основе метода Култера⁹.

Способ 2. Использование суспензий стандартных латексных частиц с размерами частиц, входящими в исследуемый

диапазон 10–100 мкм. В отличие от стандартного образца счетной концентрации количество частиц в суспензиях стандартных латексных частиц неизвестно. Поэтому вначале готовят суспензию, содержащую близкую к максимальной концентрации частиц, которую способен определить прибор. Из этой суспензии готовят серию двукратных разведений: не менее чем 5 проб с различной концентрацией. Анализируют каждое разведение и вычисляют среднее значение. Экспериментальные данные обрабатывают методом наименьших квадратов с расчетом коэффициента корреляции r . Критерий приемлемости $r \geq 0,99$. Относительная погрешность между отдельными измерениями не должна превышать $\pm 20\%$.

Способ 3. Оценка правильности в сравнении с методикой, правильность которой ранее подтверждена. Используют суспензии стандартных латексных частиц. Часть образца анализируют с помощью валидируемой методики, другую часть анализируют с помощью метода, правильность которого подтверждена ранее. Результаты оценки количества частиц разными методами не должны отличаться более чем на 30% ¹⁰.

При валидации совмещали все три способа для полного раскрытия возможностей методики в рамках экспериментов со стандартным образцом счетной концентрации и серии разведений суспензий стандартных латексных частиц.

Эксперименты со стандартным образцом счетной концентрации. Проводили по десять измерений методикой на основе метода Култера с использованием трубок с апертурой диаметром 100, 200 мкм и счетно-фотометрическим методом. Определяли правильность как отклонение среднего результата подсчета количества частиц от истинного значения (выраженное в процентах). За истинное значение принимали концентрацию частиц согласно паспорту стандартного образца. Дополнительно рассчитывали правильность, принимая за истинное значение результаты подсчета количества частиц, полученные при использовании счетно-фотометрического метода. Критерий приемлемости: отклонение не должно превышать относительную погрешность методики (20%) или погрешность результатов подсчета в стандартном образце счетной концентрации (10%).

Повторяемость результатов измерений определяли как разброс результатов относительно величины среднего результата, рассчитывая относительное стандартное отклонение (RSD). Критерий приемлемости: относительное стандартное отклонение, характеризующее разброс результатов, не должен превышать 20% .

Эксперименты с серией разведений суспензий стандартных латексных частиц. Проводили по десять измерений методикой на основе метода Култера с использованием трубок с апертурой диаметром 100 и 200 мкм и счетно-фотометрическим методом для каждого разведения суспензий стандартных латексных частиц. Рассчитывали правильность, принимая за истинное значение результаты подсчета количества частиц, полученные при использовании счетно-фотометрического метода. Критерий приемлемости: разброс значений не должен превышать 20% . Повторяемость результатов измерений определяли как разброс результатов относительно величины среднего результата, рассчитывая относительное стандартное отклонение (RSD). Критерий приемлемости: разброс значений не должен превышать 20% . Линейность определяли наличием зависимости результата измерений от концентрации: коэффициент корреляции r линейной за-

⁸ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113 «Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств».

⁹ Методика поверки МП 242-1382-2013 «Анализаторы размеров частиц Multisizer. Методика поверки». ГЦИ СИ ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева», 2013.

¹⁰ Методика поверки МП 242-2221-2018 «Счетчики частиц в жидкости ИАС 9703». ГЦИ СИ ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева», 2018.

Таблица 3. Результаты оценки правильности и повторяемости (*RSD*) измерений в эксперименте с использованием стандартного образца счетной концентрации

Table 3. The results of accuracy and repeatability (*RSD*) assessment using the particulate count reference standard

Характеристика Validation parameter	Методика на основе метода Култера, анализатор Multisizer 4е, трубка с апертурой диаметром, мкм Coulter-based procedure, Multisizer 4e counter, tube aperture diameter, μm		Методика на основе счетно-фотометрического метода, счетчик HIAC 9703+ Light obscuration method, HIAC 9703+ Particle Counter	Паспортные данные стандартного образца счетной концентрации Data presented in the particulate count reference standard certificate
	100	200		
Среднее количество частиц в 1 мл $\pm$ SD Average number of particles per mL $\pm$ SD	10506 $\pm$ 124	9454 $\pm$ 70	9870 $\pm$ 93	9980 $\pm$ 998
Повторяемость (<i>RSD</i>), % Repeatability (<i>RSD</i>), %	1,18	0,74	0,95	10
Правильность, отклонение от среднего количества частиц в стандартном образце счетной концентрации, % Accuracy, deviation from the mean number of particles in the particulate count reference standard, %	5,3	5,3	1,1	—
Правильность, отклонение от среднего количества частиц, определенного счетно-фотометрическим методом, % Accuracy, deviation from the mean number of particles determined by the light obscuration method, %	6,4	4,2	—	—

Примечание. SD — стандартное отклонение; RSD, % — относительное стандартное отклонение. «—» — отсутствие данных.

Note. SD—standard deviation; RSD, %—relative standard deviation. — no data available.

Таблица 4. Оценка правильности и повторяемости (*RSD*) по результатам измерений серии разведений суспензий стандартных латексных частиц размерами 10, 20 и 43 мкм

Table 4. The results of accuracy and repeatability (*RSD*) assessment using a series of dilutions of suspensions of reference latex particles (10, 20, and 43 μm)

Размер частиц, мкм Particle size, μm	Концентрация частиц в 1 мл Particle concentration in 1 mL	Значение показателей, рассчитанных по результатам измерений с использованием трубки с апертурой диаметром, мкм Measurement results obtained using a tube aperture diameter, μm			
		100 100		200 200	
		Правильность, отклонение от среднего количества частиц, определенного счетно-фотометрическим методом, % Accuracy, deviation from the mean number of particles determined by the light obscuration method, %	Повторяемость (<i>RSD</i>), % Repeatability (<i>RSD</i>), %	Правильность, отклонение от среднего количества частиц, определенного счетно-фотометрическим методом, % Accuracy, deviation from the mean number of particles determined by the light obscuration method, %	Повторяемость (<i>RSD</i>), % Repeatability (<i>RSD</i>), %
10	$\approx$ 10000	8,1	1,1	3,0	1,0
	$\approx$ 5000	4,8	1,7	0,1	1,2
	$\approx$ 2500	7,9	2,2	3,2	1,1
	$\approx$ 1200	7,9	3,1	8,4	3,4
	$\approx$ 600	14,6	2,0	16,7	5,5
	$\approx$ 300	3,0	5,7	7,3	7,6
20	$\approx$ 10000	11,6	0,6	9,7	1,0
	$\approx$ 5000	13,8	1,7	1,7	4,5
	$\approx$ 2500	11,3	2,4	2,4	4,7
	$\approx$ 1200	13,5	4,6	6,4	2,7
	$\approx$ 600	4,2	4,1	2,8	4,2
	$\approx$ 300	2,5	4,4	3,4	6,3
43	$\approx$ 4000	0,7	2,3	12,3	1,5
	$\approx$ 2000	0,4	1,3	5,8	3,0
	$\approx$ 1000	3,1	3,9	6,0	2,6
	$\approx$ 500	5,2	1,5	7,9	4,3
	$\approx$ 250	6,6	5,0	7,7	6,2

Примечание. RSD, % — относительное стандартное отклонение.

Note. RSD, %—relative standard deviation.

Таблица 5. Результаты оценки коэффициента корреляции линейной зависимости измерений в серии разведений суспензий стандартных латексных частиц размерами 10, 20 и 43 мкм

Table 5. The results of assessment of the linear correlation coefficient of measurements performed for a series of dilutions of reference latex particles (10, 20, and 43 μm)

Суспензия латексных частиц размером, мкм Suspension of reference latex particles, μm	Методика на основе метода Култера Coulter method		Методика на основе счетно-фотометрического метода Light obscuration method
	трубка с апертурой диаметром 100 мкм 100 μm aperture tube	трубка с апертурой диаметром 200 мкм 200 μm aperture tube	счетчик частиц HIAC 9703+ HIAC 9703+ Particle Counter
10	0,9998	0,9998	0,9998
20	0,9999	0,9981	0,9999
43	0,9950	0,9986	0,9997

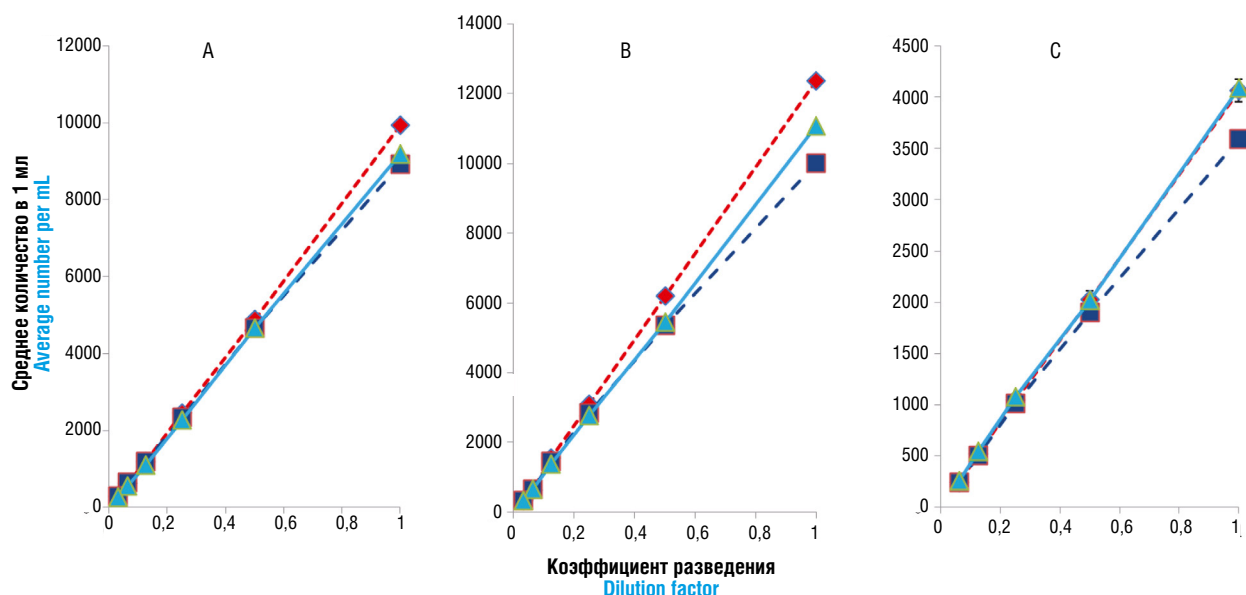


Рис. 3. Среднее количество частиц в серии разведений суспензий стандартных латексных частиц размерами: А — 10 мкм; В — 20 мкм; С — 43 мкм. —♦— апертура диаметром 100 мкм; —■— апертура диаметром 200 мкм; —▲— счетно-фотометрический метод.

Fig. 3. The average number of particles in dilutions of suspensions of reference latex particles of the following sizes: А—10 μm ; В—20 μm ; С—43 μm . —♦— 100 μm aperture; —■— 200 μm aperture; —▲— light obscuration method.

висимости, рассчитанный методом наименьших квадратов. Критерий приемлемости: коэффициент корреляции должен быть больше или равен 0,99.

Результаты, полученные с использованием стандартного образца счетной концентрации, представлены в таблице 3. Полученные значения подсчета количества частиц для методики на основе метода Култера и счетно-фотометрического метода не превышают погрешность стандартного образца счетной концентрации. Правильность модифицированной методики оценивали по стандартному образцу счетной концентрации в сравнении со счетно-фотометрическим методом. В обоих случаях правильность подтверждается, отклонение результатов не превышало 10%. Повторяемость результатов, полученных каждым методом, составила 2%.

Результаты оценки правильности и повторяемости, полученные с использованием серии разведений суспензии стандартных латексных частиц, представлены в таблице 4.

Отклонение от среднего значения (табл. 4) составило 14,6% (для апертуры 100 мкм) и 16,7% (для модифицируемой методики с использованием апертуры 200 мкм), что удовлетворяет принятым критериям приемлемости (20%). Относительное стандартное отклонение, характеризующее повторяемость результатов измерений, составило 5,7% (для апертуры 100 мкм) и 7,6% (для модифицированной методики), что так-

же удовлетворяет принятым критериям приемлемости (20%). Таким образом, подтверждена правильность и повторяемость модифицированной методики в сравнении с методикой с использованием трубки с апертурой 100 мкм и счетно-фотометрическим методом.

Относительное стандартное отклонение увеличилось в исследуемых образцах, содержащих меньшее количество частиц, но даже при минимальных значениях концентрации ≈ 200 –300 частиц в 1 мл значение *RSD* не превысило 10%. Оценка линейности и коэффициенты корреляции приведены в таблице 5 и на рисунке 3. Во всех случаях коэффициент корреляции превысил 0,99, что экспериментально доказывает линейность.

Выводы

Проведенное исследование подтвердило возможность использования модифицированной методики с апертурой диаметром 200 мкм, основанной на методе Култера.

Проведены валидационные исследования модифицированной методики. Правильность методики в сравнении со стандартным образцом счетной концентрации составила 5,3% (по отклонению от среднего значения); в сравнении со счетно-фотометрическим методом — 4,2%. Повторяемость (сходимость) результатов составила: 1% (по максимальному относительному стандартному откло-

нению) — при концентрации частиц порядка 10 тыс. в 1 мл и 7,6% — для концентрации 300 частиц в 1 мл. Показана линейность методики (коэффициент корреляции линейной зависимости более 0,99).

Применение модифицированной методики позволит оценить весь требуемый диапазон размеров невидимых механических включений при оценке качества растворов для парентерального введения по показателю «Невидимые механические включения».

Вклад авторов. **А. А. Воропаев** — идея и дизайн исследования, экспериментальная работа с набором суспензий стандартных латексных частиц, обобщение экспериментальных данных, написание текста; **О. В. Фадейкина** — концепция, уточнение дизайна исследований, экспериментальная работа со стандартным образцом счетной концентрации, анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка результатов; **Д. С. Давыдов** — разработка дизайна исследования, консультативная помощь в анализе результатов и оценке состояния проблемы, анализ и интерпретация результатов; **А. А. Мовсесянц** — консультативная помощь в анализе результатов и окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. **Andrey A. Voropaev**—elaboration of the study idea and design, experimental work with suspensions of reference latex particles, summarising of experimental data, writing of the text; **Olga V. Fadeikina**—elaboration of the study concept, refinement of the study design, experimental work with the particle count reference standard, analysis, interpretation, and statistical processing of the results; **Dmitry S. Davydov**—elaboration of the study design, advisory assistance in the analysis of the results and assessment of the state of the problem, analysis and interpretation of the results; **Artashes A. Movsesyants**—advisory assistance in the analysis of the results, approval of the final version 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.

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.

Об авторах / Authors

Воропаев Андрей Андреевич. Andrey A. Voropaev. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук. Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук. Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1768-1362>

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф. Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Статья поступила 08.10.2020

После доработки 27.05.2021

Принята к публикации 10.06.2021

Конфликт интересов. А. А. Мовсесянц является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Artashes A. Movsesyants is member of the Editorial board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Воропаев АА, Фадейкина ОВ, Ермолаева ТН, Давыдов ДС, Кудашева ЭЮ. Оценка возможности применения метода Култера (электрочувствительных зон) для определения невидимых механических включений в препаратах крови человека отечественного производства. *Антибиотики и химиотерапия*. 2017;62(7–8):32–7. [Voropaev AA, Fadeikina OV, Ermolaeva TN, Davydov DS, Kudashева EY. The assessment of the possibility to use the Coulter's method (electrosensitive zones) for identification of invisible particulate matter in human blood-derived products produced in Russia. *Antibiotiki i Khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2017;62(7–8):32–7 (In Russ.)]
2. Barnard J, Rhyner M, Carpenter J. Critical evaluation and guidance for using the Coulter method for counting subvisible particles in protein solutions. *J Pharm Sci*. 2012;101(1):140–53. <https://doi.org/10.1002/jps.22732>
3. Новик ЕС, Доренская АВ, Борисова НА, Гунар ОВ. Особенности анализа лекарственных препаратов для парентерального применения методом электрочувствительных зон. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(2):123–7. [Novik ES, Dorenskaya AV, Borisova NA, Gunar OV. Aspects of medicines quality evaluation by electrical sensing zone method. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(2):123–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-2-123-127>
4. Narhi L, Jiang Y, Cao S, Benedek K, Shnek D. A critical review of analytical methods for subvisible and visible particles. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009;10(4):373–81. <https://doi.org/10.2174/138920109788488905>
5. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. Пер. с англ. М.: Практика; 1998. [Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994]
6. Johnson JB. Thermal agitation of electricity in conductors. *Physical Review*. 1928;32(1):97–109. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.32.97>

Received 8 October 2020

Revised 27 May 2021

Accepted 10 June 2021

Действие препарата Кагоцел® на экспрессию генов Toll-подобных рецепторов системы врожденного иммунитета в THP-1 моноцитах человека с разным уровнем дифференцировки

Т. М. Соколова*, В. В. Полосков

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

Препарат Кагоцел® применяется в России для лечения вирусных инфекций. По химической структуре субстанция препарата Кагоцел® представляет собой сополимер полифенола госсипола с карбоксиметилцеллюлозой. Кагоцел® был исследован на наличие противовирусной и цитокининдуцирующей активности, а также изучено его токсическое действие. **Цель работы:** изучение действия субстанции Кагоцел на индукцию экспрессии генов Toll-подобных рецепторов (TLR) системы врожденного иммунитета в культуре клеток острого моноцитарного лейкоза человека линии THP-1 с разным уровнем дифференцировки. **Материалы и методы:** действие субстанции Кагоцел исследовали в концентрациях 0,2 и 2 мг/мл в отношении клеток линии THP-1 с разным уровнем дифференцировки — недифференцированных моноцитов и дифференцированных в макрофагоподобные клетки. Сравнительный анализ активности генов *TLR 2, 3, 4, 7, 8, 9* проводили количественным методом ОТ-ПЦР. Определены стандартные отклонения уровней экспрессии генов в опытных образцах клеток ($2^{\Delta\Delta Cq} \pm SD$) относительно экспрессии в контроле. **Результаты:** субстанция Кагоцел в концентрации 0,2 мг/мл индуцировала в THP-1 моноцитах активацию экспрессии *TLR2* в 3,5 раза, *TLR3* в 2 раза, *TLR4* в 1,6 раза, а в концентрации 2 мг/мл — дополнительно генов *TLR7* и *TLR8* в 1,4 раза, *TLR9* в 2 раза. В THP-1 моноцитах, частично дифференцированных в макрофагоподобные клетки, уровни индукции *TLR2, TLR3, TLR9* были достоверно выше, и наибольший уровень стимуляции наблюдался для *TLR2* (в 8 раз). **Выводы:** полученные результаты характеризуют Кагоцел® как стимулятор генов *TLR* в линии клеток THP-1. Показано расширение спектра индуцированных генов *TLR* в THP-1 моноцитах при повышении концентрации препарата. Дифференцировка THP-1 моноцитов в макрофагоподобные клетки дополнительно усиливает восприимчивость к Кагоцелу®. Позитивная регуляция активности генов *TLR* может объяснять проявляемые препаратом Кагоцел® антивирусные и интерферон-индуцирующие свойства и также указывает на дополнительные возможности широкого применения при иммунопатологиях различного происхождения.

Ключевые слова: препарат Кагоцел®; врожденный иммунитет; TLR; экспрессия генов; дифференцировка THP-1 моноцитов

Для цитирования: Соколова ТМ, Полосков ВВ. Действие препарата Кагоцел® на экспрессию генов Toll-подобных рецепторов системы врожденного иммунитета в THP-1 моноцитах человека с разным уровнем дифференцировки. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(2):116–121. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-116-121>

* **Контактное лицо:** Соколова Татьяна Михайловна; tmsokolovavir@mail.ru

The effect of Kagocel® on gene expression of Toll-like receptors of innate immunity in THP-1 human monocytes with different levels of differentiation

T. M. Sokolova*, V. V. Poloskov

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya,
18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

Kagocel® is used in Russia for the treatment of viral infections. In terms of its chemical structure, Kagocel® active ingredient is a copolymer of gossypol polyphenol and carboxymethylcellulose. The study investigated antiviral and cytokine-inducing activity of Kagocel®, as well as its toxic effects. **The aim of the study** was to investigate the effect of Kagocel® active ingredient on the induction of expression of the innate immune system receptor genes (Toll-like receptors, TLR) in the THP-1 human acute monocytic leukemia cell line with different levels of differentiation. **Materials and methods:** the effect of Kagocel active ingredient was investigated at the concentrations of 0.2 and 2 mg/mL in the THP-1 human acute monocytic leukemia cell line with different levels of differentiation: non-differentiated monocytes, and monocytes differentiated into macrophage-like cells. Comparative analysis of the activity of *TLR 2, 3, 4, 7, 8, 9* genes was carried out by quantitative RT-PCR. The study determined standard deviations of the levels of gene expression in the experimental cells ($2^{\Delta\Delta Cq} \pm SD$) relative to the expression in the control cells. **Results:** Kagocel active ingredient at the concentration of 0.2 mg/mL induced activation of *TLR2* expression in THP-1 monocytes by 3.5 times, *TLR3* by 2 times, *TLR4* by 1.6 times, and at the concentration of 2 mg/mL also induced activation of *TLR7* and *TLR8* by 1.4 times, and *TLR9* by 2 times. The levels of *TLR2, TLR3, TLR9* induction were significantly higher in THP-1 monocytes partially differentiated into macrophage-like cells, and the highest stimulation level was observed for *TLR2* (8 times). **Conclusions:** the results obtained characterise Kagocel® as a stimulator of *TLR* genes in the THP-1 cell line. The number of *TLR* genes induced in THP-1 monocytes was shown to increase with the increase in the product concentration. THP-1 monocyte differentiation into macrophage-like cells enhances susceptibility to Kagocel®. The positive regulation of *TLR* genes activity may account for antiviral

and interferon-inducing properties of Kagocel®, and also suggests the possibility of expanding the use of the product for various immune-associated diseases.

Key words: Kagocel® preparation; innate immunity; TLR; gene expression; differentiation of THP-1 monocytes

For citation: Sokolova TM, Poloskov VV. The effect of Kagocel® on gene expression of Toll-like receptors of innate immunity in THP-1 human monocytes with different levels of differentiation. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(2):116–121. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-116-121>

* **Corresponding author:** Tatyana M. Sokolova; tmsokolovavir@mail.ru

Российский лекарственный препарат Кагоцел® относится к группе так называемых «индукторов интерферона (ИФН)» [1]. Механизмы ИФН-индуцирующей активности препарата Кагоцел® неизвестны, но именно образованием интерферонов объясняют противовирусное действие препарата. Субстанция Кагоцел — сополимер полифенола госсипола и карбоксиметилцеллюлозы с молекулярной массой преимущественно 1–80 кДа. Основным действующим веществом считается госсипол, обладающий токсичностью в свободном виде [2]. Содержание госсипола в полимере составляет не более 3%. Ковалентная химическая связь госсипола с карбоксиметилцеллюлозой прочная и исключает наличие свободного госсипола в субстанции [3]. Карбоксиметилцеллюлоза снижает токсичность госсипола и обеспечивает мембранный контакт препарата с клеточной поверхностью. В клинических исследованиях была подтверждена безопасность препарата Кагоцел®, в настоящее время он широко применяется в России для профилактики и лечения респираторных вирусных инфекций и герпеса [4, 5].

Кагоцел® относится к сложным макромолекулярным соединениям, механизм действия которых может включать несколько видов биологических активностей за счет взаимодействия с разными химическими структурами (принцип неопределенности) [6].

Механизмы противоопухолевого и противовирусного действия производных госсипола и его (+) и (-) энантиомеров активно изучаются в настоящее время [7]. Биологическую активность госсипола связывают с действием на митохондриальный путь апоптоза, регуляцией активности белка p53 и протоонкогена Bcl-2, нарушением функций вирусных белков gp41 вируса иммунодефицита человека типа 1 и гемагглютинаина HA2 вируса гриппа субтипа H5N1 [8, 9]. Противовирусное действие субстанции препарата Кагоцел® изучено на пандемических и сезонных (H1N1pdm09 и H3N2) штаммах вируса гриппа А в чувствительных клетках [10].

По нашим данным [11, 12] Кагоцел® повышал экспрессию генов системы ИФН и апоптоза, а также синтез провоспалительных цитокинов в культурах лимфоцитов и эмбриональных фибробластов человека. По данным литературы Кагоцел® также стимулировал пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга мышей и модулировал синтез провоспалительных цитокинов при бактериальной инфекции мышей [13, 14]. Характер действия препарата Кагоцел® на мышинных МСК и спектр цитокиновых реакций свидетельствовали о сходстве с механизмом действия лигандов NOD-подобных и Toll-подобных рецепторов (Toll-like ресепторов, TLR) врожденного иммунитета.

Однако специальных исследований индукции препаратом Кагоцел® TLR и активации их генов в клетках человека проведено ранее не было.

Семейство эволюционно закрепленных TLR врожденного иммунитета играет важную сигнальную роль в защите клеток от вирусных патогенов и включает механизм индукции синтеза ИФН и противовирусных белков [15]. При этом гены TLR и группы противовирусных белков-ферментов сами являются ИФН-регулируемыми [16]. Агонистами TLR, наряду со структурами

патогенов, также могут быть разные природные и синтетические химические соединения, имеющие структурные отличия от клеточных молекул [17]. Особый интерес представляют известные и вновь создаваемые препараты ИФН-индукторов, обладающие противовирусной активностью и свойствами агонистов TLR врожденного иммунитета. Изучение молекулярных механизмов действия биопрепаратов на систему врожденного иммунитета необходимо для эффективного применения их в медицине как средств профилактики и лечения вирусных заболеваний. Изучение экспрессии генов TLR и RIG-подобных рецепторов (RLR) врожденного иммунитета и процессов сигнальной трансдукции имеет значение при многих видах иммунной патологии, вызываемой вирусными и бактериальными инфекциями, онкологическими и аутоиммунными заболеваниями.

Ранее на чувствительной клеточной модели THP-1 моноцитов нами была изучена группа препаратов рекомбинантных ИФН, ИФН-индукторов и иммуномодуляторов, которые оказались стимуляторами определенных видов генов TLR и провоспалительных цитокинов [18–20]. Однако препарат Кагоцел® как стимулятор экспрессии генов TLR не был изучен.

Цель работы — изучение действия субстанции Кагоцел на индукцию экспрессии генов TLR системы врожденного иммунитета в культуре клеток острого моноцитарного лейкоза человека линии THP-1 с разным уровнем дифференцировки. Для решения поставленной цели проводилось сравнительное изучение сигнальных реакций генов TLR на воздействие субстанции Кагоцел на чувствительных модельных клетках THP-1 — недифференцированных THP-1 моноцитах [21] и THP-1 моноцитах, стимулированных к дифференцировке в макрофагоподобные клетки [22].

Материалы и методы

В работе использовали перевиваемую линию клеток острого моноцитарного лейкоза человека THP-1 (ATCC-TIB-202), полученную в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. THP-1 моноциты культивировали в питательной среде RPMI-1640, содержащей глютамин, 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотик гентамицин («ПанЭко», Россия). Диплоидные фибробласты человека (линия ФЛЭЧ-977, Медико-генетический научный центр, Москва) культивировали в питательной среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой и гентамицином. THP-1 моноциты стимулировали к дифференцировке добавлением в питательную среду реагента Цитокин-Стимул-Бест («Вектор-Бест», Россия). Приготовленный по инструкции реагент содержал фитогемагглютинин (ФГА) 4 мкг, конканавалин А 4 мкг (Кона), липополисахарид (ЛПС) 2 мкг — лиганд рецептора TLR4. Культивирование с реагентом на протяжении 1–4 сут вызывало постепенную адгезию и дифференцировку клеток в макрофагоподобные [22]. Субстанцию Кагоцел (ООО «Ниармедик Плюс», Россия) растворяли в питательной среде RPMI-1640 и исследовали на THP-1 моноцитах в концентрациях 0,2 и 2 мг/мл. На линии ФЛЭЧ-977 Кагоцел исследовали в концентрациях 0,18 и 0,75 мг/мл, не оказывающих цитодеструктивного действия, в течение 24 ч при 37 °C.

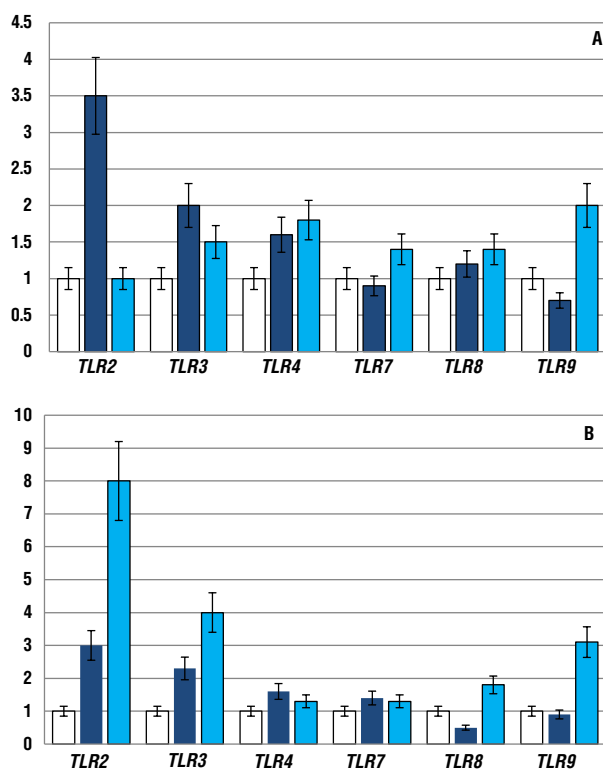


Рис. 1. Действие субстанции Кагоцел на экспрессию генов *TLR* в клеточной линии THP-1. По оси абсцисс – гены *TLR*, по оси ординат – кратность стимуляции транскрипции генов *TLR* после добавления субстанции Кагоцел. □ — контроль; ■ — субстанция Кагоцел 0,2 мг/мл; ■ — субстанция Кагоцел 2 мг/мл. А — недифференцированные THP-1 моноциты (опыт 1); В — THP-1 моноциты, дифференцированные в макрофагоподобные клетки реагентом Цитокин-Стимул-Бест (опыт 2). Данные и стандартные отклонения ($\pm SD$) представлены в виде средних значений 3 опытов.

Fig. 1. The effect of Kagocel active ingredient on the expression of *TLR* genes in the THP-1 cell line. X axis — *TLR* genes, Y axis — multiplicity factor for *TLR* gene transcription stimulation after addition of Kagocel. □ control; ■ Kagocel active ingredient, 0.2 mg/mL; ■ Kagocel active ingredient, 2 mg/mL. A—non-differentiated THP-1 monocytes (experiment 1); B—THP-1 monocytes differentiated into macrophage-like cells by Cytokine-Stimul-Best reagent (experiment 2). Data and standard deviations ($\pm SD$) are presented as a mean of 3 experiments.

Эксперименты проводили параллельно на двух популяциях клеточной культуры THP-1: недифференцированные THP-1 моноциты (опыт 1 и контроль 1) и THP-1 моноциты, дифференцированные в макрофагоподобные клетки после добавления реагента Цитокин-Стимул-Бест (опыт 2 и контроль 2). К опытным образцам клеток добавляли субстанцию Кагоцел, к контрольным — субстанцию не добавляли. Опытные и контрольные клетки в количестве 5×10^5 (подсчет клеток производили в автоматическом счетчике клеток BioRad TC-20, США, с добавлением красителя — трипановый синий) инкубировали 24 ч при 37 °C в питательной среде объемом 5 мл. Процент жизнеспособных клеток оценивали с использованием автоматического счетчика BioRad TC-20 с красителем трипановым синим. Затем клетки осаждали центрифугированием и использовали для выделения РНК.

Определение уровней экспрессии генов *TLR*. Суммарную РНК выделяли с помощью реагента Purzol (Bio-Rad, США) согласно инструкции, остаточную ДНК удаляли реагентом

RNA-free (Ambion, США). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) и количественную ПЦР проводили с использованием пар специфических олигонуклеотидных праймеров к мРНК *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8* и *TLR9*, как описано ранее [18–20]. ПЦР выполняли на амплификаторе CFX-96 (Bio-Rad, США) с реакционной смесью SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США). Количество ДНК-амплификатов оценивали по пороговым циклам (C_q) логарифмической фазы синтеза. Данные обрабатывали в программе CFX Manager Software Gene expression analysis (Bio-Rad, США). Изменения активности генов ($2^{\Delta\Delta C_q}$) в опытных образцах клеток определяли относительно контрольных, принятых равными 1. Данные кратности стимуляции активности генов и стандартные отклонения ($\pm SD$) представлены в виде средних значений трех опытов. Достоверность различий в сравниваемых группах оценивали с применением критерия Стьюдента в программе MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия) и *U*-критерия Манна-Уитни при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В человеческих моноцитах представлены все 10 известных видов *TLR* [15, 16]. В THP-1 моноцитах методом количественной ОТ-ПЦР определена конститутивная экспрессия генов 6 видов *TLR*: *TLR2* и *TLR4*, представленных на поверхности клеток, и *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, локализованных в эндосомах. Установлено, что уровни транскрипции исследованных генов *TLR* в THP-1 моноцитах существенно отличаются. Наиболее транскрипционно-активными в THP-1 моноцитах являются гены *TLR4* и *TLR8* ($C_q 22–26$) и наименее — гены *TLR2*, *TLR3*, *TLR7*, *TLR9* ($C_q 30–40$).

Ранее нами показано, что THP-1 моноциты под действием реагента Цитокин-Стимул-Бест дифференцируются в макрофагоподобные клетки и это вызывает преимущественно увеличение транскрипционной активности генов *TLR3* и *Stat1b*, участвующих в индукции и действии ИФН [22]. В настоящей работе мы сравнили действие субстанции Кагоцел на уровни экспрессии генов *TLR* врожденного иммунитета в недифференцированных THP-1 моноцитах и в THP-1 моноцитах, индуцированных к дифференцировке в макрофаги реагентом Цитокин-Стимул-Бест. Результаты сравнительного анализа экспрессии генов *TLR* в культуре клеток THP-1 (опыты 1 и 2) представлены на рисунках 1А и 1В. Субстанцию Кагоцел в опытах 1 и 2 исследовали в концентрациях 0,2 и 2 мг/мл, не оказывающих цитотоксического действия на клетки THP-1.

В недифференцированных THP-1 моноцитах (опыт 1) субстанция Кагоцела в низкой концентрации 0,2 мг/мл достоверно стимулировала экспрессию генов трех рецепторов: *TLR2* в 3,5 раза, *TLR3* в 2 раза, *TLR4* в 1,6 раза. В высокой концентрации 2 мг/мл субстанция активировала экспрессию генов пяти рецепторов: *TLR3* в 1,5 раза, *TLR4* в 1,8 раза, *TLR7* и *TLR8* в 1,4 раза, *TLR9* в 2 раза. Различия в уровнях генной индукции для двух концентраций субстанции Кагоцел в недифференцированных THP-1 моноцитах по сравнению с контролем клеток достоверны при $p \leq 0,05$. Таким образом, при увеличении концентрации субстанции Кагоцел до 2 мг/мл спектр стимулированных генов *TLR* расширился, но уровни их стимуляции мало изменялись (рис. 1А).

В дифференцированных THP-1 моноцитах (опыт 2) субстанция Кагоцел в высокой концентрации 2 мг/мл действовала эффективнее. Уровни стимуляции генов *TLR2*, *TLR3* и *TLR9* высокой концентрацией субстанции Кагоцел значительно возрастали (различия в уровнях экспрессии генов *TLR2*, *TLR3* и *TLR9* в опытах 1 и 2 достоверны по критерию *U* Манна-Уитни при $p \leq 0,05$). При этом максимально активировалась экспрессия гена

TLR2 (в 8 раз), слабее активировалась экспрессия генов *TLR3* (в 4 раза) и *TLR9* (в 3 раза). В то же время изменения в уровнях экспрессии генов *TLR4*, *TLR7* и *TLR8* в дифференцированных THP-1 моноцитах (опыт 2) по сравнению с недифференцированными THP-1 моноцитами (опыт 1) были или недостоверными, или даже ниже уровня экспрессии этих генов в контрольных клетках. Таким образом, макрофагоподобные клетки избирательно реагировали на субстанцию Кагоцел усилением экспрессии генов *TLR2*, *TLR3* и *TLR9*. Это согласуется с выраженным воспалительным ответом активированных макрофагов и, вероятно, объясняется наличием большего числа этих TLR в макрофагах по сравнению с моноцитами [23]. Рецепторы TLR2, TLR3 и TLR9 имеют разные специфические лиганды, клеточную локализацию, сопряженные белки-адаптеры и сигнальные пути. Возможно, химическая структура Кагоцела способна взаимодействовать сразу с несколькими рецепторами, но более вероятно существование между TLR перекрестных взаимосвязей в сигнальных реакциях [15, 17].

Исследованные гены *TLR* кодируют рецепторы, распознающие структурные компоненты РНК- и ДНК-содержащих вирусов, многие из которых являются возбудителями опасных заболеваний. От уровней экспрессии рецепторов врожденного иммунитета во многом зависят восприимчивость, характер развития и исход инфекционного процесса в организме [15].

Вместе с тем процессы индукции *TLR* и действия ИФН между собой взаимосвязаны, так как уровни экспрессии генов *TLR* регулируются синтезированными ИФН [16]. В дальнейшем необходимо сопоставить активацию препаратом Кагоцел® генов *TLR* с продукцией ИФН и провоспалительных цитокинов в THP-1 моноцитах с разным уровнем дифференцировки. На рисунке 2 представлены данные стимуляции субстанцией Кагоцел экспрессии группы генов системы ИФН в фибробластах человека, полученные нами ранее в виде значений пороговых циклов (Cq) ПЦР [11], дополнительно обработанные и представленные в виде кратности уровней стимуляции генов. Исследования выполнены на высокочувствительной к препаратам ИФН I типа клеточной линии ФЛЭЧ-977, в которой процессы клеточной регуляции на геномном уровне не нарушены. Данные на диплоидных фибробластах человека по ИФН-индуцирующей активности субстанции Кагоцел дополняют исследования иммуномодулирующих свойств на чувствительной модели THP-1 моноцитов, экспрессирующих широкий спектр генов *TLR* и способных к дифференцировке в макрофагоподобные клетки. Кагоцел стимулировал гены ИФН-альфа, ИФН-бета, ИФН-гамма (*IFN-alpha*, *IFN-beta*, *IFN-gamma*) и гены ИФН-зависимых ферментов олигоденилатсинтазы (*OAS*), дсРНК-зависимой протеинкиназы (*dsPKR*), рибонуклеазы L (*RNAse L*) и ИФН-стимулируемого гена 15 (*ISG15*) (рис. 2). С экспрессией генов ИФН-зависимых ферментов связано развитие в клетках противовирусного состояния. Похожие стимулирующие эффекты на гены системы ИФН и синтез провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 бета, ИЛ-6, ИЛ-8) и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа) Кагоцел оказывал в лимфоцитах человека [11, 12].

В литературе опубликованы данные о том, что препарат ЦелАгрип (Radiks, Узбекистан), близкий по химическому составу препарату Кагоцел®, также способен индуцировать гены ИФН и цитокинов в лимфоидных линиях клеток [24, 25]. Таким образом, стимуляция препаратом Кагоцел® экспрессии генов *TLR* в THP-1 моноцитах и генов системы ИФН в клетках различного происхождения согласуются между собой, но нуждаются в подтверждении на модели THP-1 моноцитов.

Остается недоказанным, может ли Кагоцел® как агонист/лиганд напрямую взаимодействовать с определенными

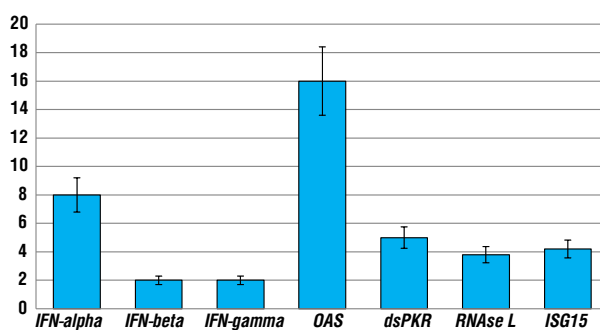


Рис. 2. Действие субстанции Кагоцел на экспрессию генов системы интерферона (ИФН) в фибробластах человека линии ФЛЭЧ-977. По оси абсцисс — гены ИФН (*IFN-alpha*, *IFN-beta*, *IFN-gamma*) и гены ИФН-зависимых антивирусных белков (*OAS*, *dsPKR*, *RNAse L*, *ISG15*). По оси ординат — кратность стимуляции транскрипции генов относительно контрольных клеток. Данные и стандартные отклонения ($\pm SD$) представлены в виде средних значений 3 опытов.

Fig. 2. The effect of Kagocel active ingredient on the expression of interferon system (IFN) genes in human fibroblasts of the FLECH-977 human cell line. X axis—IFN genes (*IFN-alpha*, *IFN-beta*, *IFN-gamma*) and genes of IFN-dependent antiviral proteins (*OAS*, *dsPKR*, *RNAse L*, *ISG15*). Y axis—multiplicity factor for stimulation of gene transcription relative to the control cells. Data and standard deviations ($\pm SD$) are presented as a mean of 3 experiments.

видами TLR. Для получения подобных результатов необходимо проведение специальных рентгеноструктурных исследований. Весьма вероятно, что особенности макромолекулярной структуры препарата Кагоцел® «узнаются» TLR как чужеродные. Список известных TLR-агонистов продолжает пополняться новыми природными и синтетическими соединениями [17]. Среди большой группы иммуномодуляторов уже обнаружены соединения, отличающиеся от канонических TLR-агонистов химической структурой, но также способные к прямому взаимодействию с TLR [26].

Выводы

Субстанция препарата Кагоцел® является активатором генов *TLR* врожденного иммунитета, которые запускают сигнальные механизмы «узнавания» патогенов и приводят к синтезу провоспалительных цитокинов и ИФН. Способность к TLR-активации является несомненным достоинством препарата, расширяющим диапазон его применения при вирусных и бактериальных инфекциях. Стимуляция препаратом Кагоцел® экспрессии генов *TLR* в моноцитах и макрофагах повышает их чувствительность к патогенам разной природы и вызывает более сильный иммунный ответ в организме. Субстанция препарата Кагоцел® в концентрации 0,2 мг/мл индуцировала в THP-1 моноцитах активацию экспрессии *TLR2* в 3,5 раза, *TLR3* в 2 раза, *TLR4* в 1,6 раза, а в концентрации 2 мг/мл — дополнительно генов *TLR7* и *TLR8* в 1,4 раза, *TLR9* в 2 раза. В THP-1 моноцитах, частично дифференцированных в макрофагоподобные клетки, уровни индукции *TLR2*, *TLR3*, *TLR9* были достоверно выше, и наибольший уровень стимуляции наблюдался для *TLR2* (в 8 раз). Макрофаги имеют определяющее значение в ранних защитных реакциях на вирусные патогены и оказывают влияние на дендритные клетки и функции Т- и В-лимфоцитов. Информация о сигнальных рецепторах врожденного иммунитета является важной характеристикой применяемых в медицине антивирусных препаратов и вакцин.

Вклад авторов. Т. М. Соколова — дизайн исследования, эксперименты по изоляции РНК и по постановке реакции обратной транскрипции, анализ результатов работы, написание и редактирование текста статьи; В. В. Полосков — культивирование клеток, проведение ПЦР и обработка полученных данных, написание текста статьи.

Authors' contributions. Tatyana M. Sokolova—elaboration of the study design, isolation of RNA, performance of the reverse transcription reaction test, analysis of the study results, writing and editing of the text; Vladislav V. Poloskov—cell culture, performing PCR experiments, processing of the obtained data, writing of the text.

Благодарности. Авторы выражают благодарность академику РАН, профессору Ф. И. Ершову за предоставление субстанции Кагоцел и канд. мед. наук А. Н. Шувалову за участие в обсуждении результатов.

Acknowledgements. The authors are grateful to academician, member of the Russian Academy of Sciences, professor F. I. Ershov for provision of Kagocel active ingredient, and to A. N. Shuvalov, Cand. Sci. (Med.), for participation in the discussion of the study results.

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. Нестеренко ВГ, Суслов АП, Дятлов ВА, Круппа ИС. Полимерные производные госсипола, способ их получения и фармацевтическая композиция на их основе. Патент Российской Федерации № 2577539; 2016. [Nesterenko VG, Suslov AP, Dyatlov VA, Kruppa IS. Gossypol polymer derivatives, methods for production thereof and pharmaceutical composition based thereon. Patent of the Russian Federation No. 2577539; 2016 (In Russ.)]
2. Keshmiri-Neghab H, Goliaei B. Therapeutic potential of gossypol: an overview. *Pharm Biol.* 2014;52(1):124–8. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.832776>
3. Киселева ИВ, Рудой БА, Пирогов АВ, Толмачева НГ. Валидация ВЭЖХ-методики определения госсипола в субстанции «Кагоцел». *Фармация.* 2016;65(8):18–24. [Kiseleva IV, Rudoy BA, Pirogov AV, Tolmacheva NG. Validation of HPLC procedure for detection of gossypol in the substance Kagocel. *Farmatsiya = Pharmacy.* 2016;65(8):18–24 (In Russ.)]
4. Боровская ТГ. Безопасность отечественного противовирусного препарата Кагоцел. *Терапевтический архив.* 2017;89(11):93–9. [Borovskaya TG. Safety of the Russian antiviral drug Kagocel. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive.* 2017;89(11):93–9 (In Russ.)] <http://doi.org/10.17116/terarkh2017891193-99>
5. Сологуб ТВ, Цветков ВВ. Кагоцел в терапии гриппа и острых респираторных вирусных инфекций: анализ и систематизация данных по результатам доклинических и клинических исследований. *Терапевтический архив.* 2017;89(8):113–9. [Sologub TV, Tsvetkov VV. Kagocel in the therapy of influenza and acute respiratory viral infections: Data analysis and systematization from the results of preclinical and clinical trials. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive.* 2017;89(8):113–9 (In Russ.)] <http://doi.org/10.17116/terarkh2017898113-119>
6. Нестеренко ВГ. Принцип неопределенности в биологии и медицине. *Фармация.* 2020;69(6):5–7. [Nesterenko VG. The uncertainty principle in biology and medicine. *Farmatsiya = Pharmacy.* 2020;69(6):5–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-06-01>
7. Zeng Y, Ma J, Xu L, Wu D. Natural product gossypol and its derivatives in precision cancer medicine. *Curr Med Chem.* 2019;26(10):1849–73. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170523123655>
8. Barba-Barajas M, Hernández-Flores G, Lerma-Díaz JM, Ortiz-Lazareno PC, Domínguez-Rodríguez JR, Barba-Barajas L, et al. Gossypol induced apoptosis of polymorphonuclear leukocytes and monocytes: involvement of mitochondrial pathway and reactive oxygen species. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2009;31(2):320–30. <https://doi.org/10.1080/08923970902718049>
9. Yang J, Chen G, Li LL, Pan W, Zhang F, Yang J, et al. Synthesis and anti-H5N1 activity of chiral gossypol derivatives and its analogs implicated by a viral entry blocking mechanism. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(9):2619–23. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.02.101>
10. Федякина ИТ, Коноплева МВ, Прошина ЕС, Линник ЕВ, Никитина НИ. Противовирусное действие субстанции «Кагоцел» in vitro в отношении вирусов гриппа H1N1, H1N1pdm09 и H3N2. *Вопросы вирусологии.* 2019;64(3):125–31. [Fediakina IT, Konopleva MV, Proshina ES, Linnik EV, Nikitina NI. Antiviral effect of “Kagocel” substance in vitro on influenza viruses H1N1, H1N1pdm09 and H3N2. *Voprosy virusologii = Problems of Virology.* 2019;64(3):125–31 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-125-131>
11. Соколова ТМ, Шувалов АН, Колодяжная ЛВ, Оспельникова ТП, Ершов ФИ. Механизмы действия препарата «Кагоцел» в клетках человека. Сообщение 1. Регуляция транскрипции генов системы интерферона и апоптоза. В кн.: Ершов ФИ, Наровлянский АН, ред. *Сборник научных статей. Интерферон — 2011.* М.; 2012. С. 389–401. [Sokolova TM, Shuvalov AN, Kolodyazhnaya LV, Ospelnikova TP, Ershov FI. The mechanisms of action of the drug “Kagocel” in human cells. Communication 1. Regulation of transcription of genes of the interferon system and apoptosis. In: Ershov FI, Narovlyanskiy AN, eds. *Collection of Proceedings. Interferon — 2011.* Moscow; 2012. P. 389–401 (In Russ.)]
12. Оспельникова ТП, Соколова ТМ, Колодяжная ЛВ, Миронова ТВ, Чкадуа ГЗ, Ершов ФИ. Механизмы действия препарата «Кагоцел» в клетках человека. Сообщение 2. Синтез иммуномодулирующих цитокинов. В кн.: Ершов ФИ, Наровлянский АН, ред. *Сборник научных статей. Интерферон — 2011.* М.; 2012. С. 401–7. [Ospelnikova TP, Sokolova TM, Kolodyazhnaya LV, Mironova TV, Chkadua GZ, Ershov FI. Mechanisms of action of the preparation “Kagocel” in human cells. Communication 2. Synthesis of immunomodulatory cytokines. In: Ershov FI, Narovlyanskiy AN, eds. *Collection of scientific articles. Interferon — 2011.* Moscow; 2012. P. 401–7 (In Russ.)]
13. Горская ЮФ, Грабко ВИ, Коноплева МВ, Суслов АП, Нестеренко ВГ. Влияние Кагоцела® на численность мультипотентных стромальных клеток, экспрессию генов цитокинов в первичных культурах стромальных клеток костного мозга, а также на концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышей линии СВА. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015;159(2):200–4. [Gorskaya YF, Grabko VI, Konopleva MV, Suslov AP, Nesterenko VG. Effects of Kagocel® on the counts of multipotent stromal cells, expression of cytokine genes in primary cultures of bone marrow stromal cells, and serum cytokine concentrations in CBA mice. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2015;159(2):240–4 (In Russ.)] <https://doi.org/10.1007/s10517-015-2932-7>
14. Горская ЮФ, Семенова ЕН, Грабко ВИ, Суслов АП, Нестеренко ВГ. Противовирусный препарат «Кагоцел®» оказывает модулирующее действие на цитокиновый профиль сыворотки крови мышей линии СВА, формирующийся под действием комплекса антигенов *S. typhimurium* in vivo. *Иммунология.* 2014;35(5):272–5. [Gorskaya UF, Semyonova EN, Grabko VI, Suslov AP, Nesterenko VG. Antivirus preparation Kagocel® exerts modulation multidirectional influence on blood serum cytokines profile forming by *S. typhimurium* antigen complex injection in

- CBA mice. *Immunologiya = Immunology*. 2014;35(5):272–5 (In Russ.)]
15. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:257–90. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
 16. Khoo JJ, Forster S, Mansell A. Toll-like receptors as interferon-regulated genes and their role in disease. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(1):13–25. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0095>
 17. Hussein WM, Liu T-Yu, Skwarczynski M, Toth I. Toll-like receptor agonists: a patent review (2011–2013). *Expert Opin Ther Pat*. 2014;24(4):453–70. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.880691>
 18. Соколова ТМ, Полосков ВВ, Бурова ОС, Шувалов АН, Соколова ЗА, Иншаков АН и др. Действие интерферонов и индукторов интерферонов на экспрессию генов рецепторов TLR/RLR и дифференцировку опухолевых линий клеток THP-1 и HCT-116. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(3):28–33. [Sokolova TM, Poloskov VV, Burova OS, Shuvalov AN, Sokolova ZA, Inshaikov AN, et al. Action of interferons and IFN-inducers on TLR/RLR genes expression and differentiation of tumor cell lines THP-1 and HCT-116. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2016;15(3):28–33 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2016-15-3-28-33>
 19. Соколова ТМ, Полосков ВВ, Шувалов АН, Бурова ОС, Соколова ЗА. Сигнальные TLR/RLR-механизмы иммуномодулирующего действия препаратов ингавирин и тимоген. *Российский биотерапевтический журнал*. 2019;18(1):60–6. [Sokolova TM, Poloskov VV, Shuvalov AN, Burova OS, Sokolova ZA. Signalling TLR/RLR-mechanisms of immunomodulating action of ingavirin and thymogen preparations. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2019;18(1):60–6 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2019-18-1-60-66>
 20. Соколова ТМ, Шувалов АН, Полосков ВВ, Ершов ФИ. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами Ридостин, Циклоферон и Ингавирин. *Цитокины и воспаление*. 2015;14(2):26–34. [Sokolova TM, Shuvalov AN, Poloskov VV, Ershov FI. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*. 2015;14(2):26–34 (In Russ.)]
 21. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
 22. Полосков ВВ, Соколова ЗА, Бурова ОС, Шувалов АН, Соколова ТМ. Действие митогенов на дифференцировку клеток THP-1 и экспрессию TLR/RLR-генов. *Цитокины и воспаление*. 2016;15(2):161–5. [Poloskov VV, Sokolova ZA, Burova OS, Shuvalov AN, Sokolova TM. The effect of mitogens on the differentiation of THP-1 cells and the expression of TLR/RLR genes. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*. 2016;15(2):161–5 (In Russ.)]
 23. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
 24. Наровлянский АН, Полосков ВВ, Иванова АМ, Мезенцева МВ, Суетина ИА, Руссу ЛИ и др. Интерферон-регулирующая активность препарата ЦелАгрип и его влияние на образование активных форм кислорода и экспрессию генов врожденного иммунитета в перевиваемых культурах клеток лимфомы Бёркитта. *Вопросы вирусологии*. 2020;65(2):87–94. [Narovlyansky AN, Poloskov VV, Ivanova AM, Mezentseva MV, Suetina IA, Russu LI, et al. Interferon-regulating activity of the CelAgrip drug and its influence on the formation of reactive oxygen species and expression of innate immunity genes in Burkitt's lymphoma cell cultures. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2020;65(2):87–94 (In Russ.)] <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-87-94>
 25. Наровлянский АН, Мезенцева МВ, Суетина ИА, Руссу ЛИ, Иванова АМ, Полосков ВВ и др. Цитокин-регулирующая активность противовирусного препарата ЦелАгрип в перевиваемых В-клеточных линиях лимфомы Беркитта. *Вопросы вирусологии*. 2019;64(4):165–72. [Narovlyanskiy AN, Mezentseva MV, Suetina IA, Russu LI, Ivanova AM, Poloskov VV, et al. Cytokine-regulating activity of anti-virus preparation CelAgripus in Burkitt's lymphoma stable B-cell lines. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2019;64(4):165–72 (In Russ.)] <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172>
 26. Su L, Wang Y, Wang J, Mifune Y, Morin MD, Jones BT, et al. Structural basis of TLR2/TLR1 activation by the synthetic agonist Diprovocim. *J Med Chem*. 2019;62(6):2938–49. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01583>

Об авторах / Authors

Соколова Татьяна Михайловна, д-р биол. наук. *Tatyana M. Sokolova*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0957-4513>

Полосков Владислав Васильевич, канд. мед. наук. *Vladislav V. Poloskov*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0001-2493>

Поступила 19.03.2021

После доработки 21.05.2021

Принята к публикации 10.06.2021

Received 19 March 2021

Revised 21 May 2021

Accepted 10 June 2021

Методические аспекты разработки нормативной документации на биомедицинский клеточный продукт

Е. В. Мельникова^{1,*}, О. А. Рачинская¹, О. В. Меркулова¹, И. С. Семенова¹, Е. О. Кожевникова¹, В. А. Меркулов^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

²Федеральное 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

Составление нормативной документации (НД) на биомедицинский клеточный продукт (БМКП) — важный этап подготовки документов для его государственной регистрации. НД является основным документом регистрационного досье, в соответствии с которым проводится экспертиза качества БМКП. Требования к содержанию НД, в том числе спецификации, регламентируются соответствующими нормативно-правовыми актами, обеспечивающими действие Федерального закона от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». Однако, учитывая новизну правового поля в отношении БМКП как инновационных средств для медицинского применения в Российской Федерации, особенность их состава (наличие жизнеспособных клеток человека), отличного от традиционных лекарственных средств, отсутствие опыта их государственной регистрации, необходимо рассмотрение особенностей содержания НД на БМКП. Цель работы — определение методических подходов к разработке и формированию нормативной документации на БМКП в соответствии с национальным законодательством и с учетом опыта зарубежных регуляторных органов при рассмотрении материалов, подаваемых заявителем для осуществления государственной регистрации аналогов БМКП. В статье обобщены требования национального законодательства к описанию показателей качества, методов и методик контроля клеточной линии, входящей в состав БМКП. Данные сведения необходимы как для проведения оценки качества образцов БМКП в рамках экспертизы качества, так и для формирования заключения комиссии экспертов. В частности, в статье рассмотрена проблема содержания клеточных и технологических примесей в клеточной линии и готовом БМКП, а также аспекты описания стратегии вирусной безопасности для готового продукта и клеток из системы главного и рабочего банков. Представленные аспекты описания показателей качества и методов их контроля для готового БМКП, а также для клеточной линии, входящей в его состав, могут служить основой для формирования НД разработчиками БМКП.

Ключевые слова: биомедицинский клеточный продукт; клеточная линия; нормативная документация; спецификация; экспертиза качества; показатели качества; регистрационное досье; государственная регистрация

Для цитирования: Мельникова ЕВ, Рачинская ОА, Меркулова ОВ, Семенова ИС, Кожевникова ЕО, Меркулов ВА. Методические аспекты разработки нормативной документации на биомедицинский клеточный продукт. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(2):122–135. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-122-135>

* Контактное лицо: Мельникова Екатерина Валерьевна; melnikovaev@expmed.ru

Methodological aspects of the development of product files for biomedical cell products

E. V. Melnikova^{1,*}, O. A. Rachinskaya¹, O. V. Merkulova¹, I. S. Semenova¹, E. O. Kozhevnikova¹, V. A. Merkulov^{1,2}

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

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

Preparation of a product file (PF) for a biomedical cell product (BCP) is an important stage in the preparation of documents for marketing authorisation. The PF is the main document of a regulatory submission and is used as the basis for BCP quality control. The requirements for the content of a PF, including appropriate specifications, are laid out in the relevant laws and regulations that support Federal Law No. 180-FZ “On Biomedical Cell Products” of 23.06.2016. However, given the novelty of the Russian legislative framework for innovative products for human use represented by BCPs, the specificity of their composition (i.e., components based on viable human cells) which differs significantly from conventional medicines, and lack of marketing authorisation experience—there is a need to examine specific aspects of a BCP PF. The aim of the study was to formulate methodological approaches to the development and preparation of a BCP PF in accordance with the national legislation and taking into account the experience of foreign regulatory authorities in evaluation of regulatory submissions for BCP analogues. The paper summarises the national regulatory requirements for the description of quality characteristics of cell lines used as components in BCPs, as well as test methods and test procedures used for cell line quality control. These data are required both for quality control of BCP samples, and for preparation of the Expert Commission Conclusion. The paper looks into the content of cellular and process-related impurities in

a cell line and a finished BCP, and presents considerations on the description of the viral safety strategy for the finished product and for the cells from the master and working cell banks. The approaches to the presentation of quality characteristics and quality control methods for a finished BCP and for the cell line used in its production could be used by BCP developers for preparation of a PF.

Key words: biomedical cell product; cell line; regulatory documentation; specification; quality control; quality characteristics; regulatory submission; marketing authorisation

For citation: Melnikova EV, Rachinskaya OA, Merkulova OV, Semenova IS, Kozhevnikova EO, Merkulov VA. Methodological aspects of the development of product files for biomedical cell products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(2):122–135. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-122-135>

* **Corresponding author:** Ekaterina V. Melnikova; melnikovaev@expmed.ru

Биомедицинская экспертиза — подтверждение качества, эффективности и безопасности биомедицинского клеточного продукта (БМКП) экспертами экспертного учреждения в рамках его государственной регистрации с целью доступа на национальный фармацевтический рынок. Проведение биомедицинской экспертизы предполагает использование не только национальной нормативно-правовой базы в сфере БМКП, но и накопленных сведений и знаний в области медицины (в том числе в плане понимания молекулярных механизмов патогенеза заболевания, его диагностики и лечения) и фундаментальных наук (клеточной и молекулярной биологии, анатомии, иммунологии, физиологии, биохимии и др.). Кроме того, учитывая отсутствие в настоящее время в Российской Федерации зарегистрированных БМКП, в ходе биомедицинской экспертизы может быть принят во внимание опыт рассмотрения и регистрации аналогов БМКП (препаратов на основе клеток и тканей человека) зарубежными регуляторными органами в части, не противоречащей регуляторной базе России.

Экспертная оценка качества БМКП — подтверждение соответствия БМКП требованиям нормативной документации (НД) на БМКП, проводимое аттестованными экспертами с применением валидированных методик в соответствии с НД. Требования к качеству препарата в НД формирует производитель (заявитель) на основании экспериментальных данных, полученных в ходе разработки. Они должны гарантировать соответствие БМКП своему назначению и исключать риск, связанный с неудовлетворительным качеством БМКП. Результаты экспертизы качества образцов БМКП, методы их контроля, характеристика клеточной линии (КЛ), входящей в состав БМКП, являются объектами для внесения в заключение комиссии экспертов, форма которого регламентирована приказом Минздрава России от 31.01.2017 № 30н¹.

Цель работы — определение методических подходов к разработке и формированию нормативной документации на БМКП в соответствии с национальным законодательством и с учетом опыта зарубежных регуляторных органов при рассмотрении материалов, подаваемых заявителем для осуществления государственной регистрации аналогов БМКП.

Содержание нормативной документации

В соответствии с пп. 136, 137 приказа Минздрава России от 08.08.2018 № 512н² НД на БМКП должна содержать в том числе сведения о его составе, описание основного механизма действия, спецификацию на БМКП, показатели качества с критериями приемлемости и методы их определения. К критериям приемлемости относятся числовые пределы или диапазоны измеряемых величин или другие параметры, используемые в испытаниях.

Спецификация³ представляет собой документ, содержащий сведения о типе (аутологичный, аллогенный, комбинированный) БМКП, его качественном и количественном составе, биологических и иных характеристиках БМКП и клеточной линии (клеточных линий), входящей(их) в его состав. Спецификация составляется на каждый разработанный БМКП, прошедший доклиническое исследование. Таким образом, спецификация на БМКП должна включать сведения о качестве готового продукта, которое должно быть подтверждено в ходе проведения экспертизы качества при государственной регистрации. Характеристика БМКП должна охватывать все компоненты, присутствующие в готовом препарате, в том числе сведения о клеточной(ых) линии(ях) (наименование, происхождение, жизнеспособность, допустимое количественное содержание клеток, идентичность, активность, наличие генетической модификации) и сведения о лекарственных препаратах, фармацевтических субстанциях, медицинских изделиях, вспомогательных веществах (номер регистрационного удостоверения, производитель, номер НД, количественное содержание, обоснование включения в состав БМКП).

Спецификация на биомедицинский клеточный продукт: характеристика клеточной линии

Методические подходы к определению идентичности (подлинности) КЛ и перечень сведений, подлежащих включению в спецификацию по данному показателю, подробно нами описаны ранее [1], подходы к определению активности КЛ — в работе [2]. Контроль качества БМКП по показателю «Жизнеспособность КЛ» должен определять жизнеспособность клеток и ее нижнее пороговое значение. В спецификации должно быть указано количественное содержание общих и жизнеспособных клеток, входящих в состав БМКП. При наличии в составе БМКП медицинского устройства, геля или других носителей в НД должна быть описана методика отделения клеточного компонента от неклеточного для определения жизнеспособности. Определение жизнеспособности клеток возможно и перед объединением клеточного компонента с неклеточным.

БМКП, наряду с целевыми клетками, может содержать клетки, не относящиеся к требуемой популяции, и (или) клетки, находящиеся на разных этапах дифференцировки, то есть являющиеся примесными. Если в соответствии с областью клинического применения БМКП необходим только определенный тип клеток, в спецификации указываются критерии приемлемости для допустимого количества примесных клеток и методы его определения. В случаях, когда для достижения желаемой биологической активности и эффективности БМКП необходима сложная комбинация клеток, эта комбинация должна быть охарактеризована в спецификации с указанием

¹ Приказ Минздрава России от 31.01.2017 № 30н «Об утверждении Правил проведения биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов и форм заключений комиссии экспертов федерального государственного бюджетного учреждения по проведению биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов».

² Приказ Минздрава России от 08.08.2018 № 512н «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами».

³ Приказ Минздрава России от 19.01.2017 № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт».

методов как внутрипроизводственного контроля, так и испытаний при выпуске готовой продукции. Допускается отсутствие данного показателя при незначительном их количестве и в случае наличия данных об отсутствии влияния примесных клеток на эффективность и безопасность продукта, определенных в ходе доклинических исследований (ДКИ), и данных валидации процесса производства, демонстрирующих стабильность процесса получения готового БМКП с содержанием примесных клеток в количестве, не превышающем допустимых пределов.

Например, для разрешенного к медицинскому применению в государствах Европейского союза (ЕС) препарата Spherox (Co.don; ЕС)⁴, согласно опубликованной на сайте Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) информации⁵, в спецификацию включен показатель «Содержание примесных клеток (синовиоцитов)», а также указано, что синовиоциты могут оказывать влияние на эффективность и безопасность препарата Spherox. Что касается препаратов на основе химерных антигенных рецепторов Kymriah (Novartis; США, ЕС)⁶, Yescarta (Kite Pharma, Gilead; США, ЕС)⁷ и Tecartus (Kite Pharma; США, ЕС)⁸, представляющих собой генетически-модифицированные Т-клетки, основными родственными примесями для них считают натуральные киллеры (НК-клетки), содержание которых контролируется в процессе производства, а все остальные популяции клеток (В-клетки, моноциты, гранулоциты, эритроциты из материала лейкофереза) находятся ниже предела обнаружения, что было доказано на этапах разработки и доклинических исследований. Нетрансдуцированные Т-клетки считаются частью продуктов. Для Alofisel (Tigenix; ЕС)⁹ влияние на качество препарата установленных родственных и технологических примесей было изучено на этапе ДКИ и клинических исследований (КИ), поэтому показатель не включен в спецификацию. Препарат Zynteglo (bluebird bio; ЕС)¹⁰ на основе генетически модифицированных CD34⁺ клеток по составу и количеству клеточных примесей был изучен на этапе разработки и валидации процесса производства: было показано, что процент клеточных примесей очень низкий. Важной особенностью препарата JACE (Tissue Engineering Co. (J-TEC); Япония)¹¹ на основе кератиноцитов, препаратов Nepic (Japan

Tissue Engineering Co., Ltd.; Япония)¹² и Holoclar (Holostem Therapie Avanzate S.R.L.; ЕС)¹³ на основе эпителиальных стволовых клеток роговицы является использование при их производстве фидерных клеток — фибробластов мыши (линия 3T3-J2), поэтому в спецификации данных препаратов включен показатель — остаточное содержание фидерных клеток. В препарате Holoclar, целевые клетки которого идентифицируются по наличию маркера р63⁺, другие примесные клетки человека не определялись, так как нестволовые клетки (в том числе терминально дифференцированные эпителиальные клетки роговицы), присутствующие в препарате, способствуют формированию эпителиоподобной структуры и служат своеобразной защитной структурой для целевых клеток¹². Препарат HeartSheet (Terumo Corporation; Япония)¹⁴ на основе миоцитов для лечения тяжелой сердечной недостаточности содержит небольшое количество фибробластов в качестве родственной примеси, определение которых не включено в тесты готового продукта.

Помимо примесей клеточного происхождения КЛ, входящая в состав БМКП, а в конечном итоге и готовый продукт могут содержать и остаточные количества веществ, используемых в процессе производства (культивирование, снятие клеток, криоконсервация), например антибиотика, бычий сывороточный альбумин, трипсин, папаин, диметилсульфоксид (ДМСО) и т. д. Так, для препарата Alofisel в качестве остаточных количеств веществ, которые потенциально могут присутствовать в конечном продукте (отнесены к важным потенциальным рискам), указаны: бензилпенициллин, стрептомицин сульфат, бычий сывороточный альбумин¹⁵. Для препарата Yescarta в спецификации показатель «Чистота» включает, в том числе, определение допустимых содержаний для гентамина и еще двух веществ (названия веществ производителем не раскрываются). В целом же результаты оценки допустимых примесей в препарате Yescarta показали, что принятый производителем диапазон их содержания выше, чем предел идентификации для технологических примесей в конечном продукте¹⁶. Спецификация на готовые препараты Nepic (Japan Tissue Engineering Co., Ltd.; Япония) и JACC (Tissue Engineering Co. (J-TEC); Япония; аутологичные культивированные хондроциты, помещенные

⁴ В скобках после названия препарата дана информация о компании-производителе и регионе регистрации (здесь и далее).

⁵ Assessment report. Spherox (EMA/CHMP/349863/2017). EMA; 2017. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/spherox-epar-public-assessment-report_en.pdf

⁶ Summary basis for regulatory action Template — Kymriah, DLBCL. FDA; 2018. <https://www.fda.gov/media/113215/download>
Assessment report. Kymriah (EMA/485563/2018). EMA; 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/kymriah-epar-public-assessment-report_en.pdf

⁷ Summary basis for regulatory action — Yescarta. FDA; 2017. <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM584335.pdf>
Assessment report. Yescarta (EMA/CHMP/481168/2018). EMA; 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/yescarta-epar-public-assessment-report_en.pdf

⁸ Summary Basis for Regulatory Action. Tecartus. <https://www.fda.gov/media/141093/download>

⁹ Assessment report. Alofisel (EMA/CHMP/64055/2018). EMA; 2018. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/alofisel-epar-public-assessment-report_en.pdf

¹⁰ Assessment report. Zynteglo (EMA/CHMP/56140/2020). EMA; 2019. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zynteglo-epar-public-assessment-report_en.pdf

¹¹ Review Report. JACE; 2007. <http://www.pmda.go.jp/files/000223079.pdf>

¹² Report on the Deliberation Results: Nepic. <https://www.pmda.go.jp/files/000237511.pdf>

¹³ Summary of product characteristics. Holoclar (EMA/6865/2015). EMA; 2015. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/holoclar-epar-product-information_en.pdf

¹⁴ Report on the Deliberation Results: HeartSheet. <https://www.pmda.go.jp/files/000215222.pdf>

¹⁵ Assessment report. Alofisel (EMA/CHMP/64055/2018). EMA; 2018. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/alofisel-epar-public-assessment-report_en.pdf

¹⁶ Summary basis for regulatory action — Yescarta. FDA; 2017. <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM584335.pdf>

Assessment report. Yescarta (EMA/CHMP/481168/2018). EMA; 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/yescarta-epar-public-assessment-report_en.pdf

в гель с ателоколлагеном), включает показатель «Количество остаточного бычьего сывороточного альбумина»¹⁷. Для препарата Spherex производитель идентифицировал соответствующие технологические примеси: ДМСО, папаин, гентамицин и амфотерицин и представил результаты по их содержанию в конечном продукте, полученные в процессе валидации производства. Был сделан вывод, что остаточные количества этих связанных с процессом производства примесей не оказывают влияния на токсикологические эффекты продукта¹⁸.

Необходимо отметить, что в случае составления спецификаций на промежуточные продукты производства БМКП показатель допустимого содержания технологических примесей может быть включен в эти спецификации, а не в спецификацию на готовый БМКП. Спецификации на промежуточные продукты производства следует предоставлять в случае осуществления прерывного производственного процесса, например для векторной конструкции при генетической модификации клеток (как в случае с препаратами Kymriah¹⁹, Yescarta¹⁵, Zyn-teglo²⁰, Strimvelis²¹) или КЛ, подвергающейся криоконсервации, в том числе при создании главного и рабочего банков клеток (как в случае препарата Alofisel²²). В случае осуществления непрерывного производственного процесса предоставляется только спецификация на готовый продукт. Спецификации на промежуточные продукты производства БМКП включаются в технологический регламент производства²³.

В случае генетической модификации КЛ в спецификации необходимо привести описание характера модификации (вирусный вектор, плазмиды, дифференцировка с использованием факторов или др.) и используемые генетические конструкции (тип вектора, факторы дифференцировки и т. д.).

Спецификация на биомедицинский клеточный продукт: показатели и методы контроля качества биомедицинского клеточного продукта

Показатели качества БМКП должны соответствовать форме спецификации²⁴ и быть научно обоснованы (включая анализ рисков по запланированному качеству готового продукта), а методы их оценки должны быть валидированы и обеспечивать получение достоверных результатов. Оценка представленных заявителем в регистрационном досье материалов по валидации аналитических методов контроля качества БМКП должна быть проведена в ходе экспертизы качества и включена в заключение комиссии экспертов²⁵. При изменении метода или внесении нового метода анализа в НД необходима его вали-

дация (полная или сокращенная ревалидация в зависимости от конкретного случая), показывающая, что измененные методы анализа позволяют получать достоверные данные и пригодны для оценки качества БМКП, а также не уступают ранее использованным валидированным методам.

Характеризация БМКП может вызвать затруднение в случае с препаратами, содержащими клетки в сочетании с матрицами, каркасами и инновационными устройствами. Учитывая этот факт, данные о характеристиках БМКП могут включать информацию о его качестве, полученную на критических (контрольных) точках процесса производства. В случае изменений характеристик клеточного или неклеточного компонентов в результате их объединения спецификация должна содержать сведения об этом.

В случае невозможности применения необходимых методов контроля качества на готовом продукте (учитывая особенности хранения/применения, стабильности, объема серий БМКП) допускается использование отдельных методов внутрипроизводственного контроля. Обоснование такой возможности, материалы и данные (включая первичные) по валидации должны содержаться в регистрационном досье.

В НД рекомендуется представить примечание к спецификации, в котором приводятся следующие сведения: описание специфических маркеров, генов и белков, характерных для данной КЛ и подлежащих определению в ходе экспертизы качества (например, маркеров дифференцировки, маркеров принадлежности клеток к определенной популяции, белков, характерных для секрета данных клеток и т. д.); обоснование стратегии контроля качества и обоснование этапа определения того или иного показателя (в случае применения внутрипроизводственного контроля) или обоснование отсутствия контроля показателя «Примеси» (в случае наличия данных, полученных в процессе валидации процесса производства, о неизменности их значений и отсутствии влияния на эффективность и безопасность, определенное в ходе ДКИ).

В таблице 1 представлены сведения из публичного отчета Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) по содержанию спецификации на готовый препарат Kymriah, в которой указаны не только показатели, методы определения и требования к значениям показателей для готового продукта, но и этапы определения показателя (выпускающий или внутрипроизводственный контроль)²⁶.

Помимо сведений о показателях качества, методах и методах их оценки, спецификация должна содержать краткие

¹⁷ Human autologous tissue for transplantation JACC. <https://www.pmda.go.jp/files/000229937.pdf>

Report on the Deliberation Results: Nepic. <https://www.pmda.go.jp/files/000237511.pdf>

¹⁸ Assessment report. Spherex (EMA/CHMP/349863/2017). EMA; 2017. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/spherex-epar-public-assessment-report_en.pdf

¹⁹ Summary basis for regulatory action — Kymriah, DLBCL. FDA; 2018. <https://www.fda.gov/media/113215/download>

²⁰ Assessment report. Zyn-teglo (EMA/CHMP/56140/2020). EMA; 2019. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zyn-teglo-epar-public-assessment-report_en.pdf

²¹ Assessment report. Strimvelis (EMA/CHMP/272303/2016). EMA; 2016. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/strimvelis-epar-public-assessment-report_en.pdf

²² Assessment report. Alofisel (EMA/CHMP/64055/2018). EMA; 2018. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/alofisel-epar-public-assessment-report_en.pdf

²³ Приказ Минздрава России от 08.08.2018 № 512н «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами» (п. 134).

²⁴ Приказ Минздрава России от 19.01.2017 № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт».

²⁵ Приказ Минздрава России от 31.01.2017 № 30н «Об утверждении Правил проведения биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов и форм заключений комиссии экспертов федерального государственного бюджетного учреждения по проведению биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов» (Приложение 2, п. 3.1.19).

²⁶ Summary Basis for Regulatory Action: Kymriah, ALL. FDA; 2017. <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM577221.pdf>

Таблица 1. Спецификация на препарат Kymriah
Table 1. Specifications for Kymriah

Показатель/метод Characteristic/Test	Требование значения показателя готового продукта для коммерческого использования Requirements for the final commercial product	Продукт/этап для анализа Sample used for testing
Описание (внешний вид) Appearance	От бесцветного до слегка желтого цвета Colourless to slightly yellow	Готовый продукт перед добавлением криопротекторов Final product before adding cryoprotectants
Идентичность (наличие экспрессии CAR, определенное методом количественной ПЦР) Identity by CAR q-PCR	—	—
Эффективность трансдукции, количество трансдуцированных клеток (количественная ПЦР) Determination of transduction efficiency by CAR q-PCR	—	—
Определение остаточного содержания гранул, конъюгированных с антителами CD3/CD28, методом микроскопии ^a Determination of residual beads conjugated with CD3/CD28 antibodies by microscopy ^a	—	Перед составлением дозы Prior to dose formulation
Процент жизнеспособных Т-клеток Percentage of viable T-cells	—	Готовый продукт Final product
Жизнеспособность, % Cell viability, %	—	
Процент жизнеспособных CD19 ⁺ В-клеток Percentage of viable CD19 ⁺ B-cells	—	
Общее количество клеток ^b , кл/мл Total cell count ^b , cell/mL	—	
Количество жизнеспособных клеток (рассчитанное) ^b , кл/мл Number of viable cells (calculated) ^b , cell /mL	—	Готовый продукт (после разморозки) Final product (after thawing)
Доза (рассчитанное значение) ^c , кл/кг массы тела: Dose (calculated) ^c , cells/kg body weight: CAR ⁺ жизнеспособных Т-клеток (масса тела ≤ 50 кг) CAR ⁺ viable T cells (body weight ≤ 50 kg) CAR ⁺ жизнеспособных Т-клеток, кл/кг массы тела (масса тела > 50 кг) CAR ⁺ viable T cells (body weight > 50 kg)	(0,2–5,0)×10 ⁶ (0,1–2,5)×10 ⁸	
Наличие экспрессии CAR, определенное методом проточной цитометрии Determination of CAR expression by flow cytometry	—	
Высвобождение ИФНγ при действии на CD19 ⁺ клетки-мишени Release of IFNγ in response to CD19 ⁺ target cells	—	
Стерильность Sterility	Стерильно Sterile	Готовый продукт перед добавлением криопротекторов Final product before adding cryoprotectants
Бактериальные эндотоксины, ЕЭ/мл Bacterial Endotoxins, UE/mL	—	Готовый продукт Final product
Микоплазма Mycoplasma	Отрицательно Negative	Образцы отбираются из супернатанта клеточной культуры в конце культивирования клеток непосредственно перед их сбором и упаковкой Pre-harvest samples are taken from the cell culture supernatant at the end of cell culture just prior to harvest processing steps and final formulation
Определение ДНК репликационно-компетентных ретровирусов (количественная ПЦР) Determination of replication-competent retrovirus DNA (q-PCR)	—	

Примечание. CAR — химерный антигенный рецептор.

«—» — значение показателя не представлено производителем.

^a Определение остаточного содержания гранул, использованных при производстве препарата, проводится с использованием образца препарата, собранного перед составлением дозы, чтобы обеспечить возможность точного измерения.

^b Для общего количества клеток не задаются пределы спецификации, так как это некритический показатель качества; общее количество клеток используется для расчета количества жизнеспособных клеток, необходимых для расчета дозы.

^c Расчет дозы проводили по формуле (1):

$$D = (N_{CAR} \times N \times V) / 100 \text{ (для пациентов массой тела менее 50 кг делить на массу тела в кг)}, \quad (1)$$

где D — доза, кл/кг массы тела; N_{CAR} — количество CAR⁺ клеток, кл/мл; N — концентрация жизнеспособных клеток, кл/мл; V — объем дозы, мл.

Note. CAR—chimeric antigen receptor.

— no data provided by the manufacturer.

^a Testing for residual beads used in the production is performed using a sample collected prior to dose formulation, to allow for accurate measurement.

^b No specification limits are set for Total cell count since it is not a critical quality attribute; result from Total cell count is used to calculate the Number of viable cells, essential for the Dose calculation.

^c The Dose was calculated using the following formula (1):

$$D = (N_{CAR} \times N \times V) / 100 \text{ (for patients } \leq 50 \text{ kg this number is divided per kg body weight)}, \quad (1)$$

where D —the dose, cell /kg body weight; N_{CAR} —number of CAR⁺ cells, cells/mL; N —viable cell concentration, cells/mL; V —volume per dose, mL.

сведения о результатах доклинических исследований: используемые схожие модели, модели заболевания и результаты, полученные с их применением, исследования специфического действия, токсикологические исследования, исследования туморогенности и онкогенности.

Описание состава биомедицинского клеточного продукта

При описании состава БМКП для КЛ в НД должны быть указаны следующие характеристики, которые подлежат оценке в ходе экспертизы качества и внесению в заключение комиссии экспертов (табл. 2).

Методики определения показателей качества биомедицинского клеточного продукта

При описании в НД методик определения показателей качества для всех разделов по определению показателей качества БМКП должны быть приведены подразделы «Приборы и оборудование», «Реактивы», «Материалы». Описание методики определения показателей качества БМКП должно включать методики, для которых разработчиком/производителем была проведена валидация/ревалидация/верификация и для которых предоставлены отчеты по валидации в составе регистрационного досье. В случае использования в методике расчетных формул они должны быть приведены в НД. При использовании альтернативных методов оценки качества БМКП (например, для определения специфической активности, стерильности, бактериальных эндотоксинов и других показателей), не описанных в настоящее время в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. (ГФ XIV), валидация таких методов должна быть проведена в соответствии с ГФ XIV²⁷. Перечень общих фармакопейных статей (ОФС) ГФ XIV, а также требования зарубежных фармакопей к качеству КЛ, в том числе входящих в состав препаратов на основе жизнеспособных клеток человека, и которые могут быть использованы для оценки качества БМКП, нами были подробно представлены ранее [3].

Учитывая особенности состава БМКП, сырья и материалов для производства, технологического процесса и условий произ-

водства, срок годности БМКП, отдельно стоит остановиться на описании в НД такого показателя, как «Вирусная безопасность».

Вирусная безопасность готового биомедицинского клеточного продукта

Обоснование оценки вирусной безопасности БМКП должно быть представлено и обосновано производителем в НД на БМКП.

Оценка вирусной нагрузки готового продукта в общем случае (за исключением аутологичных БМКП, предназначенных для инфицированных ВИЧ-1, -2, гепатитами В, С или другими вирусными инфекциями людей) не входит в число обязательных испытаний (согласно фармакопеям ЕС и США, а также руководящим документам ICH²⁸). Преимущественно обеспечение отсутствия передачи вирусных инфекций при применении аналогов БМКП гарантируется тщательным обследованием донора клеточного материала и контролем на производстве (табл. 3). Таким образом, сведения о результатах исследования донора, входном контроле сырья и материалов животного происхождения для производства БМКП, внутрипроизводственном контроле на вирусную безопасность должны содержаться в НД на БМКП, представленной в составе регистрационного досье.

Порядок медицинского обследования донора биологического материала при прижизненном донорстве для производства БМКП (в том числе в целях проведения доклинических и (или) клинических исследований) определен Приказом Минздрава России от 27.03.2018 № 125н²⁹, согласно которому всех доноров следует тестировать на ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусы гепатита В, С, на наличие возбудителя сифилиса. Помимо данных инфекций в спецификации должны содержаться сведения об отсутствии / наличии / допустимом содержании иных инфекционных агентов, определенных с учетом анамнеза пациента и вида биологического материала.

Таким образом, исключение определения показателя «Вирусная безопасность» для готового БМКП должно быть обосновано контролем вирусной контаминации в контрольных точках производства и (или) тестированием самих доноров или донорского банка клеток, а также минимизацией риска заражения на последующих этапах клинического применения.

²⁷ Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.1.0021.18 Валидация микробиологических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁸ General chapters. Chart 8. Cell, Gene, and Tissue Based Products. USP42–NF37; 2019.

5.2.3 Cell substrates for the production of vaccines for human use; 5.1.7 Viral safety. European Pharmacopoeia, 10th ed.; 2020.

ICH Q5D Quality of biotechnological products: Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products; 1998. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-5-d-derivation-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf

²⁹ Приказ Минздрава России от 27.03.2018 № 125н «Об утверждении порядка медицинского обследования донора биологического материала и перечня противопоказаний (абсолютных и относительных) для получения биологического материала».

Таблица 2. Перечень характеристик клеточной(ых) линии(й), входящей(их) в состав биомедицинского клеточного продукта, необходимых для указания в нормативной документации

Table 2. List of characteristics of the cell line(s) used as component(s) in a biomedical cell product, which have to be included in a product file

Характеристика клеточной линии Cell line characteristic	Описание характеристики клеточной линии Description of the cell line characteristic	Требование в соответствии с пунктом приказа ³⁰ Requirement as stipulated by paragraphs of the Order ³⁰
Целевое предназначение КЛ Cell line intended use	Обоснование КЛ как основного активного (действующего) компонента БМКП Justification for using the cell line as the main active ingredient in a BCP	п. 3.1.9 p. 3.1.9
Данные о степени дифференцировки клеток Data on the degree of cellular differentiation	С указанием: - маркера(ов), определяемого(ых) в ходе экспертизы качества; - исследований (при их наличии) на других этапах (в ходе валидации процесса производства, ДКИ и т. д.) With an indication of: - marker(s) determined during quality control; - studies (if any) at other stages (during validation of the production process, non-clinical studies, etc.)	п. 3.1.3 p. 3.1.3
Данные о пролиферативной активности КЛ Data on the cell line proliferative activity	С указанием результатов анализа и этапа его проведения (внутрипроизводственный контроль или выпускающий контроль, и его продолжительности) With an indication of the test results and the stage of testing (in-process control or release testing), and its duration	п. 3.1.5 p. 3.1.5
Данные о стабильности КЛ: поддержание необходимого уровня дифференцировки, характеристика кариотипа клеток (число, размеры, структура хромосом) в процессе культивирования клеток Data on the cell line stability: maintenance of the required degree of differentiation, characterisation of the cell karyotype (number, size, structure of chromosomes) during cell cultivation	С указанием: - этапа проведения анализа (внутрипроизводственный контроль, ДКИ, валидация процесса производства); - пассажей КЛ, для которых проведены исследования уровня дифференцировки и кариотипа и результатов этих исследований; - используемого(ых) пассажа(ей) КЛ для производства БМКП With an indication of: - stage of testing (in-process control, non-clinical studies, validation of the production process); - passage numbers for which differentiation and karyotype studies were performed, and the results of these studies; - passage number(s) used for BCP production	п. 3.1.6 p. 3.1.6
Данные о генетической модификации КЛ Data on the genetic modification of the cell line	С указанием: цели, способа получения экспрессирующей конструкции (использованные генетические конструкции, особенности их строения, описание целевого гена, стабильность конструкции и методы ее оценки) и линии клеток, отсутствия/наличия неконтролируемой биологической активности вносимого в клетки генетического материала (трансгена), а также изменений экспрессии генов и возникновения мутаций в геноме клеток КЛ под влиянием трансгена With an indication of the intended use and the assembly of the expression construct (genetic constructs used (including their structural features), description of the target gene, stability of the construct, and methods used for its assessment), the derivation of the cell line, the absence/presence of uncontrolled biological activity of the genetic material (transgene) inserted into the cells, as well as transgene-induced changes in gene expression or mutations in the cell genome	п. 3.1.7 p. 3.1.7
Описание параметров жизнеспособности КЛ, условий и времени сохранения ее жизнеспособности (в том числе при хранении и транспортировке) Description of the cell line viability characteristics, conditions and period of cell viability (including during storage and transportation)	С указанием: - результатов анализа и этапа его проведения (внутрипроизводственный контроль, выпускающий контроль, ДКИ, валидация процесса производства); - данных по стабильности: изменение жизнеспособности при хранении и транспортировании With an indication of: - test results and the stage of testing (in-process control, release testing, non-clinical studies, validation of the production process); - stability data: changes in viability during storage and transportation	п. 3.1.10 p. 3.1.10

³⁰ Приказ Минздрава России от 31.01.2017 № 30н «Об утверждении Правил проведения биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов и форм заключений комиссии экспертов федерального государственного бюджетного учреждения по проведению биомедицинской экспертизы биомедицинских клеточных продуктов» (Приложение 2).

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Характеристика клеточной линии Cell line characteristic	Описание характеристики клеточной линии Description of the cell line characteristic	Требование в соответствии с пунктом приказа ³⁰ Requirement as stipulated by paragraphs of the Order ³⁰
Материалы по банкам клеток (если применимо) Data on the cell banks (if applicable)	С указанием: а) происхождения и истории КЛ; б) процедур замораживания и восстановления клеток с указанием используемых компонентов, а также количеством емкостей (ампул, флаконов), сохраняемых в одной партии, и условия их хранения; в) методов контроля подлинности клеток (специфические генотипические, биохимические и (или) фенотипические маркеры) и периодичности контроля; г) процедур испытаний, методов контроля на отсутствие контаминирующих агентов (грибы, бактерии, вирусы, микоплазмы) и их периодичности; д) данных, подтверждающих срок годности и условия хранения клеток в замороженном состоянии с сохранением приемлемого уровня жизнеспособности после размораживания; е) испытаний на жизнеспособность, подлинность клеток и их функции после размораживания; ж) в случае генетически модифицированных клеток также необходимо предоставление материалов по банкам клеток для векторов (если применимо) With an indication of: a) the origin and history of the cell line; b) procedures for freezing and thawing cells, the agents used, the number of containers (ampoules, vials) in one batch, and storage conditions; c) cell authentication procedures (specific genotypic, biochemical, and/or phenotypic markers), and the frequency of testing; d) quality control methods and test procedures for detection of contaminating agents (fungi, bacteria, viruses, mycoplasma), and the frequency of testing; e) data supporting the shelf life and storage conditions of frozen cells allowing to maintain acceptable viability after thawing; f) cell viability, authentication, and functional testing after thawing; g) in the case of genetically modified cells—data on the cell banks used for the vectors (if applicable)	п. 3.1.12 р. 3.1.12

Примечание. БМКП — биомедицинский клеточный продукт, КЛ — клеточная линия, ДКИ — доклинические исследования.
Note. BCP—biomedical cell product.

Например, для аллогенного препарата Temcell (Mesoblast; Япония)³¹ был создан донорский банк клеток, который в отличие от главного банка клеток не является постоянным источником материала для производства готового препарата, а периодически генерируется из аспирата костного мозга доноров с последующим культивированием клеток. Характеризация донорского банка включает: подлинность (видовая принадлежность, определенная с помощью изоферментного анализа; фенотипический профиль на основе метода проточной цитометрии, потенциал дифференцировки, морфологический анализ), жизнеспособность и пролиферативная активность, специфическая активность (экспрессия фактора некроза опухолей α и простагландина E_2), кариотипирование (G-окраска, FISH), анализ колониеобразования в мягком агаре, бактериальные эндотоксины, стерильность, микоплазмы, вирусная безопасность, концентрация клеток. Данные из спецификации на клетки из донорского банка по определению вирусной безопасности свидетельствуют о том, что исследования проводятся по следующим направлениям:

- трансмиссионная электронная микроскопия;

- анализ *in vitro* на клетках Vero, MRC5, Hs68 для определения цитопатического эффекта, гемадсорбции и гемагглютинации;
- анализ *in vivo* на взрослых и новорожденных мышах и развивающихся куриных эмбрионах;

- анализ методом ПЦР на вирусы: ВИЧ-1, -2, вирусы Т-клеточной лейкемии 1-го и 2-го типов, вирусы герпеса 6 и 8 типов, вирус гепатита В, вирус гепатита С, парвовирус В19, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус папилломы человека.

В случае аутологичного БМКП, предназначенного для инфицированных ВИЧ-1, -2, вирусами гепатита В, С или другими вирусными инфекциями людей, производителем должна быть указана допустимая вирусная нагрузка и методы ее определения в конечном продукте.

Учитывая требования приказа Минздрава России от 27.03.2018 № 125н³² и п. 13 приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 14н³³, спецификация на БМКП, произведенный в ходе непрерывного технологического процесса, должна устанавливать требования при обследовании донора на вирусные инфекции как на обнаружение возбудителя, так и на обнаружение

³¹ Report on the deliberation results. Temcell HS Inj. <https://www.pmda.go.jp/files/000215658.pdf>

³² Приказ Минздрава России от 27.03.2018 № 125н «Об утверждении порядка медицинского обследования донора биологического материала и перечня противопоказаний (абсолютных и относительных) для получения биологического материала».

³³ Приказ Минздрава России от 19.01.2017 № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт».

Таблица 3. Формулировки в документации зарубежных аналогов биомедицинских клеточных продуктов, касающиеся вирусной безопасности (примеры)
Table 3. Viral safety statements in the documentation of foreign analogues of biomedical cell products (examples)

Препарат, тип препарата Product, type of product	Тип клеток в составе препарата Type of cells used in the product	Формулировка в спецификации Specification statement	Источник Reference
Strimvelis (GSK), аутологичный autologous	Генетически модифицированные гематопозитивные клетки Genetically modified hematopoietic stem cells	Strimvelis не тестируется на наличие занесенных инфекционных агентов. Медицинский персонал должен принимать соответствующие меры предосторожности, чтобы избежать потенциальной передачи инфекционных заболеваний Strimvelis is not tested for transmissible infectious agents. Healthcare professionals handling Strimvelis should therefore take appropriate precautions to avoid potential transmission of infectious diseases	Сноска ^a Footnote ^a
Zynteglo (bluebird bio), аутологичный autologous		Вирусная безопасность зависит от адекватного контроля исходных материалов и сырья. Испытания на занесенные агенты проводятся для исходных материалов, при производстве и на самом конечном продукте лентивирусного вектора, а также для конечного препарата Zynteglo (данные о перечне испытаний в открытом доступе отсутствуют). Для всех материалов человеческого или животного происхождения проводится оценка риска случайной передачи вируса Virus safety relies on the adequate control of starting materials and raw materials. Tests for adventitious agents are carried out for the starting materials, during production, and on the final product of the lentiviral vector itself, as well as for the final product (the list of tests is not publicly available). For all materials of human or animal origin assessments of the risk for adventitious virus transmission are performed	Сноска ^b Footnote ^b
Holoclar (Chiesi Farmaceutici), аутологичный autologous	Эпителиальные стволовые клетки роговицы Corneal epithelial stem cells	Контроль занесенных агентов для Holoclar основан на подходе к управлению рисками и смягчению их последствий. Для минимизации риска применялись различные профилактические меры. Был представлен обзор исследований по изучению эффективности этих мер по минимизации рисков The control of adventitious agents for Holoclar is based on a risk management and mitigation approach. Various preventative actions have been applied for risk minimisation. An overview of the studies to investigate effectiveness of these risk minimisation measures was presented	Сноска ^c Footnote ^c
Alofisel (Tigenix), аутологичный autologous	Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани Adipose tissue mesenchymal stem cells	Безопасность конечного продукта в отношении занесенных агентов в значительной степени зависит от оценки риска и ряда мер, предпринимаемых при сборе исходного материала и на протяжении всего производственного процесса, а именно от отбора доноров и серологического тестирования, отбора сырья и вспомогательных веществ, поддержания асептических условий процесса производства, тестирования вспомогательных веществ на соответствующих стадиях производства. Отмечается, что оценка безопасности в отношении занесенных агентов и контроль, осуществляемые на уровне донорского материала, а также при производстве и контроле Alofisel, считаются приемлемыми The safety of the final product with respect to adventitious agents relies strongly on a risk assessment and a number of measures undertaken from the collection of the starting material and throughout the manufacturing processes, namely donor selection and serology testing, selection of raw materials and excipients, maintenance of aseptic environment conditions during manufacturing, testing of adventitious agents at appropriate stages of production. In conclusion the adventitious agent safety evaluation and controls implemented at the level of the donor material and during manufacture and control of Alofisel are considered acceptable	Сноска ^d Footnote ^d
Provenge (Dendreon Pharmaceuticals, LLC), аутологичный autologous	Активированные CD54 ⁺ -клетки Activated CD54 ⁺ cells	Provenge не тестируется на наличие трансмиссивных инфекционных агентов и потенциально может послужить источником заражения медицинского персонала при работе с препаратом. Следует соблюдать универсальные меры предосторожности Provange is not routinely tested for transmissible infectious diseases and may transmit diseases to health care professionals handling the product. Universal precautions should be followed	Сноска ^e Footnote ^e

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Препарат, тип препарата Product, type of product	Тип клеток в составе препарата Type of cells used in the product	Формулировка в спецификации Specification statement	Источник Reference
Gintuit (Organogenesis), аллогенный allogeneic	Кератиноциты и фибробласты Keratinocytes and fibroblasts	Передача инфекционных заболеваний, вызываемых известными или неизвестными инфекционными агентами, является возможной. Доноры тестируются на наличие антител к ВИЧ-1, -2, Т-лимфотропному вирусу 1-го и 2-го типа (HTLV-1 и HTLV-2), вирусам гепатитов А (HAV), В (HBV), поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg), вирусу гепатита С (HCV), вирусу лихорадки Западного Нила, вирусу Эпштейна-Барр, цитомегаловирусу и сифилису. Клетки, входящие в состав Gintuit (банки), тестируются на наличие вирусов человека и животных, ретровирусов, бактерий, грибов, дрожжей и микоплазм. Все материалы животного происхождения, которые используются при производстве, тестируются на наличие вирусов, ретровирусов, бактерий, грибов, дрожжей и микоплазм. Transmission of infectious diseases by known or unknown infectious agents may occur with Gintuit. Donors are tested for antibodies to human immunodeficiency virus types 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2), human T-lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2), hepatitis A virus (HAV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis C virus (HCV), West Nile virus (WNV), Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV), and syphilis. Gintuit cells (cell banks) are tested for human and animal viruses, retroviruses, bacteria, fungi, yeast, and mycoplasma. All animal-derived reagents are tested for viruses, retroviruses, bacteria, fungi, yeast, and mycoplasma before use	Сноска ^а Footnote ^а
Yescarta (Kite Pharma, Gilead), Kymriah (Novartis), Tecartus (Kite Pharma), аутологичные autologous	Генетически модифицированные Т-клетки Genetically modified T-cells	Потенциальные риски, связанные с занесенными вирусами и агентами, вызывающими губчатые энцефалопатии, контролируются путем оценки исходных материалов и соответствующего тестирования во время производства векторов и препаратов. Сырье животного, человеческого или рекомбинантного происхождения контролируется для снижения риска потенциального заражения возбуждаемыми губчатой энцефалопатии. Все сырье квалифицируется и проверяется на пригодность. Таким образом, при введении препарата существует низкий риск заражения пациентов занесенными агентами Potential risks from adventitious viruses and spongiform encephalopathy agents are managed through assessment of source materials and appropriate testing during vectors' and products' manufacture. Raw materials of animal, human, or recombinant origin are sourced to minimise risk of potential contamination with spongiform encephalopathy agents. All raw materials are qualified and tested to ensure suitability. Infusion of products therefore presents a low risk for infecting patients with adventitious agents	Сноска ^{в,и,j} Footnote ^{в,и,j}
Stemirac (Nipro Corporation) для лечения травм спинного мозга, аутологичный for spinal cord injury, autologous	Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга Bone marrow mesenchymal stem cells	Кровь и костный мозг донора тестируются на вирусы: HBV, HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV-1, парвовирус B19. Готовый препарат не тестируется на вирусы The donor's blood and bone marrow are tested for the following viruses: HBV, HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV-1, parvovirus B19. The final product is not tested for viruses	Сноска ^а Footnote ^а
HeartSheet (Terumo Corporation), аутологичный autologous	Миобласты (клетки скелетных мышц) Myoblasts (skeletal muscle cells)	Доноры тестируются на вирусы HBV, HCV, HIV и HTLV-1. Готовый препарат не тестируется на вирусы The donor's material is tested for the following viruses: HBV, HCV, HIV and HTLV-1. The final product is not tested for viruses	Сноска ^а Footnote ^а

^а Summary of product characteristics: Strimvelis (EMA/CHMP/249031/2016). EMA: 2016. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003854/WC500208199.pdf

^в Assessment report. Zynteglo (EMA/CHMP/226273/2019). EMA: 2019. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zynteglo-epar-public-assessment-report_en.pdf

^и Assessment report. Holoclar (EMA/25273/2015). EMA: 2015. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/holoclar-epar-public-assessment-report_en.pdf

^д Assessment report. Alofisel (EMA/CHMP/64055/2018). EMA: 2018. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/alofisel-epar-public-assessment-report_en.pdf

^е Provenge®. Highlights of prescribing information. <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM210031.pdf>

^ж Gintuit®. Highlights of prescribing information. <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM295525.pdf>

^з Summary Basis for Regulatory Action. Tecartus. <https://www.fda.gov/media/141093/download>

^и Summary basis for regulatory action — Kymriah, ALL. FDA: 2017. <https://www.fda.gov/media/107962/download>

^к Summary basis for regulatory action — Yescarta, FDA: 2017. <https://www.fda.gov/media/108788/download>

^л Report on the Deliberation Results: Stemirac. <https://www.pmda.go.jp/files/000231946.pdf>

^м Report on the Deliberation Results: HeartSheet. <https://www.pmda.go.jp/files/000215222.pdf>

Таблица 4. Пример описания показателя «Наличие инфекционных агентов в биомедицинском клеточном продукте (вирусная безопасность)» при возможности использования сырья для его производства только от человека, не инфицированного и не имеющего антител к ВИЧ-1, -2, вирусам гепатита В, С

Table 4. An example of the quality attribute description for the “Presence of infectious agents in a biomedical cell product (viral safety)”, if the product can be produced using the raw materials obtained only from an individual who is not infected by and does not have antibodies to HIV-1, -2, Hepatitis B, C

Наличие инфекционных агентов в биомедицинском клеточном продукте (вирусная безопасность) Presence of infectious agents in a biomedical cell product (viral safety)	Значение показателя Specification requirements
Антитела к вирусу иммунодефицита человека ВИЧ-1 и ВИЧ-2, антиген р24 ВИЧ-1 Antibodies to human immunodeficiency virus HIV-1 and HIV-2, HIV-1 p24 antigen	Не обнаружены Not detected
Антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg Hepatitis B virus) Antibodies to hepatitis B surface antigen (HBsAg Hepatitis B virus)	Не обнаружены / обнаружены ^a Not detected / detected ^a
Антитела классов М, G (IgM, IgG) к коровому антигену вируса гепатита В (HBcAg Hepatitis B virus) IgM, IgG antibodies to hepatitis B core antigen (HBcAg Hepatitis B virus)	Не обнаружены Not detected
Антитела к вирусу гепатита С (Hepatitis C virus) Antibodies to hepatitis C virus (Hepatitis C virus)	Не обнаружены Not detected
Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) Hepatitis B surface antigen (HBsAg)	Не обнаружены Not detected
РНК вируса гепатита С Hepatitis C virus RNA	Не обнаружены Not detected

^a Наличие антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg) в крови донора допускается при отрицательном результате анализа на выявление антител классов М, G (IgM, IgG) к коровому антигену вируса гепатита В (HBcAg Hepatitis B virus) и отрицательном результате анализа на выявление поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg).

^a There may be antibodies to hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the donor's blood if the results of the test for IgM, IgG antibodies to hepatitis B core antigen (HBcAg Hepatitis B virus), and the test for hepatitis B surface antigen (HBsAg) are both negative.

антител к нему (табл. 4). В случае наличия в производственном процессе промежуточных продуктов отсутствие вирусов и антител к ним в сырье (биоматериал, кровь донора) должны быть указаны в спецификации на соответствующее сырье, а спецификация на готовый БМКП должна содержать информацию о наличии или отсутствии антигенов вирусов в готовом БМКП, например определенных с помощью ПЦР-анализа.

Кроме того, в случае использования в производстве БМКП сыворотки крови человека приведенные данные в таблице 4 позволяют учесть и требования приказа Минздрава России от 14.09.2001 № 364³⁴.

Наиболее распространенными векторами, использующимися для генетической модификации клеток, являются векторы на основе гамма-ретровирусов или лентивирусов семейства *Retroviridae*. БМКП на их основе должны быть подвергнуты анализу на присутствие репликационно-компетентных ретровирусов/лентивирусов (РКР/Л), появление которых возможно на любом этапе производства, в том числе накопление *ex vivo* трансдуцированных вирусными векторами клеток в культуре обеспечивает возможность увеличения количества РКР/Л. Каждая серия *ex vivo* трансдуцированных клеток и супернатанта культуры должна быть испытана на РКР/Л. Примерами методов исследования на присутствие РКР/Л могут служить посев на чувствительные клеточные культуры, а также ПЦР на наличие специфических генов *psi-gag* или G белка вируса вези-

кулярного стоматита (vesicular stomatitis virus G protein, VSV-G) и иммуноферментный анализ на наличие белка р24.

Сведения об отсутствии РКР/Л и методы анализа в готовом БМКП должны содержаться в НД и спецификации на БМКП.

Вирусная безопасность главного и рабочего банков клеток

Ключевой этап контроля на вирусную безопасность КЛ, входящих в состав БМКП, — оценка вирусной контаминации КЛ из главного и рабочего банков клеток³⁵, сведения о которой должны содержаться в нормативной документации на БМКП, представленной в составе регистрационного досье.

На данном этапе целесообразно использование методов, позволяющих оценить общую вирусную нагрузку (неспецифические вирусы). Примерами испытаний могут служить: образование антител (реакции преципитации и агглютинации и подобные) для выявления специфических вирусных антигенов, трансмиссионная электронная микроскопия позволяет обнаружить вирусы и вирусоподобные частицы, обратная транскрипция для выявления ретровирусов, полимеразная цепная реакция способна выявить специфичные последовательности генома вирусов и др. Тестирование клеток главного банка на наличие ретровирусов также может быть осуществлено путем оценки инфицирующей способности на чувствительных клеточных культурах и электронной микроскопией.

³⁴ Приказ Минздрава России от 14.09.2001 № 364 «Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов» (п. 3.3.4).

³⁵ Code of Federal Regulations Title 21. Part 1271. Human cells, tissues, and cellular and tissue-based products. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=1271&showFR=1>

Guideline on Human Cell-Based Medicinal Products (EMA/CHMP/410869/2006). EMA; 2007. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003898.pdf

Guidance for Industry. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs). FDA; 2020. <https://www.fda.gov/media/113760/download>

General chapters. Chart 8. Cell, Gene, and Tissue Based Products. USP42–NF37; 2019.

5.2.3 Cell substrates for the production of vaccines for human use; 5.1.7 Viral safety. European Pharmacopoeia, 10th ed.; 2020.

ICH Q5D Quality of biotechnological products: Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products; 1998. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-5-d-derivation-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf

Таблица 5. Перечень проводимых тестов для главного и рабочего банков клеток (препараты Apligraf и Gintuit)
Table 5. List of tests performed for the master and working cell banks (Apligraf and Gintuit products)

Характеристика Characteristics	Рабочий банк клеток Working cell bank	Главный банк клеток Master cell bank
Подлинность Identity	- инволюкрин (для эпидермальных прогениторных клеток человека); - биосинтез коллагена (для дермальных фибробластов человека) - involucrin (for human epidermal progenitor cells); - collagen biosynthesis (for human dermal fibroblasts)	Не проводится Test not performed
Функциональные характеристики Functional characteristics	- жизнеспособность; - пролиферативная активность; - гистология/морфология - viability; - proliferative activity; - histology/morphology	<i>In vitro</i> : подкожная абсорбция, цитокиновый профиль, окраска митохондрий, чистота, гистология/морфология; <i>In vivo</i> : иммуногистохимия, инвазивная активность трансплантата, приживление трансплантата, морфология трансплантата <i>In vitro</i> : subcutaneous absorption, cytokine profile, mitochondrial staining, purity, histology/morphology; <i>In vivo</i> : immunohistochemistry, invasive graft activity, graft engraftment, graft morphology
Стерильность Sterility	Проводится Test performed	Проводится Test performed
Микоплазма Mycoplasma	Проводится Test performed	Проводится Test performed
Вирусная безопасность Viral safety	- анализ <i>in vitro</i> (трансмиссионная электронная микроскопия, обратная транскрипция); - анализ <i>in vivo</i> - <i>in vitro</i> analysis (transmission electron microscopy, reverse transcription); - <i>in vivo</i> analysis	- анализ <i>in vitro</i> (трансмиссионная электронная микроскопия, обратная транскрипция); - анализ <i>in vivo</i>; - специфическое тестирование на вирусы человека (N = 14); - тестирование на вирусы свиней; - тестирование на вирусы крупного рогатого скота - <i>in vitro</i> analysis (transmission electron microscopy, reverse transcription); - <i>in vivo</i> analysis; - specific testing for human viruses (N=14); - testing for porcine viruses; - testing for bovine viruses
Неопластическая безопасность Neoplastic safety	Не проводится Test not performed	- кариология и изоферментный анализ; - туморогенность <i>in vivo</i>; - клеточное старение (MTT-тест) - karyotyping and isoenzyme analysis; - tumorigenicity <i>in vivo</i>; - cellular senescence (MTT test)

Кроме того, общим подходом, позволяющим определить многие вирусы человека и животных в клетках, является проведение исследований *in vitro*, при которых исследуемый материал инокулируется в индикаторные клеточные культуры. Необходимо проводить выявление как цитопатических, так и гемадсорбирующих вирусов. Исследования *in vivo* на новорожденных и взрослых мышах, куриных развивающихся эмбрионах используют для выявления некультивируемых вирусов (не растущих в клеточных культурах).

В качестве основных вирусных контаминантов банкируемых КЛ в фармакопеях ЕС и США, а также руководящих документах ИЧН указываются инфекционные ретровирусы, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус герпеса 6-го типа, вирус папилломы человека, а также вирус плазмодитоза³⁶. Перечисленные типы вирусов могут длительное время выживать в материалах и реагентах, используемых при культивировании

КЛ, а также обладают сродством (тропностью) к типам клеток, наиболее часто используемым в БМКП.

Примером описания стратегии тестирования двухуровневой системы банков клеток является открытая документация на препараты (аналоги БМКП) Apligraf и Gintuit (Organogenesis)³⁷, представляющие собой кератиноциты человека (верхний слой) и дермальные фибробласты (нижний слой) в матриксе из бычьего коллагена на пористой (поликарбонатной) мембране. Препараты Apligraf и Gintuit предназначены для регенерации кератинизированной ткани при синдроме диабетической стопы, варикозной язвы и устранения дефектов десен соответственно. Главный банк содержит клетки первого пассажа кератиноцитов и второго пассажа фибробластов. Тестирование и главного, и рабочего банков клеток на вирусную безопасность включает обширные исследования как *in vitro*, так и *in vivo*; обнаружение 14 вирусов человека, свиней, крупного рогатого скота (табл. 5).

³⁶ General chapters. Chart 8. Cell, Gene, and Tissue Based Products. USP42–NF37; 2019.

5.2.3 Cell substrates for the production of vaccines for human use; 5.1.7 Viral safety. European Pharmacopoeia, 10th ed.; 2020.

ICH Q5D Quality of biotechnological products: Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products; 1998. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-5-d-derivation-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf

³⁷ Summary Basis for Regulatory Action. Gintuit. <http://wayback.archive-it.org/7993/20170723023240/https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM297753.pdf>

Заключение

Нормативная документация является основным документом регистрационного досье, в соответствии с которым проводится экспертиза качества БМКП. В настоящее время отсутствует опыт составления нормативной документации разработчиками БМКП вследствие новизны нормативно-правовой базы, а также не представлены на рынке БМКП, имеющие государственную регистрацию в Российской Федерации. На основании национальной регуляторной базы, а также учитывая зарубежный опыт регистрации аналогов БМКП, рассмотрены особенности содержания нормативной документации на разрабатываемые в России БМКП. В статье обобщены требования национального законодательства к описанию показателей качества, методов и методик контроля клеточной линии, входящей в состав БМКП, сведения о которых необходимы как для проведения оценки качества образцов БМКП в рамках экспертизы качества, так и для формирования заключения комиссии экспертов. При формировании нормативной документации на БМКП разработчикам следует особое внимание уделить соответствию состава его документов и их содержания нормативно-правовым актам, в том числе рассмотрению сведений в нормативной документации по содержанию клеточных и технологических примесей в готовом БМКП / клеточной линии, описанию стратегии вирусной безопасности готового продукта и клеток из главного и рабочего банков, а также на включение в нормативную документацию методик оценки качества, для которых была проведена валидация/ревалидация/верификация. При составлении спецификации на готовый продукт (является частью нормативной документации) необходимо привести характеристики по пролиферативной активности, степени дифференцировки, стабильности, жизнеспособности, генетической модификации (если применимо) клеточной(ых) линии(й), входящей(их) в состав БМКП, а также материалы по банкам клеток (если применимо).

Вклад авторов. **Е. В. Мельникова** — идея, концепция и дизайн исследования, формирование национальных требований к составлению нормативной документации в соответствии с нормативно-правовой базой; **О. А. Рачинская** — обобщение данных, изложенных в нормативных документах, написание текста; **О. В. Меркулова** — анализ и обобщение данных, изложенных в нормативных документах, доработка текста; **И. С. Семенова** — анализ национальных требований к составлению нормативной документации в соответствии с нормативно-правовой базой; **Е. О. Кожевникова** — сбор и систематизация данных; **В. А. Меркулов** — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. **Ekaterina V. Melnikova**—elaboration of the idea, concept, and design of the study, elaboration of national requirements for regulatory submission preparation in accordance with the legal and regulatory setting; **Olga A. Rachinskaya**—consolidation of data from regulatory docu-

ments, writing of the text; **Olga V. Merkulova**—analysis and consolidation of data from regulatory documents, finalisation of the text; **Irina S. Semenova**—analysis of national requirements for regulatory submission preparation in accordance with the legal and regulatory setting; **Ekaterina O. Kozhevnikova**—collection and systematisation of data; **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 121021800098-4).

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. 121021800098-4).

Конфликт интересов. В. А. Меркулов является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Vadim A. Merkulov is the Editor-in-chief of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Мельникова ЕВ, Рачинская ОА, Трусев ГА, Хорольский МД, Семенова ИС, Терешкина НВ, Меркулов ВА. Обоснование методических подходов к экспертной оценке подлинности биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(1):28–38. [Melnikova EV, Rachinskaya OA, Trusov GA, Khorolsky MD, Semenova IS, Tereshkina NV, Merkulov VA. Justification of methodological approaches to the expert evaluation of the authenticity of biomedical cell products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):28–38 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-28-38>
2. Чапленко АА, Мельникова ЕВ, Рачинская ОА, Олефир ЮВ. Оценка активности препаратов, содержащих клеточные линии человека: перспективные подходы и требования регуляторных органов. *Антибиотики и химиотерапия*. 2018;63(9–10):53–60. [Chaplenko AA, Melnikova EV, Rachinskaya OA, Olefir YuV. Evaluation of the activity of drugs containing human cell lines: promising approaches and requirements of regulatory bodies. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2018;63(9–10):53–60 (In Russ.)]
3. Водякова МА, Сайфутдинова АО, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(3):174–88. [Vodyakova MA, Sayfutdinova AR, Melnikova EV, Olefir YuV. Comparison of the requirements of the Pharmacopoeias of the world for the quality of cell lines. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):174–88 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-159-173>

Об авторах / Authors

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук. *Ekaterina V. Melnikova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

Рачинская Ольга Анатольевна, канд. биол. наук. *Olga A. Rachinskaya*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8377-9205>

Меркулова Ольга Владимировна, канд. мед. наук. *Olga V. Merkulova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7013-0394>

Семенова Ирина Семеновна, канд. биол. наук. *Irina S. Semenova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9026-0508>

Кожевникова Екатерина Олеговна, канд. биол. наук. *Ekaterina O. Kozhevnikova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9835-694X>

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

Поступила 02.02.2021

После доработки 29.03.2021

Принята к публикации 10.06.2021

Received 2 February 2021

Revised 29 March 2021

Accepted 10 June 2021

Актуальная информация

Журнал «**БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение**» включен в базу данных **Russian Science Citation Index (RSCI)** на платформе Web of Science (пресс-релиз Рабочей группы по оценке качества и отбору журналов в RSCI на платформе Web of Science представлен на сайте eLIBRARY.RU¹).

Решение о включении журнала в RSCI принималось Рабочей группой на основании анализа формальных и библиометрических показателей журнала, оценки общественной экспертизы и оценки журнала экспертами по тематическому направлению. Основными критериями оценки являлись:

- научный уровень (оценка среднего научного уровня статей на основе их содержательного анализа);
- актуальность (оценка актуальности тематики журнала и его востребованности в научном сообществе);
- стабильность (оценка стабильности и однородности качества статей в выпусках журнала);
- редколлегия (оценка научного уровня ученых, входящих в состав редколлегии журнала);
- этика (оценка соблюдения журналом издательской и научной этики, в том числе уровня рецензирования, самоцитирования, наличия неправомерных заимствований, политики ретракции статей и т. д.);
- оформление (комплексная оценка качества оформления журнала — наличие полной информации в РИНЦ, DOI, аннотаций и ключевых слов на английском языке, оформление ссылок в списках цитируемой литературы).

RSCI — это совместный проект Российской академии наук, международной информационно-аналитической компании «Clarivate Analytics» и российской информационной компании Научная электронная библиотека (eLIBRARY.RU).

RSCI — мультидисциплинарная база данных авторитетных российских журналов на платформе Web of Science; является составной частью ядра РИНЦ. RSCI обеспечивает глобальную видимость результатов российских научных исследований, поскольку информация о публикациях представлена на двух языках (русском и английском) и доступна пользователям платформы Web of Science по всему миру; позволяет оценивать влияние российских публикаций и их цитируемость; дает возможность непосредственной оценки российских научных публикаций при помощи используемых во всем мире аналитических метрик и индикаторов Web of Science².

¹ https://elibrary.ru/projects/rsci/rsci_2021.pdf

² <https://clarivate.ru/products/web-of-science-rsci>

Государственная премия Российской Федерации в области науки и технологий 2020 года

2020 Russian Federation National Award for outstanding achievements in science and technology

Вакцина Гам-КОВИД-Вак (коммерческое название «Спутник V») – первая в мире зарегистрированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2 (дата регистрации вакцины Минздравом России 11 августа 2020 г.).

Вакцина «Спутник V», получаемая биотехнологическим способом, относится к векторным рекомбинантным вакцинам и состоит из двух компонентов. В состав первого компонента входит рекомбинантный аденовирусный вектор на основе не-патогенного аденовируса человека 26 серотипа, несущий ген S-белка вируса SARS-CoV-2, в состав второго – вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа, несущий ген S-белка вируса SARS-CoV-2. Вакцина индуцирует формирование гуморального и клеточного иммунного ответа в отношении SARS-CoV-2.

Разработка вакцины, этапы доклинических и клинических исследований проводились совместно ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

По результатам испытаний вакцина показала высокую эффективность и безопасность. В настоящее время массовая вакцинация препаратом «Спутник V» проводится во всех регионах России. Вакцина «Спутник V» официально зарегистрирована во многих странах мира.

За разработку и внедрение в практику отечественного здравоохранения эффективных рекомбинантных вакцин против лихорадки Эбола и новой коронавирусной инфекции (COVID-19), а также за разработку технологии конструирования вирусных систем доставки кассет со вставкой гена гликопротеина вируса Эбола и гена S-белка SARS-CoV-2 Александру Леонидовичу Гинцбургу, академику РАН, директору ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Денису Юрьевичу Логунову, члену-корреспонденту РАН, заместителю директора ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, и Сергею Владимировичу Борисевичу, члену-корреспонденту РАН, начальнику ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России присуждена Государственная премия Российской Федерации в области науки и технологий 2020 года и присвоено почетное звание лауреатов Государственной премии Российской Федерации в области науки и технологий.

Награждение состоялось 9 июня 2021 г. (Указ Президента Российской Федерации № 336).

Поздравляем членов редсовета журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» – А. Л. Гинцбурга и С. В. Борисевича с присвоением им почетного звания лауреатов Государственной премии Российской Федерации в области науки и технологий 2020 года.



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

- Подписной индекс в каталоге Агентства «Роспечать»
«Издания органов ентствах подписки
Урал-Пресс (www.ural-press.ru) — 57941
- По объединенному каталогу
«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) — T57941



ISSN 2221-996X



9 772221 996004