

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, № **4**
Октябрь — декабрь 2021



BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment

В НОМЕРЕ

Подходы к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин

Оценка стабильности производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины с помощью контрольных карт Шухарта

Академику Медицины Николаю Васильевичу — 90 лет!

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 — 0,544.

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, № 4
Октябрь — декабрь 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. 4
October — December 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)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

Хаитов Муса Рахимович, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН,
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц., 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)

Аракелов Сергей Александрович, канд. биол. наук,
ФГУП СПбНИИВС ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

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)

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., ака-
демик РАН, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Москва, Россия)

Валента Рудольф, проф., Венский медицинский
университет (Вена, Австрия)

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

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

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

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

Зверев Виталий Васильевич, д-р биол. наук, проф.,
академик РАН, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сечено-
ва Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

ШЕФ-РЕДАКТОР

Федотова Ольга Федоровна, ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКТОР ПЕРЕВОДА

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

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

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

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

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

Медуницын Николай Васильевич, д-р мед. наук, проф.,
академик РАН (Москва, Россия)

Миронов Александр Николаевич, д-р мед. наук, проф.,
ООО «Национальное агентство лекарственных средств»
(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 име-
ни Пастера (Санкт-Петербург, Россия)

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

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

Чумаков Константин Михайлович, д-р биол. наук,
проф., Управление по контролю за качеством продуктов
питания и лекарственных средств (Силвер-Спринг,
Мэриленд, США)

НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ

Гукасова Надежда Вадимовна, канд. биол. наук,
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 special-ist 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 immunol-ogy, allergology, Clinical pathology).

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITORS-IN-CHIEF

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

Musa R. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, National Research Center "Institute of Immunology"
(Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. 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. Amvroseyeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (Minsk, Republic of Belarus)

Sergey A. Arakelov, Cand. Sci. (Biol.), Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations (Saint Petersburg, Russia)

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)

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

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

Rudolf Valenta, MD, Prof., Medical University of Vienna (Vienna, Austria)

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology (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)

Ivan A. Dyatlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology (Obolensk, Moscow Region, Russia)

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

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

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

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

Dmitry K. Lvov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

Nikolay V. Medunitsyn, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

Aleksandr N. Mironov, Dr. Sci. (Med.), Prof., National Agency of Medicines (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)

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

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

Rakhim M. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, National Research Center "Institute of Immunology" (Moscow, Russia)

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Generium JSC (Volginsky, Vladimir Region, Russia)

Konstantin M. Chumakov, Dr. Sci. (Biol.), PhD, Food and Drug Administration (Silver Spring, Maryland, USA)

MANAGING EDITOR

Olga F. Fedotova, 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)

SCIENCE EDITORS

Nadezhda V. Gukasova, Cand. Sci. (Biol.), 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, № 4

Октябрь — декабрь 2021

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Подходы к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин

Л. М. Хантимирова, Д. В. Горенков, С. Г. Гусева, В. А. Меркулов, А. А. Солдатов 212

Сравнительная характеристика существующих платформ для создания вакцин против опасных и особо опасных вирусных инфекций, обладающих пандемическим потенциалом

Г. Г. Онищенко, Т. Е. Сизикова, В. Н. Лебедев, С. В. Борисевич 225

Обзор мирового опыта применения зарегистрированных вакцин и разработки новых вакцин для профилактики пневмококковой инфекции

М. В. Савкина, М. А. Кривых, Н. А. Гаврилова, Л. В. Саяпина, Ю. И. Обухов,
В. А. Меркулов, В. П. Бондарев 234

Получение твердых лекарственных форм препаратов иммуноглобулиновой природы

Е. Г. Абрамова, А. В. Комиссаров, Н. В. Сеницына, И. М. Жулидов, А. К. Никифоров 244

Оригинальные статьи

Оценка стабильности производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины с помощью контрольных карт Шухарта

И. А. Алексеева, О. В. Перелыгина, Е. Д. Колышкина 256

Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе

Е. И. Рябова, А. А. Деркаев, И. Б. Есмагамбетов, Д. В. Щебляков, М. А. Довгий,
Д. В. Бырихина, В. В. Прокофьев, И. П. Чемоданова 266

Хроника

Николай Васильевич Медуницын (к 90-летию со дня рождения) 279

Благодарности рецензентам (2021 г.) 280

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 «Ситипринт»: 129226, Москва, ул. Докукина, д. 10

Подписано в печать: 14.12.2021

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

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

CONTENTS

Reviews

Approaches to quality control, preclinical and clinical studies of live recombinant viral vector vaccines

L. M. Khantimirova, D. V. Gorenkov, S. G. Guseva, V. A. Merkulov, A. A. Soldatov 212

Comparative analysis of existing platforms for the development of vaccines against dangerous and extremely dangerous viral infections with pandemic potential

G. G. Onishchenko, T. E. Sizikova, V. N. Lebedev, S. V. Borisevich 225

Review of global use of licensed vaccines and development of new vaccines for the prevention of pneumococcal infection

M. V. Savkina, M. A. Krivykh, N. A. Gavrilova, L. V. Sayapina, Yu. I. Obukhov,
V. A. Merkulov, V. P. Bondarev 234

Production of solid dosage forms of immunoglobulin products

E. G. Abramova, A. V. Komissarov, N. V. Sinitsyna, I. M. Zhulidov, A. K. Nikiforov 244

Original Articles

Estimation of production consistency of diphtheria, tetanus, and pertussis components of the DTP vaccine using Shewhart charts

I. A. Alekseeva, O. V. Pereyagina, E. D. Kolyshkina 256

Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale

E. I. Ryabova, A. A. Derkaev, I. B. Esmagambetov, D. V. Shcheblyakov, M. A. Dovgiy,
D. V. Byrikhina, V. V. Prokofiev, I. P. Chemodanova 266

Chronicle

Nikolay Vasilievich Medunitsyn (on the 90th Anniversary) 279

Thank you to all our reviewers in 2021 280

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 Cityprint: 10 Dokukin St., Moscow 129226

Passed for printing: 14 December 2021

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

Подходы к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин

Л. М. Хантимирова^{1,*}, Д. В. Горенков¹, С. Г. Гусева¹, В. А. Меркулов^{1,2}, А. А. Солдатов¹

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 (Сеченовский университет),
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

На сегодняшний день имеются лишь ограниченные данные об опыте клинического применения живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин. В требованиях (рекомендациях) к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований должны учитываться особенности вакцин нового типа с целью дальнейшей оценки соотношения «польза–риск». Цель работы — анализ современных подходов к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин. В статье представлен обзор зарегистрированных и находящихся на различных этапах клинических исследований живых вирусных векторных вакцин. Проведен анализ нормативных документов, касающихся вопросов качества, доклинических и клинических исследований живых вирусных векторных вакцин в Российской Федерации, странах Европейского союза, США и Японии. Установлено, что регуляторные требования к живым рекомбинантным вирусным векторным вакцинам включают оценку подробного обоснования разработки вакцины, в том числе информацию о выборе вектора, источнике происхождения гена (генов) гетерологического антигена и элементов, имеющих отношение к экспрессии трансгена (трансгенов), оценку генетической и фенотипической стабильности рекомбинантного вируса, риска реверсии вирулентности или рекомбинации со штаммами дикого вируса, оценку возможности интеграции генома вируса в хромосому клетки-хозяина, оценку предсуществующего иммунитета к вектору, оценку напряженности иммунного ответа, вызываемого вектором, и возможности его повторного применения. От перечисленных требований зависит выбор и число различных применимых токсикологических и фармакологических моделей для исследований вакцин. Результаты анализа подходов к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин могут быть полезны при разработке гармонизированных с международными нормами руководств в сфере обращения лекарственных средств в Российской Федерации.

Ключевые слова: вакцины; живые рекомбинантные вирусные векторные вакцины; оценка качества; доклинические исследования; клинические исследования; нормативные документы

Для цитирования: Хантимирова ЛМ, Горенков ДВ, Гусева СГ, Меркулов ВА, Солдатов АА. Подходы к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(4):212–224. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-212-224>

* Контактное лицо: Хантимирова Лейсан Маратовна; Khanitimirova@expmed.ru

Approaches to quality control, preclinical and clinical studies of live recombinant viral vector vaccines

L. M. Khamtimirova^{1,*}, D. V. Gorenkov¹, S. G. Guseva¹, V. A. Merkulov^{1,2}, A. A. Soldatov¹

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 (Sechenov University),
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

At present, there are not much data on the clinical use of live recombinant viral vector vaccines. Characteristics of new vaccines should be factored into requirements/recommendations for quality control, preclinical and clinical studies of vaccines in order to enable further risk/benefit assessment. The aim of this study was to analyse current approaches to quality control, preclinical and clinical studies of live recombinant viral vector vaccines. The paper provides an overview of the licensed live viral vector vaccines and those at various stages of clinical trials. The authors analysed Russian, European, American, and Japanese guidelines related to quality issues, preclinical and clinical studies of live viral vector vaccines. The analysis demonstrated that the regulatory requirements for live recombinant viral vector vaccines include assessment of a detailed rationale for vaccine development, including information on the choice of the vector, the origin of the heterologous antigen gene(s), elements related to the transgene(s) expression, as well as assessment of the genetic and phenotypic stability of the recombinant virus, the risk of reversion to virulence or recombination with wild type strains, the potential for virus genome integration into the host cell chromosome, the pre-existing immunity to the vector, the intensity of the immune response elicited by the vector, and the reusability of the vector. The choice and number of applicable

toxicological and pharmacological models will depend on these aspects. The results of the analysis of approaches to quality control, preclinical and clinical studies of live recombinant viral vector vaccines may be used in the development of Russian regulatory guidelines harmonised with the international norms and regulations.

Key words: vaccines; live recombinant viral vector vaccines; quality control; preclinical studies; clinical studies; guidelines

For citation: Khantimirova LM, Gorenkov DV, Guseva SG, Merkulov VA, Soldatov AA. Approaches to quality control, preclinical and clinical studies of live recombinant viral vector vaccines. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(4):212–224. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-212-224>

***Corresponding author:** Leysan M. Khantimirova; Khantimirova@expmed.ru

Развитие биотехнологии и молекулярной биологии привело к значительному прогрессу в разработке новых типов вакцин для профилактики инфекционных заболеваний, классические (традиционные) вакцины для которых недоступны или недостаточно эффективны. Одним из таких типов вакцин являются живые рекомбинантные вирусные векторные вакцины [1].

Вакцины на основе вирусных векторов, как правило, разрабатывают с целью профилактики инфекционных заболеваний, для которых не существует эффективных вакцин, например таких, как ВИЧ-инфекция, лихорадка Денге, болезнь, вызванная вирусом Эбола (лихорадка Эбола), коронавирусные инфекции, вызванные вирусами SARS-CoV и MERS-CoV, а также в случаях усовершенствования уже существующих вакцин (например, вакцины против туберкулеза). Вирусные векторы, используемые для этих целей, конструируются на основе поксвирусов, аденовирусов, альфа-вирусов, вируса кори, вируса желтой лихорадки, вируса везикулярного стоматита и др.¹

Живые вакцины на основе рекомбинантного вирусного вектора представляют собой живые вирусы (векторы), экспрессирующие гетерологичный антиген (антигены), который может быть получен из вирусов, бактерий, паразитов. Последовательность встраиваемого в вектор гена может кодировать целевой белок или целевые белки одного или нескольких микроорганизмов, а также отдельные фрагменты или антигенные детерминанты (эпитопы) этих белков².

В зависимости от способности к репликации вирусных векторов рекомбинантные вирусные векторные вакцины можно разделить на 2 типа: репликативно-некомпетентные (репликативно-дефектные) и репликативно-компетентные [1].

Вирусные векторы могут быть аттенуированы методом повторных пассажей до такого уровня, при котором они перестают быть репликативно-компетентными (например, модифицированный вирус вакцины Анкара, MVA), или генно-инженерными методами, как правило, удалением генов, ответственных за репликацию, которые ограничивают их репликативную активность менее чем одним циклом (например, в случае со многими аденовирусными векторами). В качестве репликативно-дефектных вирусных векторов также могут выступать непатогенные для человека вирусы (например, векторы на основе авиопоксвирусов)³.

Разработка и создание репликативно-компетентных вирусных векторных вакцин проводятся в основном двумя методами: заменой генов с помощью системы обратной генетики или вставкой дополнительных генов в вирусный геном. Векторные вакцины на основе флавивирусов являются химерными вакцинами, полученными с использованием системы обратной генетики [2].

Предполагается, что рекомбинантные векторные вирусные вакцины будут индуцировать не только гуморальный,

но и клеточный иммунный ответ, так как их механизм действия основан на экспрессии целевого антигена *in vivo* [1].

Несмотря на многообещающие результаты доклинических исследований живых вирусных векторных вакцин, остается ряд серьезных вопросов, касающихся безопасности и эффективности применения вакцин нового типа у человека. Профиль безопасности рекомбинантных вирусных векторных вакцин у новорожденных, беременных и пациентов с ослабленным иммунитетом может отличаться от профиля безопасности у иммунокомпетентных лиц. Репликативно-компетентные рекомбинантные вирусные вакцины несут риски не только для иммунодефицитных лиц, но также для третьих лиц вследствие потенциальной передачи им живого рекомбинантного вируса от вакцинированных лиц. Поэтому следует уделять особое внимание рискам, связанным с распространением вируса вакцинированными лицами [1].

Кроме того, невозможно прогнозировать вирулентность живых рекомбинантных вакцин на основе данных о вирулентности вирусного вектора, даже если вирусный вектор был аттенуирован с целью применения у людей; этот аспект необходимо особенно изучать в доклинических исследованиях безопасности на подходящих моделях животных и в клинических исследованиях⁴.

Таким образом, рекомендации к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований должны учитывать особенности вакцин нового типа с целью дальнейшей адекватной оценки отношения ожидаемой пользы к возможному риску.

Цель работы — анализ современных подходов к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин.

Живые рекомбинантные вирусные векторные вакцины для медицинского применения

На сегодняшний день имеются ограниченные данные об опыте клинического применения живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин. Сведения о зарегистрированных в мире вакцинах на основе рекомбинантных вирусных векторов представлены в таблице 1. Первая вакцина на основе рекомбинантного вирусного вектора была зарегистрирована в Австралии и Таиланде в 2012 г. [3]. Imojev® — живая вирусная векторная вакцина для профилактики японского энцефалита, сконструированная путем вставки нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки rгМ и Е вируса японского энцефалита, в геном вируса желтой лихорадки 17D [4, 5]. Вакцина рекомендована к применению у лиц от 9 месяцев (в Таиланде), от 12 месяцев (в Австралии) и старше. Взрослым вакцинацию проводят однократно (бустерное введение через 5 лет после вакцинации), детям и подросткам до 18 лет при необходимости долгосрочной защиты бустерную

¹ Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines (EMA/CHMP/VWP/141697/2009). EMA; 2010. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines_en.pdf

² Там же.

³ Там же.

⁴ Там же.

Таблица 1. Живые рекомбинантные вирусные векторные вакцины для медицинского применения (по А. Sakurai [1] с изменениями)
Table 1. Live recombinant viral vector vaccines for human use (adapted from A. Sakurai [1])

Торговое наименование Trade name	Держатель регистрационного удостоверения Marketing authorisation holder	Целевой патоген Target pathogen	Тип вирусного вектора Viral vector type	Конструкция рекомбинантного вируса Recombinant virus construction	Страны, в которых зарегистрирована вакцина Countries where the product is approved
Imojev®	Sanofi Pasteur	Вирус японского энцефалита Japanese encephalitis virus	Репликативно-компетентный Replication-competent	Вирус желтой лихорадки, содержащий гены белков prM и E вируса японского энцефалита Yellow fever virus containing genes of the prM and E proteins of Japanese encephalitis virus	Австралия Таиланд Малайзия Филиппины Australia Thailand Malaysia The Philippines
Dengvaxia®	Sanofi Pasteur	Вирус Денге Dengue virus	Репликативно-компетентный Replication-competent	Вирус желтой лихорадки, содержащий гены белков prM и E вируса Денге серотипов 1, 2, 3 и 4 Yellow fever virus containing genes of the prM and E proteins of Dengue virus serotypes 1, 2, 3, and 4	Страны ЕС (не все) США Филиппины EU (not all) USA The Philippines
Ervebo	Merck&Co., Inc.	Вирус Эбола Ebola virus	Репликативно-компетентный Replication-competent	Вирус везикулярного стоматита, содержащий ген GP вируса Эбола (Zaire ebolavirus) Vesicular stomatitis virus containing the GP gene of Ebola virus (Zaire ebolavirus)	Демократическая Республика Конго (в рамках программы помощи ВОЗ) Congo (under the WHO compassionate-use programme)
Zabdeno® (Ad26-ZEBOV) Mvabea® (MVA-BN-Filo)	Janssen-Cilag International N.V.	Вирус Эбола Ebola virus	Ad26-ZEBOV (компонент 1 — репликативно-дефектный) MVA-BN-Filo (компонент 2 — репликативно-дефектный) Ad26-ZEBOV (component 1 — replication-deficient) MVA-BN-Filo (component 2 — replication-deficient)	Ad26-ZEBOV — аденовирус 26 серотипа, содержащий ген гликопротеина GP вируса Эбола (Zaire ebolavirus) MVA-BN-Filo — модифицированный вирус вакцины Анкара (MVA), кодирующий гликопротеин GP заирского (Zaire ebolavirus) и суданского эболавирусов (Sudan ebolavirus), нуклеопротеин эболавируса Тай Форест (Tai Forest ebolavirus), а также гликопротеин вируса Марбург (Marburg marburgvirus) Ad26-ZEBOV—adenovirus serotype 26 containing the glycoprotein (GP) gene of Ebola virus (Zaire ebolavirus) MVA-BN-Filo—modified vaccinia Ankara (MVA) virus encoding the Zaire ebolavirus glycoprotein (GP), Sudan ebolavirus GP, Tai Forest ebolavirus nucleoprotein, Marburg virus (Marburg marburgvirus) GP	EC EU

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Торговое наименование Trade name	Держатель регистрационного удостоверения Marketing authorisation holder	Целевой патоген Target pathogen	Тип вирусного вектора Viral vector type	Конструкция рекомбинантного вируса Recombinant virus construction	Страны, в которых зарегистрирована вакцина Countries where the product is approved
ГамЭвак GamEvac	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology	Вирус Эбола Ebola virus	Репликативно-дефектный Replication-deficient	Смесь (1:1) рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц на основе аденовируса 5 серотипа, экспрессирующих ген GP вируса Эбола, и рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц на основе аденовируса 5 серотипа, экспрессирующих ген NP вируса Эбола A mixture (1:1) of recombinant pseudoadenoviral particles based on adenovirus serotype 5, expressing the Ebola virus GP gene, and recombinant pseudoadenoviral particles based on adenovirus serotype 5, expressing the Ebola virus NP gene	Российская Федерация Russian Federation
ГамЭвак-Комби; ГамЭвак-Лео GamEvac-Combi; GamEvac-Lyo	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology	Вирус Эбола Ebola virus	Компонент А — репликативно-компетентный Компонент Б — репликативно-дефектный Component A — replication-competent Component B — replication-deficient	Компонент А — вирус везикулярного стоматита, содержащий ген GP вируса Эбола Компонент Б — псевдоаденовирус серотипа 5, содержащий ген GP вируса Эбола Component A—vesicular stomatitis virus containing the GP gene of Ebola virus Component B—pseudoadenovirus serotype 5 containing the GP gene of Ebola virus	Российская Федерация Russian Federation
Гам-КОВИД-Вак Gam-COVID-Vac	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology	SARS-CoV-2	Компонент I — репликативно-дефектный Компонент II — репликативно-дефектный Component I — replication-deficient Component II — replication-deficient	Компонент I — рекомбинантные аденовирусные частицы 26 серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2 Компонент II — рекомбинантные аденовирусные частицы 5 серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2 Component I—recombinant adenovirus serotype 26 particles containing SARS-CoV-2 S protein gene Component II—recombinant adenovirus serotype 5 particles containing SARS-CoV-2 S protein gene	Российская Федерация Russian Federation
Гам-КОВИД-Вак-Лео Gam-COVID-Vac-Lyo	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology	SARS-CoV-2	Компонент I — репликативно-дефектный Компонент II — репликативно-дефектный Component I — replication-deficient Component II — replication-deficient	Компонент I — рекомбинантные аденовирусные частицы 26 серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2 Компонент II — рекомбинантные аденовирусные частицы 5 серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2 Component I—recombinant adenovirus serotype 26 particles containing SARS-CoV-2 S protein gene Component II—recombinant adenovirus serotype 5 particles containing SARS-CoV-2 S protein gene	Российская Федерация Russian Federation

дозу предпочтительно вводить через 1 год (при необходимости возможно введение до 2 лет после первой вакцинации)⁵. Рекомбинантная живая векторная вакцина Dengvaxia® сконструирована путем замены в аттенуированном штамме вируса желтой лихорадки генов, кодирующих белки rgM и E, генами, кодирующими антигены четырех типов вируса Денге. Вакцина Dengvaxia® для профилактики лихорадки Денге, вызываемой вирусом Денге серотипов 1, 2, 3, 4, зарегистрирована в странах Европейского союза (ЕС) и США⁶. Вакцина показана к применению у детей и взрослых (от 9 месяцев до 45 лет), переболевших лихорадкой Денге (только в лабораторно подтвержденных случаях) и проживающих в эндемичных регионах [6–8]. Рекомбинантная вирусная векторная вакцина Ervebo против лихорадки Эбола сконструирована на основе вируса везикулярного стоматита, содержащего ген гликопротеина (GP) эболавируса Заир, показана к применению у лиц старше 18 лет (одобрена Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA) и Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) в 2019 г.)⁷ [9–13].

В 2020 г. ЕМА были выданы регистрационные удостоверения на лекарственные препараты, которые применяют по двухкомпонентной схеме вакцинации: Zabdeno® (Ad26.ZEBOV) как первый компонент и Mvabea® (MVA-BN-Filo) в качестве второго компонента. Вакцина предназначена для профилактики заболевания, вызываемого эболавирусом Заир, лиц старше одного года. Схема включает применение Ad26.ZEBOV в качестве первого компонента, созданного на основе запатентованной компанией Janssen-Cilag технологии вирусного вектора на основе аденовируса 26 серотипа, кодирующего ген гликопротеина GP вируса Эбола (*Zaire ebolavirus*)⁸, и MVA-BN-Filo в качестве второго компонента на основе модифицированного вируса вакцины Анкара (MVA), кодирующего гены гликопротеинов заирского (*Zaire ebolavirus*) и суданского эболавирусов (*Sudan ebolavirus*), нуклеопротеина эболавируса Тай Форест (*Tai Forest ebolavirus*), а также гликопротеина вируса Марбург (*Marburg marburgvirus*), второй компонент необходимо вводить через 8 недель после первой инъекции⁹ [14–18].

В Российской Федерации зарегистрированы три векторные вакцины против лихорадки Эбола производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России: ГамЭвак, ГамЭвак-Комби и ГамЭвак-Лео¹⁰. В вакцине ГамЭвак действующим веществом является смесь (1:1) рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц на основе аденовируса 5 серотипа, экспрессирующих ген GP вируса Эбола, и рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц на основе того же типа аденовируса, экспрессирующих ген нуклеопротеина (NP) вируса

Эбола. В вакцинах ГамЭвак-Комби и ГамЭвак-Лео компонент А представляет собой рекомбинантные частицы на основе вируса везикулярного стоматита, экспрессирующие ген GP вируса Эбола, компонент Б — рекомбинантные псевдоаденовирусные частицы на основе аденовируса 5 серотипа, экспрессирующие ген GP вируса Эбола. Вакцина показана к применению у взрослых [19–22].

В Российской Федерации по процедуре регистрации препаратов, предназначенных для применения в условиях угрозы возникновения и ликвидации чрезвычайных ситуаций, зарегистрированы рекомбинантные вирусные векторные вакцины с двухкомпонентной схемой вакцинации для профилактики коронавирусной инфекции COVID-19: Гам-КОВИД-Вак (компонент I и компонент II) и Гам-КОВИД-Вак-Лео (компонент I и компонент II)¹¹ [23]. Действующим веществом компонента I являются рекомбинантные аденовирусные частицы 26 серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2, компонента II — рекомбинантные аденовирусные частицы 5 серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2. Вакцина показана к применению у взрослых в возрасте 18–60 лет¹².

Руководства, регламентирующие требования к качеству, безопасности и эффективности живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин в Российской Федерации, странах ЕС, США и Японии

В настоящее время в Российской Федерации проведение доклинических исследований иммунобиологических лекарственных препаратов регламентируется Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты)¹³. При проведении КИ разработчикам рекомендуется учитывать положения Руководства по проведению клинических исследований¹⁴. Оценка качества проводится в соответствии с требованиями общих фармакопейных статей (ОФС) Государственной фармакопеи Российской Федерации, ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты¹⁵, ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины¹⁶. Отдельные требования (рекомендации), регламентирующие оценку качества, безопасности и эффективности живых вирусных векторных вакцин, в России отсутствуют.

Руководства ВОЗ по разработке живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин в настоящее время отсутствуют, вместе с тем опубликован Отчет ВОЗ о консультативной встрече по вопросам характеристик и контроля качества вакцин

⁵ https://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/PQ_277_JE_4dose_SP_PL.pdf

<https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-japanese-encephalitis-vaccine-140203-pi.pdf>

⁶ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/dengvaxia-epar-product-information_en.pdf

<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/dengvaxia>

⁷ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ervebo-epar-product-information_en.pdf

<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/ervebo>

⁸ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zabdeno-epar-product-information_en.pdf

⁹ https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2020/20200701148533/anx_148533_en.pdf

Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 4–5 December 2019. Wkly Epidem Rec. 2020;95:28–30.

¹⁰ <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹¹ Там же.

¹² Там же.

¹³ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2013.

¹⁴ Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

¹⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹⁶ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Таблица 2. Нормативные документы, регламентирующие особенности оценки качества, проведения доклинических и клинических исследований живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин (по Y. Nakayama [3] с изменениями)
Table 2. Regulatory guidelines for quality control, preclinical and clinical studies of live recombinant viral vector vaccines (adapted from Y. Nakayama [3])

Регуляторный орган Regulatory agency	Документы, регламентирующие особенности оценки качества, проведения доклинических и клинических исследований Guidelines for quality control, preclinical and clinical studies	Источник Reference
Европейское агентство по лекарственным средствам, ЕС European Medicines Agency, EU	- Руководство по качеству, доклиническим и клиническим исследованиям живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин - Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines	Сноска ^a Footnote ^a
ВОЗ WHO	- Нормативные документы не разработаны - Отчет ВОЗ о консультативной встрече по вопросам характеристики и контроля качества вакцин на основе живых вирусных векторов - No specific recommendations - Meeting report. WHO informal consultation on characterization and quality aspect of vaccines based on live viral vectors	Сноска ^b Footnote ^b
Министерство здравоохранения, труда и социального обеспечения, Япония Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan	- Нормативные документы в разработке - Документ о текущих нормативных требованиях к рекомбинантным вирусным вакцинам - Specific recommendations under development - Concept paper on the current regulatory requirements for recombinant viral vaccines	Сноска ^c Footnote ^c
Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств, США Food and Drug Administration, USA	- Нормативные документы не разработаны - Руководство по производству. Характеристика и квалификация клеточных субстратов и других биологических материалов, используемых при производстве вирусных вакцин для профилактики инфекционных заболеваний - No specific recommendations - Guidance for industry. Characterization and qualification of cell substrates and other biological materials used in the production of viral vaccines for infectious disease indications	Сноска ^d Footnote ^d

^a Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines (EMA/CHMP/VWP/141697/2009). EMA; 2010. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines>

^b Meeting Report. WHO informal consultation on characterization and quality aspect of vaccines based on live viral vectors. 4-5 December 2003. Geneva, Switzerland; 2003. https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/typhus/viral_vectors/en/

^c RVVRG. Concept paper (in Japanese). <https://www.pmda.go.jp/files/000226581.pdf>

^d Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications. Guidance for Industry. FDA; 2010. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/characterization-and-qualification-cell-substrates-and-other-biological-materials-used-production>

на основе вирусных векторов¹⁷, в котором содержится информация об опыте доклинических и клинических исследований и рекомендации о необходимости разработки такого руководства (табл. 2).

В США также отсутствует руководство по доклинической и клинической оценке живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин. Однако следует отметить, что отделом исследований и обзора вакцин в Центре оценки и исследований биологических препаратов FDA (OVRRC/BER/FDA) в 2010 г. был опубликован документ по контролю качества (производства) вакцин на основе живых аттенуированных вирусов, инактивированных (убитых) цельновирионных или субъединичных вакцин, очищенных рекомбинантных белков, синтетических антигенов и живых вирусных векторов, экспрессирующих специфические гетерологичные вакцинные антигены¹⁸.

В странах ЕС в качестве общего руководства для оценки вакцин применяются Руководства ВОЗ¹⁹. В 2009 г. Европейское агентство по лекарственным средствам (ЕМА) опубликовало руководство (EMA/CHMP/VWP/141697/2009²⁰), в котором изложены требования к качеству, доклиническим и клиническим исследованиям живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин. С 2011 г. со дня вступления в силу в странах ЕС, данное руководство не пересматривалось и по настоящее время является единственным актуальным документом, содержащим требования к этим вакцинам.

В Японии в 2018 г. исследовательская группа по качеству и безопасности рекомбинантных вирусных вакцин, организованная под эгидой Министерства здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии (MHLW), опубликовала документ о текущих нормативных требованиях к рекомбинантным вирусным вакцинам²¹ [1].

¹⁷ Meeting Report. WHO Informal Consultation on Characterization and Quality aspect of vaccines based on live viral vectors. 4-5 December 2003. Geneva, Switzerland; 2003. https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/typhus/viral_vectors/en/

¹⁸ Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications. Guidance for Industry. FDA; 2010. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/characterization-and-qualification-cell-substrates-and-other-biological-materials-used-production>

¹⁹ WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO Technical Report Series No. 927; 2005.

Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. WHO Technical Report Series No. 1004; 2017. <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-TRS-1004-web-annex-9>

²⁰ Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines (EMA/CHMP/VWP/141697/2009). EMA; 2010. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines>

²¹ RVVRG. Concept paper (in Japanese). <https://www.pmda.go.jp/files/000226581.pdf>

Особенности оценки качества живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин

В соответствии с требованиями Руководства ЕМА²² оценка качества рекомбинантных вирусных векторных вакцин должна включать:

- подробное обоснование разработки вакцины, включая информацию о выборе вектора, источнике происхождения гена (генов) гетерологичного антигена и элементах, имеющих отношение к экспрессии трансгена (трансгенов);
- описание свойств посевных материалов рекомбинантного вируса (главного посевного материала, ГПМ, и рабочего посевного материала, РПМ);
- описание и валидацию производственного процесса;

- контроль качества готового лекарственного препарата.

Согласно Руководству ЕМА²³ при оценке качества следует соблюдать требования, содержащиеся в общей монографии 07/2021:0153 Европейской фармакопеи (ЕФ) по вакцинам для медицинского применения²⁴. Кроме того, для рекомбинантных вирусных векторных вакцин, несмотря на то что они не являются препаратами генной терапии и в них не используются векторы, описываемые в общей главе ЕФ 04/2019:51400 по препаратам генной терапии для медицинского применения²⁵, в Руководстве ЕМА указано на необходимость учитывать требования данной главы ЕФ. В таблице 3 представлены показатели качества для препаратов генной терапии для медицинского применения на основе аденовирусных и поксвирусных векторов в соответствии с требованиями ЕФ²⁶.

Таблица 3. Требования к качеству, применяемые к препаратам генной терапии для медицинского применения на основе аденовирусного и поксвирусного векторов, в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи²⁷
Table 3. Quality control of adenovirus-based and poxvirus-based gene therapy medicinal products, in accordance with the requirements of the European Pharmacopoeia²⁷

Стадии производства Manufacturing process stages	Требования к качеству Quality control	
	для аденовирусных векторов, используемых в препаратах генной терапии for adenovirus vectors used in gene therapy medicinal products	для поксвирусных векторов, используемых в препаратах генной терапии for poxvirus vectors used in gene therapy medicinal products
Конструирование вектора Vector construction	Генетическая и фенотипическая стабильность вектора Genetic and phenotypic stability of the vector	
Приготовление клеточного субстрата (клетки-продуценты) для продукции вектора Cell substrate for vector production	Перевиваемая клеточная линия Continuous cell lines	- диплоидные клетки человека; - перевиваемая клеточная линия; - клетки куриных эмбрионов - human diploid cells; - continuous cell lines; - chick-embryo cells
Приготовление посевного материала Preparation of the seed lot	На этапе должны быть определены: - подлинность; - генетические и фенотипические характеристики; - концентрация вектора или инфекционный титр вирусного вектора; - посторонние агенты; - наличие репликационно-компетентных аденовирусов (в случаях, где применимо) At this stage the following is determined: - identification; - genetic and phenotypic characteristics; - vector concentration or viral vector infectious titer; - extraneous agents; - replication-competent adenoviruses (where applicable)	На этапе должны быть определены: - подлинность; - генетические и фенотипические характеристики; - инфекционный титр вирусного вектора; - посторонние агенты At this stage the following is determined: - identification; - genetic and phenotypic characteristics; - viral vector infectious titer; - extraneous agents
Получение вирусного сбора Virus harvest production	На этапе должны быть определены: - подлинность; - концентрация вектора и инфекционный титр вирусного вектора; - посторонние агенты; - контроль клеток по показателям «Подлинность» и «Посторонние агенты» At this stage the following is determined: - identification; - vector concentration or viral vector infectious titer; - extraneous agents; - quality control of cells in terms of identification and extraneous agents	На этапе должны быть определены: - подлинность; - инфекционный титр вирусного вектора; - посторонние агенты; - контроль клеток At this stage the following is determined: - identification; - viral vector infectious titer; - extraneous agents; - quality control of cells

²² Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines (EMA/CHMP/VWP/141697/2009). EMA; 2010. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines>

²³ Там же.

²⁴ 07/2021:0153 Vaccines for Human Use. European Pharmacopoeia 10th ed; 2021.

²⁵ 04/2019:51400 5.14 Gene Transfer Medicinal Products for Human Use. European Pharmacopoeia 10th ed; 2020.

²⁶ Там же.

²⁷ Там же.

Стадии производства Manufacturing process stages	Требования к качеству Quality control	
	для аденовирусных векторов, используемых в препаратах генной терапии for adenovirus vectors used in gene therapy medicinal products	для поксвирусных векторов, используемых в препаратах генной терапии for poxvirus vectors used in gene therapy medicinal products
Очистка вирусного сбора Virus harvest purification	На этапе должны быть определены: - подлинность; - целостность генома; - концентрация векторного вируса; - остаточные белки клетки-хозяина; - остаточная ДНК клетки-хозяина; - вносимые вещества, в том числе вносимые в препарат антибиотики (при отсутствии данных о валидации очистки продукта) At this stage the following is determined: - identification; - genomic integrity; - viral vector concentration; - residual host-cell proteins; - residual host-cell DNA; - residual reagents including residual antibiotics (in the absence of validation data on the degree of product purification)	На этапе должны быть определены: - подлинность; - целостность генома; - инфекционный титр вирусного вектора; - отношение инфекционного титра вектора к концентрации общего белка; - остаточные белки клетки-хозяина; - остаточная ДНК клетки-хозяина; - вносимые вещества, в том числе вносимые в препарат антибиотики (при отсутствии данных о валидации очистки продукта) At this stage the following is determined: - identification; - genomic integrity; - viral vector infectious titer; - ratio of vector infectious titer to total protein concentration; - residual host-cell proteins; - residual host-cell DNA; - residual reagents including residual antibiotics (in the absence of validation data on the degree of product purification)
Получение готового нерасфасованного продукта Final bulk production	Стерильность Sterility	
Получение готового лекарственного препарата Final lot production	На этапе должны быть определены: - подлинность; - pH; - вода; - извлекаемый объем; - осмоляльность; - концентрация вирусных векторных частиц; - инфекционный титр вирусного вектора; - соотношение концентрации вирусных векторных частиц к инфекционному титру вирусного вектора; - экспрессия генетического материала в препарате; - специфическая (биологическая) активность; - стерильность; - бактериальные эндотоксины; - бычий сывороточный альбумин (при использовании в процессе производства); - концентрация репликационно-компетентных аденовирусов; - агрегация вирусного вектора; - термическая стабильность At this stage the following is determined: - identification; - pH; - residual moisture; - extractable volume; - osmolality; - viral vector particle concentration; - viral vector infectious titer; - ratio of viral vector particle concentration to viral vector infectious titer; - expression of the genetic insert in the product; - specific (biological) activity; - sterility; - bacterial endotoxins; - bovine serum albumin (where bovine serum is used during production); - replication-competent adenovirus concentration; - viral vector aggregates; - thermal stability	На этапе должны быть определены: - подлинность; - pH; - вода; - извлекаемый объем; - осмоляльность; - инфекционный титр вирусного вектора; - экспрессия генетического материала в препарате; - специфическая (биологическая) активность; - стерильность; - бактериальные эндотоксины; - бычий сывороточный альбумин (при использовании в процессе производства); - термическая стабильность At this stage the following is determined: - identification; - pH; - residual moisture; - extractable volume; - osmolality; - viral vector infectious titer; - expression of the genetic insert in the product; - specific (biological) activity; - sterility; - bacterial endotoxins; - bovine serum albumin (where bovine serum is used during production); - thermal stability

Для рекомбинантных вирусных векторных вакцин должно быть представлено подробное обоснование разработки вакцины в соответствии со стадиями производства (табл. 3).

Стадия конструирования вектора. При описании разработки вакцины необходимо включать информацию о выборе вектора, источнике происхождения гена (генов) гетерологичного антигена и регуляторных генетических элементах для экспрессии целевого генетического материала. Также следует подробно описать все генно-инженерные манипуляции, например сайт-специфические мутации, вставки, делеции и/или перестройки в любом компоненте в сравнении с его естественным эквивалентом. Если в конструкцию вакцины входят транскрипционные или трансляционные элементы для регуляции (например, временной или тканеспецифической) экспрессии трансгена, необходимо предоставить фактическое подтверждение подобной специфичности на основе результатов описания свойств препарата и данных его контроля.

Стадия приготовления клеточного субстрата (клеток-продуцентов) для продукции вектора. При оценке качества вакцины следует описать клеточный субстрат, используемый для культивирования и/или сборки вируса. Описание должно включать историю клеточной линии, условий ее культивирования в процессе производства вакцины, а также ее подлинность и свойства. При работе с клеточными культурами особое внимание должно уделяться предотвращению перекрестной контаминации другими клетками или вирусами и контаминации посторонними агентами²⁸. Для «пакующих» клеточных линий следует указывать подробные данные о векторной конструкции, включая природу и расположение хелперной (вспомогательной) вирусной нуклеиновой кислоты, и кодируемых ею белках, их функций.

Стадия приготовления посевного материала (ГПМ и РПМ). Серии посевного материала готовят посредством пассирования рекомбинантного вируса в клеточном субстрате, используемом при производстве вакцины. Характер описания свойств посевного материала зависит от ряда факторов, в том числе от природы вирусного вектора, происхождения и природы гетерологичного гена (генов), природы генетических модификаций, истории субстрата, используемого для получения посевного материала, применения клональной селекции и природы реагентов, используемых для получения посевных материалов. Описание свойств ГПМ включает описание генетических и фенотипических свойств вакцинного вируса, сравнение с исходным вектором, особенно в тех случаях, когда модификация вектора может влиять на аттенуацию, патогенность, тропизм к ткани или видоспецифичность вакцинного вируса в сравнении с исходным вектором. Описание генетических свойств должно включать

анализ нуклеотидной последовательности вакцинного вируса; полезным дополнением могут служить рестрикционное картирование, саузерн-блоттинг, анализ ПЦР или ДНК-фингерпринтинг. Следует описать отдельные регуляторные элементы, задействованные в экспрессии гетерологичного гена (генов). Требуется подтверждение генетической стабильности посевного материала²⁹. При описании фенотипических свойств основное внимание следует уделять маркерам аттенуации/модификации, экспрессии гетерологичного антигена (антигенов) в *in vitro* и *in vivo* условиях, позволяющих детектировать ревертанты. Кроме того, описание свойств также должно включать другие исследования, в том числе антигенный анализ, инфекционный титр вируса, количество вирусных частиц, урожай вируса *in vitro* и характеристики роста вируса *in vivo* на подходящей животной модели. Для некоторых вакцин в дополнение или вместо определения инфекционного титра должно определяться количество вирусных частиц. Следует подробно описать прогнозируемый жизненный цикл ГПМ и РПМ для изготовления вакцины и предполагаемую периодичность получения новых рабочих посевных материалов. Следует предоставить информацию об условиях хранения посевных материалов и об их стабильности в течение срока хранения³⁰. Если для получения ГПМ и РПМ используются материалы животного происхождения, следует соблюдать требования, изложенные в Руководстве по минимизации риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных через лекарственные препараты медицинского и ветеринарного применения³¹, а также требования руководства ЕС по использованию сыворотки крупного рогатого скота³².

Вакцину следует получать из РПМ с минимальным числом промежуточных пассажей. Число пересевов из РПМ не должно превышать число пассажей, имевших место при производстве вакцины, которая была признана удовлетворительной в ходе клинических исследований. В производстве могут использоваться различные субстраты, в том числе первичные клетки, диплоидные клетки, перевиваемые клеточные линии и развивающиеся куриные эмбрионы. Диплоидные клетки и перевиваемые клеточные линии должны соответствовать требованиям главы 5.2.3 ЕФ³³. Следует также учитывать положения Рекомендаций ВОЗ³⁴. За исключением первичных культур клеток куриных эмбрионов, следует избегать использования первичных клеток, в противном случае их использование должно быть надлежащим образом обосновано. Общие рекомендации по использованию первичных клеточных культур приведены в Приложении 1 к документу ICH Q5D³⁵. Стада кур, используемые в качестве источника клеток куриных эмбрионов, должны соответствовать требованиям общей главы 5.2.2 ЕФ³⁶. Если в производстве используются трансформированные клетки,

²⁸ Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines (EMA/CHMP/VWP/141697/2009). EMA; 2010. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines>

²⁹ Там же.

³⁰ Там же.

³¹ Minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products (EMA/410/01 Rev. 3). <https://www.ema.europa.eu/en/minimising-risk-transmitting-animal-spongiform-encephalopathy-agents-human-veterinary-medicinal>

³² Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products (EMA/CHMP/BWP/457920/2012 rev 1). EMA; 2013. <https://www.ema.europa.eu/en/use-bovine-serum-manufacture-human-biological-medicinal-products>

³³ 5.2.3. Cell substrates for the production of vaccines for human use. European Pharmacopoeia 10th ed; 2020.

³⁴ Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. WHO Technical Report Series No. 978; 2013 https://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf?ua=1

³⁵ ICH Topic Q5D. Note for guidance on quality of biotechnological products: derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products (CPMP/ICH/294/95). EMA; 1998. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-d-derivation-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf

³⁶ 5.2.2. Chicken flocks free from specified pathogens for the production and control of vaccines. European Pharmacopoeia 10th ed; 2020.

следует учитывать требования соответствующих разделов руководства ICH Q5D³⁷.

Стадия получения вирусного сбора. Для вирусного сбора следует проводить испытание по показателю «Подлинность», которое должно включать испытание на подлинность экспрессируемого гетерологичного антигена и векторного вируса³⁸. Титр вируса следует определять при помощи валидированного метода, желательно, чтобы инфекционный титр выражался в показателе средней инфекционной дозы для клеточной культуры (cell culture infectious dose, CCID₅₀) или бляшкообразующих единицах (БОЕ). Следует утвердить минимальные допустимые титры, позволяющие использовать отдельный сбор вируса в приготовлении объединенного вирусного сбора или готового нерасфасованного продукта. Для каждого отдельного сбора должны быть проведены испытания по показателю «Посторонние агенты». Для некоторых репликационно-дефектных вакцинных вирусов, например вакцин на основе репликационно-дефектных аденовирусных векторов, могут понадобиться испытания по показателю «Репликационно-компетентные вирусы». Для отдельных вирусных сборов также должны проводиться испытания по показателям «Стерильность» и «Отсутствие микоплазм».

Стадия получения готового нерасфасованного продукта. Из объединенных вирусных сборов (одного или нескольких) изготавливают готовый нерасфасованный продукт. Следует описать стратегию, используемую для объединения отдельных вирусных сборов при получении вакцины. Для объединенных вирусных сборов необходимо проводить испытания по показателю «Стерильность». Добавление антибиотиков в качестве антимикробных консервантов, как правило, неприемлемо³⁹. Для препаратов в многодозовой упаковке необходимо представить обоснование использования антимикробного консерванта с учетом возможной контаминации препарата во время его использования и максимального рекомендованного срока использования после вскрытия первичной упаковки или восстановления вакцины. При изготовлении готовой лекарственной формы (ГЛФ) вакцины необходимо учитывать частичную потерю инфекционного титра вируса во время розлива, лиофилизации и хранения.

Стадия получения готового лекарственного препарата (вакцины). Образцы каждой серии готовой вакцины должны проходить испытания по показателям «Стерильность», «Подлинность» и «Специфическая активность»⁴⁰. Следует также проводить испытание по показателю «Термическая стабильность». Результаты анализа производственных серий по показателю «Бактериальные эндотоксины» должны укладываться в утвержденные нормы. Для лиофилизированных вакцин следует проводить испытание по показателю «Вода»⁴¹. Испытания готовой вакцины должны включать испытания по показателям «Остаточные белки клетки-хозяина», «Вносимые вещества»,

«Остаточные белки сыворотки животных» (например, «Бычий сывороточный альбумин»), полученные значения должны находиться в пределах, установленных в спецификации. При использовании в производстве перевиваемой клеточной линии необходимо проводить испытание по показателю «Остаточная ДНК клетки-хозяина»⁴². Если эти испытания проводились для готовой нерасфасованной вакцины и результаты были удовлетворительными, то испытание можно не проводить для готового препарата.

Следует определять специфическую активность каждой серии готовой вакцины. Должно быть проведено определение инфекционного титра вирусного вектора. В некоторых случаях более целесообразным является определение числа вирусных частиц в качестве дополнительного или единственного испытания. Если проводится определение и инфекционного титра вирусного вектора, и числа векторных вирусных частиц, можно определить соотношение между этими показателями, которое необходимо включить в спецификацию для выпуска готового препарата. В других случаях определение специфической активности может основываться на детекции экспрессии гетерологичного антигена *in vitro* или определении иммуногенности *in vivo*. Значение показателя активности, включаемое в спецификацию для выпуска готового препарата, должно быть обосновано с использованием данных доклинических и/или клинических исследований, полученных для разрабатываемой вакцины⁴³.

Особенности доклинических исследований живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин

К живым вакцинам на основе рекомбинантных вирусных векторов применимы рекомендации руководства ВОЗ по доклинической оценке вакцин⁴⁴. Доклинические исследования безопасности и иммунологической эффективности должны проводиться с использованием адекватной модели животных. При выборе животных для проведения исследований безопасности и эффективности вакцины необходимо, если это возможно, чтобы восприимчивость животных к инфекционному агенту и патогенез инфекционного процесса были максимально близки к таковым у человека. Кроме того, выбранная животная модель должна быть восприимчивой к вирусному вектору, который используется при разработке вакцины, т.е. уровень его репликации, вирулентность и биораспределение в организме животного должны быть максимально похожи на прогнозируемые при применении у людей. Исследования безопасности и защитных свойств (протективности) вакцины, если это возможно, следует проводить на одной и той же животной модели.

Требуется проведение анализа предсуществующего иммунитета, поскольку он может оказать влияние на результаты доклинических и клинических исследований. С одной стороны, это связано с тем, что иммунный ответ, не обеспечивающий

³⁷ Note for guidance on quality of biotechnological products: derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products (CPMP/ICH/294/95). EMA; 1998. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-d-derivation-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf

³⁸ Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines (EMA/CHMP/VWP/141697/2009). EMA; 2010. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines>

³⁹ Там же.

⁴⁰ Там же.

⁴¹ Там же.

⁴² Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. WHO Technical Report Series No. 978; 2013 https://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf?ua=1

⁴³ Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines (EMA/CHMP/VWP/141697/2009). EMA; 2010. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines>

⁴⁴ WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO Technical Report Series No. 927; 2005. https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/nonclinical_evaluation/ANNEX%20Nonclinical.P31-63.pdf?ua=1

защиту от инфекции, может изначально присутствовать в организме в связи с перекрестной реактивностью к родственному или дикому вариантам вектора и/или к источнику гена-вставки — целевого антигена. С другой стороны, после иммунизации животных, которые являются «наивными» к вакцинному вирусу-вектору и целевому антигену, могут возникнуть непредвиденные реакции, связанные с безопасностью, что потребует проведения дополнительных доклинических исследований безопасности. Исследования по оценке иммуногенности следует проводить на животных, характеризующихся наиболее адекватным иммунным ответом на исследуемую вакцину. В случае отсутствия подходящей животной модели следует учесть эти аспекты в клинических исследованиях, особенно в исследованиях профилактической эффективности.

Исследование фармакодинамики. Данные по оценке иммуногенности на релевантных видах животных должны быть получены до начала клинических исследований. Исследования иммуногенности должны включать количественную и качественную оценку иммунного ответа с учетом дозы и схемы введения вакцины. Исследования иммуногенности должны предусматривать оценку гуморального, клеточно-опосредованного и врожденного иммунного ответа как в отношении целевого антигена, так и в отношении вирусного вектора, поскольку последний вносит вклад в иммунный ответ на вакцину и получение этих данных необходимо для оценки возможности повторного применения вирусного вектора в составе другой вакцины. Следует оценить корреляцию между уровнем антител и другими звеньями иммунного ответа (например, изменения цитокинового профиля) и уровнем защиты от инфекции. Это ключевые данные, которые должны быть получены на стадии разработки препарата⁴⁵. Следует принимать во внимание предсуществующий иммунный ответ к вирусному вектору и/или целевому (гетерологичному) антигену в составе векторной вакцины.

Исследование токсичности при однократном и многократном введении. При разработке стратегии испытаний следует использовать гибкий, научно обоснованный принцип доклинической оценки безопасности. Оценка токсичности как при однократном, так и при многократном введении следует проводить с препаратом сравнения⁴⁶. Необходимо также предоставить информацию по исследованиям в отношении собственно вектора без вставки целевого антигена. В случае если в исследованиях токсичности при многократном введении обнаружено, что иммунитет к вектору влияет на иммунный ответ при введении последующих доз вакцины, тем самым ставя под сомнение результаты данного исследования, возможно проведение исследования токсичности только при однократном введении.

Исследование биораспределения. Следует проводить исследования биораспределения живого рекомбинантного вакцинного вируса во всех тканях и органах. Исследование биораспределения может включать изучение вирусовыделения, определения вирусных антигенов или вирусного генетического материала. Прохождение через гематоэнцефалический барьер может свидетельствовать о потенциальной нейровирулентности⁴⁷.

Исследование репродуктивной и онтогенетической токсичности. Изучение репродуктивной токсичности требуется

в случае, если предполагается применять вакцину у беременных и кормящих женщин. В случае если в исследованиях биораспределения была показана вероятность репликации вируса в органах репродуктивной системы, требуется проведение исследований репродуктивной токсичности⁴⁸.

Исследование местной переносимости. Необходимо проводить исследования местной переносимости. Данное исследование можно сочетать с другими исследованиями токсичности. Препарат вводят тем способом и в дозе, которая предполагается для использования у человека.

Особенности проведения клинических исследований живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин

Иммуногенность векторной вакцины. Гуморальные и клеточные иммунные ответы на экспрессируемый чужеродный антиген (антигены) и на вирусный вектор следует исследовать на как можно более раннем этапе программы клинических исследований⁴⁹. Масштаб исследований будет зависеть от результатов доклинических исследований и имеющейся информации о векторе, если он ранее использовался в других вакцинах [1].

При оценке иммуногенности векторной вакцины необходимо представить данные:

- о предсуществующем иммунном ответе к вирусному вектору (например, связанном с естественным контактом с вирусами, на основе которых был сконструирован вектор, при этом иммунный ответ может сильно отличаться в разных географических регионах и группах риска; или связанном с предшествующим введением вакцины, содержащей тот же самый вирусный вектор или его компоненты; или связанном с антителами матери);
- о природе иммунного ответа на вирусный вектор (например, нейтрализующие антитела и антитела, не обладающие нейтрализующей активностью, клеточно-опосредованный иммунитет и изучение длительности иммунитета; при необходимости проведение исследований продолжают также в пострегистрационном периоде);
- о корреляции (положительной или отрицательной) между иммунными ответами на вирусный вектор и на экспрессируемый гетерологичный антиген (антигены) на основе научного обоснования полученных результатов (представление доказательств);
- об общих иммунологических эффектах, вызванных одновременным или последовательным введением вакцин на основе вирусных векторов, в которых используется один и тот же вектор, но экспрессируются разные чужеродные белки (в случае если применимо).

Оценка безопасности. Оценка безопасности должна проводиться начиная с как можно более раннего этапа программы клинических исследований и продолжаться на всем ее протяжении, включая, в случае необходимости, пострегистрационный период. Некоторые вопросы, требующие рассмотрения, относятся ко всем живым вакцинам.

Масштаб исследований будет зависеть от данных по оценке качества, результатов доклинических исследований и уже имеющейся информации о векторе, если он ранее использовался в составе других вакцин. Исследования безопасности необходимо проводить с учетом известных свойств вектора.

При оценке безопасности векторной вакцины должны быть рассмотрены следующие вопросы⁵⁰:

⁴⁵ Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines (EMA/CHMP/VWP/141697/2009). EMA; 2010. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines>

⁴⁶ Там же.

⁴⁷ Там же.

⁴⁸ Там же.

⁴⁹ Там же.

⁵⁰ Там же.

- риск образования репликационно-компетентного вируса из репликационно-дефектного вирусного вектора;
- риск реверсии к вирулентному штамму вируса, которая также может иметь место во время производства серии вакцины или в организме вакцинируемых пациентов;
- риск рекомбинации или реассортации с другими инфекционными агентами, которая может случайно произойти в организме вакцинируемых пациентов во время введения вакцины;
- специфические нежелательные явления, которые могут быть связаны с биораспределением вирусного вектора в различных тканях и органах;
- оценка степени и длительности выделения вакцинного вируса организмом и возможности передачи вакцинного вируса от вакцинированных к контактным людям;
- риск интеграции генов вирусного вектора в геном клетки-хозяина;
- риск того, что вакцинация спровоцирует развитие аутоиммунных заболеваний;
- риск возникновения нежелательных реакций у популяции пациентов, которые имеют определенную генетическую предрасположенность;
- риск повышенной восприимчивости к инфекции, вызываемой агентом, против которого направлено действие вакцины, из-за повышенного иммунного ответа к вирусному вектору.

Оценка эффективности. Оценка эффективности вакцины проводится в соответствии с руководством ВОЗ⁵¹. Если иммунные корреляты защиты не установлены, а также в случае отсутствия зарегистрированной вакцины с установленной эффективностью, клинические исследования протективной эффективности являются обязательными. Необходимость проведения исследований эффективности в условиях рутинной вакцинации следует обсудить с уполномоченными органами.

Потенциальная польза и риск применения живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин

Основными преимуществами живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин являются следующие [1]:

- вакцина потенциально может индуцировать не только гуморальный, но и клеточный иммунный ответ;
- возможность разработки вакцин против высокопатогенных инфекций, для которых классические инактивированные и живые вакцины недоступны либо их сложно производить;
- технологичность;
- более низкий риск реверсии вирулентности по сравнению с классическими живыми вакцинами (в случае репликационно-дефектных вирусных векторных вакцин).

К возможным рискам, возникающим при применении живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин, относятся следующие факторы [1]:

- наличие ограниченного объема данных об опыте их клинического применения;
- риск нежелательного биораспределения и экспрессии антигена в организме человека;
- риск рекомбинации вакцинного вектора с вирусами дикого типа;
- риск передачи вакцинного вируса от вакцинированных к контактным людям;
- потенциальная патогенность для иммунокомпрометированных лиц;
- риск реверсии вирулентности вирусного вектора.

Опыт применения аденовирусных векторных вакцин для профилактики COVID-19 в период пандемии свидетельствует об их безопасности и эффективности, что позволяет рассчитывать на достаточно хорошие перспективы дальнейшего развития вакцин данного типа, в том числе для использования в рамках рутинной иммунопрофилактики.

Заключение

На сегодняшний день имеются ограниченные данные об опыте клинического применения живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин. В мире зарегистрированы несколько живых рекомбинантных векторных вакцин против лихорадки Эбола и Денге, японского энцефалита, COVID-19. В настоящее время многие вакцины на основе вирусных векторов находятся на различных этапах исследований (доклинические исследования, клинические исследования фаз 1 и 2). В Российской Федерации вакцины Гам-КОВИД-Вак (торговое обозначение «Спутник V») и Гам-КОВИД-Вак-Лео зарегистрированы по процедуре регистрации препаратов, предназначенных для применения в условиях угрозы возникновения и ликвидации чрезвычайных ситуаций.

Разработка руководства (методических рекомендаций) по качеству, доклиническим и клиническим исследованиям живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин в Российской Федерации остается актуальной задачей. Результаты анализа подходов к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований живых рекомбинантных вирусных векторных вакцин могут быть полезны при разработке гармонизированных с международными нормами руководств в сфере обращения лекарственных средств.

Вклад авторов. Л. М. Хантимирова — дизайн статьи, обработка и анализ данных литературы, написание текста рукописи; Д. В. Горенков — анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; С. Г. Гусева — анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; В. А. Меркулов — критическое обсуждение текста рукописи, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; А. А. Солдатов — критическое обсуждение и редактирование текста рукописи.

Authors' contributions. Leysan M. Khantimirova—elaboration of the study design, review and analysis of literature, writing of the text; Dmitry V. Gorenkov—analysis of literature, editing of the text; Svetlana G. Guseva—analysis of literature, editing of the text; Vadim A. Merkulov—revision of the paper, approval of the final version of the paper for publication; Aleksandr A. Soldatov—revision and editing of the paper.

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

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

Конфликт интересов. 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. Sakurai A, Ogawa T, Matsumoto J, Kihira T, Fukushima S, Miyata I, et al. Regulatory aspects of quality and safety for live recombinant viral vaccines against infectious diseases in Japan. *Vaccine*. 2019;37(43):6573–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.08.031>

⁵¹ Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. WHO Technical Report Series No. 1004; 2017. <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-TRS-1004-web-annex-9>

- Monath TP, Seligman SJ, Robertson JS, Guy B, Hayes EB, Condit RC, et al. Live virus vaccines based on a yellow fever vaccine backbone: standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*. 2015;33(1):62–72. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.10.004>
- Nakayama Y, Aruga A. Comparison of current regulatory status for gene-based vaccines in the U.S., Europe and Japan. *Vaccines*. 2015;3(1):186–202. <https://doi.org/10.3390/vaccines3010186>
- Chokephaibulkit K, Houillon G, Feroldi E, Bouckennooghe A. Safety and immunogenicity of a live attenuated Japanese encephalitis chimeric virus vaccine (IMOJEV®) in children. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(2):153–66. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1123097>
- Capeding MR, Alberto ER, Bouckennooghe A, Laot TM, Chansinghakul D, Monfredo C, et al. Five-Year antibody persistence following a Japanese encephalitis chimeric virus vaccine (JE-CV) booster in JE-CV-primed children in the Philippines. *J Infect Dis*. 2018;217(4):567–71. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix601>
- Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observermasked, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014;384(9951):1358–65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61060-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61060-6)
- Thomas SJ, Yoon IK. A review of Dengvaxia: development to deployment. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(10):2295–314. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1658503>
- Guy B, Noriega F, Ochiali RL, L'azou M, Delore V, Skipetrova A, et al. A recombinant live attenuated tetravalent vaccine for the prevention of dengue. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16(7):671–84. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1335201>
- Huttner A, Dayer JA, Yerly S, Combescure C, Auderset F, Desmeules J, et al. The effect of dose on the safety and immunogenicity of the VSV Ebola candidate vaccine: a randomized double-blind placebo-controlled phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(10):1156–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00154-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00154-1)
- Henao-Restrepo AM, Camacho A, Longini IM, Watson CH, Edmunds WJ, Egger M, et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). *Lancet*. 2017;389(10068):505–18. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32621-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32621-6)
- Coller BA, Blue J, Das R, Dubey S, Finelli L, Gupta S, et al. Clinical development of a recombinant Ebola vaccine in the midst of an unprecedented epidemic. *Vaccine*. 2017;35(35, Pt A):4465–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.097>
- Juan-Giner A, Tchaton M, Jemmy JP, Soumah A, Boum Y, Faga EM, et al. Safety of the rVSV ZEBOV vaccine against Ebola Zaire among frontline workers in Guinea. *Vaccine*. 2019;37(48):7171–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.09.009>
- Regules JA, Beigel JH, Paolino KM, Voell J, Castellano AR, Hu Z, et al. A recombinant vesicular stomatitis virus Ebola vaccine. *N Engl J Med*. 2017;376(4):330–41. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414216>
- Goldstein N, Bockstal V, Bart S, Luhn K, Robinson C, Gaddah A, et al. Safety and immunogenicity of heterologous and homologous two dose regimens of Ad26- and MVA-vectored Ebola vaccines: a randomized, controlled phase 1 study. *J Infect Dis*. 2020;jiaa586. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa586>
- Pollard AJ, Launay O, Lelievre JD, Lacabaratz C, Grande S, Goldstein N, et al. Safety and immunogenicity of a two-dose heterologous Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola vaccine regimen in adults in Europe (EBOVAC2): a randomised, observer-blind, participant-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2021;21(4):493–506. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30476-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30476-X)
- Milligan ID, Gibani MM, Sewell R, Clutterbuck EA, Campbell D, Plested E, et al. Safety and immunogenicity of novel adenovirus type 26- and modified vaccinia Ankara-vectored Ebola vaccines: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2016;315(15):1610–23. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.4218>
- Mutua G, Anzala O, Luhn K, Robinson C, Bockstal V, Anumadem D, Douoguih M. Safety and immunogenicity of a 2-dose heterologous vaccine regimen with Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola vaccines: 12-month data from a phase 1 randomized clinical trial in Nairobi, Kenya. *J Infect Dis*. 2019;220(1):57–67. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz071>
- Anywaine Z, Whitworth H, Kaleebu P, Praygod G, Shukarev G, Manno D, et al. Safety and immunogenicity of a 2-dose heterologous vaccination regimen with Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola vaccines: 12-month data from a phase 1 randomized clinical trial in Uganda and Tanzania. *J Infect Dis*. 2019;220(1):46–56. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz070>
- Dolzikhova IV, Zubkova OV, Tikhvatulin AI, Dzharullaeva AS, Tikhvatulina NM, Shcheblyakov DV, et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(3):613–20. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1238535>
- Должихова ИВ, Токарская ЕА, Джаруллаева АШ, Тухватулин АИ, Щебляков ДВ, Воронина ОЛ и др. Векторные вакцины против болезни, вызванной вирусом Эбола. *Acta Naturae (русскоязычная версия)*. 2017;9(34):4–12. [Dolzikhova IV, Tokarskaya EA, Dzharullaeva AS, Tikhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Voronina OL, et al. Virus-vectored Ebola vaccines. *Acta Naturae*. 2017;3(34):4–12 (In Russ.)]
- Колесников ВВ, Жоголев СД, Кузин АА, Шипицын КС. Геморрагическая лихорадка Эбола. Особенности проведения санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий. *Инфекция и иммунитет*. 2017;S:541. [Kolesnikov VV, Zhogolev SD, Kuzin AA, Shipitsyn KS. Ebola hemorrhagic fever. Features of carrying out sanitary and anti-epidemic (preventive) measures. *Infektsiya i immunitet = Infection and Immunity*. 2017;S:541 (In Russ.)]
- Бирюков ДВ, Волобуев СВ. Современные подходы к вакцинопрофилактике болезни, вызываемой вирусом Эбола. В кн.: VII Лужские научные чтения. Современное научное знание: теория и практика. Материалы международной научной конференции. СПб.; 2019. С. 133–7. [Biryukov DV, Volobuev SV. Modern approaches to vaccine prevention of the disease caused by the Ebola virus. In: VII Luga scientific readings. Modern scientific knowledge: theory and practice. Materials of the international scientific conference. St. Petersburg; 2019. P. 133–7 (In Russ.)]
- Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tikhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)

Об авторах / Authors

Хантимирова Лейсан Маратовна, канд. биол. наук. *Leysan M. Khantimirova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6269-0201>

Горенков Дмитрий Витальевич. *Dmitry V. Gorenkov*. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>

Гусева Светлана Геннадиевна. *Svetlana G. Guseva*. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7341-101X>

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

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

Поступила 08.12.2020

После доработки 21.10.2021

Принята к публикации 10.12.2021

Received 8 December 2020

Revised 21 October 2021

Accepted 10 December 2021

Сравнительная характеристика существующих платформ для создания вакцин против опасных и особо опасных вирусных инфекций, обладающих пандемическим потенциалом

Г. Г. Онищенко¹, Т. Е. Сизикова², В. Н. Лебедев², С. В. Борисевич^{2,*}

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, ул. Октябрьская, д. 11, Сергиев Посад-6, Московская область, 141306, Российская Федерация

Спонтанное появление более вирулентных для человека штаммов возбудителей инфекционных заболеваний, способствующих трансмиссии патогенных микроорганизмов изменения окружающей среды, социально-экономические факторы, возрастание уровня контактов между различными регионами являются основными причинами возникновения новых инфекционных заболеваний, в том числе обладающих пандемическим потенциалом. Для успешной борьбы с пандемией необходимо проведение массовой вакцинации против соответствующей нозологической формы инфекции, направленной на активное формирование коллективного иммунитета, в основе которого лежит непрякая защита человеческой популяции в целом, при иммунизации определенной ее части. Обоснованный выбор платформы для разработки вакцины является важным звеном решения данной задачи. Цель работы — сравнительная характеристика платформ для создания вакцин (аттенуированных, инактивированных, субъединичных, векторных рекомбинантных вакцин, ДНК- и РНК-вакцин), предназначенных для проведения массовой иммунизации против опасных и особо опасных вирусных инфекций, обладающих пандемическим потенциалом. В качестве возможных возбудителей таких инфекций рассмотрены представители семейств *Poxviridae*, *Orthomyxoviridae* и *Coronaviridae*. Проведено сравнение платформ для создания вакцин по следующим показателям: возможность формирования полноценного иммунного ответа; защитная эффективность; время, необходимое для проведения разработки и испытания вакцин; возможность производства объемов вакцины, необходимых для проведения массовой иммунизации; возможные препятствия при использовании вакцин по целевому назначению. Предполагается, что в ближайшие десятилетия приоритетными вакцинными платформами для создания защитных препаратов против опасных и особо опасных вирусных инфекций с пандемическим потенциалом, независимо от таксономической принадлежности их возбудителей, станут ДНК- или РНК-вакцины.

Ключевые слова: поксвирусы; ортомиксовирусы; коронавирусы; вирус SARS-CoV-2; COVID-19; массовая иммунизация; инактивированные вакцины; субъединичные вакцины; векторные рекомбинантные вакцины; РНК-вакцины; ДНК-вакцины

Для цитирования: Онищенко ГГ, Сизикова ТЕ, Лебедев ВН, Борисевич СВ. Сравнительная характеристика существующих платформ для создания вакцин против опасных и особо опасных вирусных инфекций, обладающих пандемическим потенциалом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(4):225–233. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-225-233>

* **Контактное лицо:** Борисевич Сергей Владимирович; 48cnii@mail.ru

Comparative analysis of existing platforms for the development of vaccines against dangerous and extremely dangerous viral infections with pandemic potential

G. G. Onishchenko¹, T. E. Sizikova², V. N. Lebedev², S. V. Borisevich^{2,*}

¹ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

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

The main triggers of new infectious diseases, including those with pandemic potential, are: spontaneous emergence of infectious strains which are more virulent for humans and contribute to transmission of pathogenic microorganisms, environmental changes, social and economic factors, increased contact rates between different regions. A successful pandemic response requires mass immunisation against a specific disease, aimed at the development of herd immunity which is based on the concept of indirect protection of the whole of the population by immunising a part of it. A well-grounded choice of the vaccine platform is central to dealing with this problem. The aim of the study was to compare characteristics of vaccine platforms (attenuated, inactivated, subunit, recombinant vector, DNA, and RNA vaccines) intended for mass immunisation against dangerous and extremely dangerous viral infections with pandemic potential. The study focused on the members of *Poxviridae*, *Orthomyxoviridae* and *Coronaviridae* families as potential pathogens. The vaccine platforms were compared in terms of the following parameters: capability of producing a robust

immune response; protective efficacy; time required for vaccine development and testing; ability to produce vaccine in volumes required for mass immunisation; potential obstacles associated with the intended use of the vaccine. It is expected that in the next few decades DNA and RNA vaccine platforms will be most widely used for development of products against dangerous and extremely dangerous viral infections with pandemic potential, regardless of taxonomic groups of pathogens.

Key words: poxviruses; orthomyxoviruses; coronaviruses; SARS-CoV-2 virus; COVID-19; mass immunisation; inactivated vaccines; subunit vaccines; recombinant vector vaccines; RNA vaccines; DNA vaccines

For citation: Onishchenko GG, Sizikova TE, Lebedev VN, Borisevich SV. Comparative analysis of existing platforms for the development of vaccines against dangerous and extremely dangerous viral infections with pandemic potential. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(4):225–233. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-225-233>

Corresponding author: Sergey V. Borisevich; 48cnii@mail.ru

Основными причинами возникновения новых инфекционных заболеваний, в том числе и обладающих пандемическим потенциалом, являются эволюционные изменения микроорганизмов (спонтанное появление более вирулентных для человека штаммов возбудителей), способствующие трансмиссии инфекционных заболеваний изменения окружающей среды, социально-экономические факторы, возрастание уровня контактов между различными регионами. За все время существования человечества, по мере увеличения численности населения, новые инфекционные заболевания представляли перманентную угрозу и наносили все более значимый урон. Например, в ходе эпидемий, вызванных возбудителями натуральной оспы и чумы, погибало свыше одной трети общего числа населения [1]. По разным оценкам, пандемия «испанки» — заболевания, вызванного вирусом гриппа А, подтипа H1N1, унесла жизни от 17 до 100 млн человек [2].

Современный уровень развития медицины позволяет избежать таких катастрофических потерь. Тем не менее начавшаяся в 2020 г. пандемия COVID-19 только за один год стала причиной около 120 млн подтвержденных случаев заболевания, число жертв которого превысило 4,8 млн¹. Сопоставление количества инфицированных с общей численностью населения указывает на то, что борьба с пандемией еще далека от своего завершения.

Этиологические агенты вновь возникающих вирусных инфекционных заболеваний относятся к различным таксономическим группам ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Опасность возбудителей этих инфекций для здравоохранения обусловлена не только тяжестью вызываемых ими заболеваний, но и очень часто отсутствием на первых этапах пандемии четкого описания характерных клинических признаков инфекции, что затрудняет проведение диагностических исследований (особенно в неэндемичных регионах). Выявление и идентификация возбудителей могут быть проведены только в специализированных центрах. При этом средства специфической профилактики и лечения вновь возникающих вирусных инфекций на первых этапах возникновения пандемии отсутствуют.

Анализ пандемий инфекционных заболеваний, на примере пандемии «испанки» в 1918–1920 гг. и пандемии COVID-19, начавшейся в 2020 г., наглядно показывает степень их угрозы для здравоохранения.

Для характеристики темпов распространения заболевания в иммунологии широко используют показатель R_0 — базовое репродуктивное число инфекции (среднее число людей, заражаемых одним больным). При $R_0 < 1$ вспышка затухает, при $R_0 = 2$ происходит заражение 80% популяции [3].

Как карантинные, так и профилактические меры борьбы с распространением заболевания в конечном счете направлены на снижение показателя R_0 .

Карантинные меры сводятся главным образом к изоляции больных либо к общему снижению числа социальных контактов в популяции. Однако при COVID-19 изоляция больных не является эффективным приемом вследствие большого числа легких и бессимптомных случаев, а также установленной возможности трансмиссии возбудителя еще на ранней стадии заболевания до проведения диагностики. Следует отметить, что снижение уровня социальных контактов не только крайне негативно влияет на все сферы деятельности общества, но и делает реальной возможность возникновения новой волны пандемии после снятия ограничительных мер.

Гораздо более эффективным средством борьбы с пандемией является формирование коллективного иммунитета, препятствующего дальнейшему распространению заболевания. Последний формируется двумя путями:

- естественное распространение заболевания с последующим появлением невосприимчивого к повторному инфицированию контингента;
- массовая иммунизация населения.

Цель работы — сравнительная характеристика платформ для создания вакцин (аттенуированных, инактивированных, субъединичных, векторных рекомбинантных вакцин, ДНК- и РНК-вакцин), предназначенных для проведения массовой иммунизации против опасных и особо опасных вирусных инфекций, обладающих пандемическим потенциалом.

Существующие платформы для создания вакцин

В зависимости от уровня существующего в популяции коллективного иммунитета при возникновении новой инфекции возможны два основных варианта развития ситуации:

- человечество сталкивается с принципиально новым заболеванием, к которому чувствительна большая часть населения, то есть коллективный иммунитет в момент начала распространения заболевания полностью отсутствует;
- в популяции существует в той или иной мере выраженный перекрестный иммунитет, обусловленный предшествующим распространением возбудителей, относящихся к той же таксономической группе, что и агент новой инфекции.

Даже вакцинация определенной доли популяции будет способствовать предотвращению трансмиссии возбудителя [4]. Вакцинацию на первых этапах необходимо проводить в ограниченных по численности группах риска (медицинские работники, а также лица, непосредственно контактирующие с больными)². Однако фактором, который будет играть решающую роль в противодействии пандемии, является формирование коллективного иммунитета посредством массовой иммунизации населения.

В настоящее время разработаны основные элементы стратегии получения вакцинных препаратов против новых

¹ <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>

² <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/recommendations-process.html>

Таблица 1. Достоинства и недостатки существующих платформ для создания вакцин
Table 1. Advantages and disadvantages of existing vaccine platforms

Платформа Platform	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages
Живые аттенуированные вакцины Live attenuated vaccines	Формирование наиболее полноценного иммунного ответа Induction of the most robust immune response	Остаточная вирулентность аттенуированного штамма, длительный период разработки Residual virulence of attenuated strains, long development period
Инактивированные вакцины Inactivated vaccines	Безопасность. Формирование иммунного ответа ко всем структурным белкам возбудителя Safety. Induction of an immune response to all structural proteins of the pathogen	Необходимость проведения повторной иммунизации. Возможны проблемы с получением необходимой биомассы вируса The need for re-immunisation. Potential problems with obtaining the required virus biomass
Субъединичные белковые вакцины Subunit protein vaccines	Безопасность. Возможность масштабирования производства Safety. Production scalability	Наработка рекомбинантных вирусных антигенов посредством трансфекции генно-инженерных конструкций (эффективна только в клетках эукариот) Production of recombinant viral antigens by transfection of genetically engineered constructions is effective only in eukaryotic cells
Субъединичные пептидные вакцины Subunit peptide vaccines		Низкая защитная эффективность Low protective efficacy
Векторные рекомбинантные вакцины Recombinant vector vaccines	Возможность наработки необходимых объемов биомассы Possibility of obtaining the required biomass volumes	Наличие предсуществующего иммунитета к вектору снижает эффективность вакцинации. Достаточно высокая реактогенность Pre-existing immunity to the vector reduces vaccination effectiveness. Relatively high reactogenicity
ДНК-вакцины DNA vaccines	Безопасность. Отсутствие предсуществующего иммунитета к генно-инженерной конструкции, используемой при иммунизации Safety. No pre-existing immunity to the genetically engineered construction used for immunisation	Недостаточная иммуногенность. Сложность технологии производства. Необходимость применения специальных устройств доставки при проведении иммунизации. Необходимость соблюдения холодовой цепи на этапах производства и применения Insufficient immunogenicity. Complex production technology. The need for special administration devices. The need to comply with cold chain requirements during production and use
РНК-вакцины RNA vaccines		Сложность технологии производства. Необходимость соблюдения холодовой цепи на этапах производства и применения Complex production technology. The need to comply with cold chain requirements during production and use

инфекционных заболеваний, в отношении которых отсутствовали утвержденные медицинские средства защиты [5].

Имеющиеся сейчас технологические платформы предназначены для производства определенных классов вакцин: аттенуированных вакцин, инактивированных вакцин, вакцин на основе вирусоподобных частиц, субъединичных (белковых и пептидных) вакцин, ДНК- и РНК-вакцин, векторных рекомбинантных вакцин, в которых в качестве вектора используют какой-либо апатогенный либо аттенуированный для человека вирусный агент (вирус везикулярного стоматита, аденовирусы, вирус вакцины, лентивирусы).

Основные достоинства и недостатки рассмотренных платформ представлены в таблице 1.

Прежде чем проводить сравнение указанных платформ и обосновывать возможность их применения при возникновении пандемии нового инфекционного заболевания, необходимо рассмотреть природу возможных кандидатов в агенты пандемии. Опыт развития пандемии COVID-19, а также предшествующих пандемий вирусных инфекционных заболеваний, практически полное исчезновение коллективного иммунитета в отношении натуральной оспы [6] позволяет нам высказать предположение, что агентами новых инфекционных заболеваний с пандемическим потенциалом могут быть представители следующих семейств вирусов: *Poxviridae* (вирус натуральной оспы либо новые высокопатогенные для человека ортопоксвирусы), *Coronaviridae* (новый вариант вируса SARS-CoV-2 или новый патогенный для человека SARS-CoV-2-подобный

вирус) и *Orthomyxoviridae* (вирус гриппа птиц, способный к трансмиссии в человеческой популяции). Для индивидуального агента эмерджентной инфекции выбор оптимальной платформы для разработки вакцин против вызываемого им заболевания может определяться его таксономической принадлежностью.

При рассмотрении эффективности различных платформ для разработки вакцин, используемых для специфической профилактики заболевания и направленных на предотвращение его распространения, следует указать, что вакцина, помимо высокой защитной эффективности (как атрибута вакцинных препаратов), в идеале должна обладать перекрестной реактивностью по отношению к различным генетическим линиям возбудителя, вызывать протективный иммунный ответ даже при однократном введении, быть безопасной³.

Следовательно, приоритетами при создании вакцин являются их безопасность и эффективность, а также возможность производства большого количества (для проведения глобальной вакцинации), измеряемого в миллиардах доз [7, 8]. Необходимо учитывать и такие ее характеристики, как технологичность производства, возможность наработки необходимой для проведения массовой иммунизации биомассы препарата, транспортабельность вакцины, подразумевающую ее доступность для удаленных регионов, а также логистические соображения. Себестоимость производства вакцины не должна быть ограничивающим фактором для проведения массовой иммунизации населения.

³ <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/340301/WHO-2019-nCoV-vaccine-effectiveness-measurement-2021.1-rus.pdf>

При характеристике каждой из указанных платформ для производства вакцин далее рассмотрены основные их особенности: принцип построения; возможность производства вакцинных препаратов для обеспечения необходимого объема массовой вакцинации; показатели эффективности и безопасности вакцин; долгосрочные перспективы применения платформы.

Живые аттенуированные вакцины

Главным преимуществом аттенуированных вакцин перед другими платформами являются: наиболее полноценный иммунный ответ и связанная с ним высокая защитная эффективность; технологичность производства (наработка необходимой биомассы вакцины не вызывает особых проблем) [9].

Именно с помощью аттенуированных вакцин в 50-х гг. прошлого века проведена успешная борьба с пандемией полиомиелита [10], а в конце 70-х гг. прошлого века ликвидирована натуральная оспа [11].

Для создания аттенуированного штамма, используемого при конструировании вакцины, можно использовать:

- гетерологичный (родственный по отношению к агенту инфекционного заболевания) возбудитель, например вирус вакцины для проведения иммунизации против натуральной оспы;
- искусственно полученный аттенуированный вариант, при этом аттенуация может быть проведена как вирусологическими (например, проведение клонирования в непермиссивных условиях с периодическим контролем изменения уровня аттенуации по мере увеличения числа пассажей), так и молекулярно-генетическими методами (например, с помощью получения делеционных мутантов).

Для данной группы вакцин существуют проблемы так называемой остаточной вирулентности и (или) возможности реверсии к вирусу дикого типа, поэтому их введение в практическую медицину представляет весьма длительный процесс. Это стало одной из причин того, что при возникновении в 2020 г. пандемии COVID-19 вопрос о конструировании аттенуированных вакцин для создания коллективного иммунитета рассматривался больше гипотетически.

Сам процесс получения аттенуированного варианта требует существенных временных затрат. Процесс проведения серийных пассажей в непермиссивных условиях (например, в монослойной культуре клеток как наиболее распространенной системе накопления для возбудителей вирусных инфекционных заболеваний) при большом количестве пассажей (300–500) при продолжительности пассажа 5 суток (без учета временных затрат на периодический контроль изменения уровня аттенуации по мере увеличения числа пассажей) занимает свыше 5 лет.

Использование методов молекулярной генетики с целью направленного получения вариантов с заданными свойствами позволяет существенно сократить указанный срок.

После расшифровки генома вируса SARS-CoV-2 и изучения его молекулярно-биологических характеристик можно подобрать несколько вариантов дизайна аттенуированного варианта данного возбудителя, который может в дальнейшем изучаться как кандидатная вакцина против COVID-19. Возможны следующие варианты дизайна аттенуированного варианта:

- делеция в гене S-белка последовательности, кодирующей сайт расщепления фурина (участок между субъединицами S1 и S2), отсутствующий у других коронавирусов, относящихся к тому же кладу [12, 13];
- делеция в гене S-белка кодона, кодирующего глицин в положении 493 и (или) аспарагин в положении 501 (участок рецептор-связывающего сайта вируса SARS-CoV) [14, 15];

- частичное или даже полное делетирование гена белка Е. Данный полипептид, входящий в состав мембраны коронавируса, принимает участие в различных стадиях цикла репродукции вируса (сборка, отпочковывание, формирование оболочки), влияет на патогенность возбудителя [16]. Установлено, что отсутствие или инактивация белка Е приводит к изменению морфологии и тропизма вируса SARS-CoV [17]. При отсутствии белка Е накопление коронавирусов происходит на низком уровне, вирусное потомство не является жизнеспособным, поэтому данный белок рекомендуется использовать в качестве мишени для противовирусных препаратов [18];

- делеции в участках генома, кодирующих неструктурные белки коронавируса — главную протеазу (M^{pro}), пепсин-подобную протеазу (PL^{pro}), РНК-полимеразу (RdRp) и геликазу [19–21].

Существующий опыт проведения молекулярно-генетических исследований за рубежом позволяет предположить, что использование методов обратной генетики делает реальной возможность получения аттенуированных вариантов вируса SARS-CoV-2 [22]. Проблема, однако, заключается в том, что скорость получения варианта с помощью указанных методов лишь несущественно сокращает временные затраты, необходимые для доказательства устранения остаточной вирулентности, невозможности реверсии к вирусу дикого типа и изучения аттенуированного варианта в качестве основы для создания кандидатной вакцины. Время, необходимое для разработки аттенуированной вакцины, обычно превышает 10 лет, что может резко снизить ценность препаратов данного класса при борьбе с пандемиями.

Указанное справедливо и для того случая, если возбудитель новой вирусной инфекции, способной перерасти в пандемию, будет принадлежать к семейству *Orthomyxoviridae*. Однако если этот инфекционный агент будет принадлежать к семейству *Poxviridae*, альтернативы аттенуированным вакцинам нового поколения, пригодным для первичной вакцинации взрослых как средству профилактики распространения заболевания, особенно в условиях возникновения чрезвычайной ситуации биологического характера, когда для формирования коллективного иммунитета необходимо проведение вакцинации в сжатые сроки [9], в настоящее время не существует.

Следовательно, возможность успешной реализации данной платформы при возникновении пандемии новой инфекции, а также долгосрочные перспективы указанной платформы будет определять главным образом таксономическая принадлежность агента заболевания.

Инактивированные вакцины

Основой вакцин данного класса является инактивированный вирион, к структурным белкам которого формируется иммунный ответ при парентеральном введении вакцины. Инактивированные вакцины более безопасны по сравнению с аттенуированными вакцинами, но менее иммуногены, поскольку в процессе вакцинации в макроорганизме не происходит трансляции вирусных антигенов. Несомненным достоинством данной платформы является то, что цельновирионная инактивированная вакцина формирует иммунный ответ на все вирусные белки, что сопоставимо с гуморальным иммунным ответом при заболевании.

Безопасность инактивированных вакцин является одним из факторов, делающих возможной ускоренную организацию I и II фаз клинических исследований, ввиду наличия инактивированных вакцин против других заболеваний, созданных при использовании тех же технологических платформ.

Инактивированная вакцина CoronaVac (Sinovac, Китай) стала первой вакциной против COVID-19, для которой были получены результаты клинических исследований I и II фаз. Защитная эффективность инактивированных вакцин достаточно высока. Так, эффективность инактивированной вакцины BBIBP-CoV (Sinopharm, Китай) против COVID-19 по данным III фазы клинических исследований находится в пределах 51–65% [23]. Побочные эффекты после иммунизации данной вакциной не выявлены⁴.

Накопленный в настоящее время опыт использования инактивированных вакцин свидетельствует о том, что они, безусловно, будут иметь приоритетное положение в случае возникновения новой вирусной инфекции, если возбудитель относится к семейству *Orthomyxoviridae*. В этом случае опыт создания и применения противогриппозных вакцин к различным антигенным подтипам вируса гриппа А может быть успешно использован для разработки вакцин против нового гипотетического агента (наиболее вероятный кандидат — адаптированный для человека вирус гриппа птиц).

Одной из проблем для данной вакцинной платформы является возможность наработки инактивированной вакцины в количествах, необходимых для проведения массовой иммунизации. Так, при разработке инактивированных вакцин против COVID-19 был отмечен относительно низкий уровень накопления вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток, что препятствует наработке биомассы вируса, необходимой для производства больших объемов вакцины [24].

Приблизительный расчет показывает, что при необходимом для проведения курса иммунизации одного человека количестве вирусспецифического белка около 10 мкг (10^{-5} г), с учетом массы вириона коронавируса порядка 1 фг (10^{-15} г) для обеспечения указанной величины иммунизирующей дозы необходимо около 10^{10} вирионов. При наработке коронавируса в одобренной для получения вакцинных препаратов культуре клеток Vero B на уровне 1×10^8 вирионов в 1 см³ (без учета неизбежных потерь при инаktivации и концентрировании вируса) для проведения курса иммунизации одного человека требуется около 100 мл вируссодержащей суспензии. Следовательно, возможность наработки таких препаратов в количествах, измеряемых десятками и сотнями миллионов доз, является крайне проблематичной.

Таким образом, приоритетными платформами для создания вакцин при возникновении эмерджентной инфекции, вызванной ортомиксовирусами или ортопоксвирусами, являются платформы для производства инактивированных вакцин и живых аттенуированных вакцин соответственно.

Субъединичные вакцины, векторные рекомбинантные вакцины, ДНК- и РНК-вакцины

Вакцинные платформы нового поколения рассмотрены главным образом в отношении новых коронавирусных инфекций с пандемическим потенциалом, поскольку они уже нашли широкое применение при борьбе с пандемией COVID-19.

В данный перечень не включены вакцины на основе вирусоподобных частиц. Несмотря на то что представители данного класса вакцин периодически возникают в качестве кандидатных в отношении новых вирусных инфекций, сложность их конструирования создает определенные проблемы при быстрой наработке препарата в количествах, необходимых для проведения массовой иммунизации в случае возникновения пандемии.

Субъединичные вакцины, содержащие необходимые для стимуляции иммунного ответа вирусные белки и их

фрагменты, получают с помощью экспрессии генно-инженерных конструкций *in vitro*. Из вакцин, широко используемых при распространении COVID-19, к данному классу относится вакцина NVX-CoV2373 фармацевтической компании Novavax (США), содержащая полноразмерный S-белок вируса SARS-CoV-2 [25]. Иммунизация такого рода вакцинами является максимально «щадящей» для макроорганизма. Вакцина может применяться для всех возрастных групп, для лиц с аллергическими заболеваниями, а также для проведения реиммунизации. Важным достоинством таких вакцин является возможность их хранения в лиофильно-высушенном виде при температуре 2–8 °C [25]. Определенная проблема при применении данных препаратов заключается в возможности естественной эволюции возбудителя в процессе пандемии, вследствие чего они могут снизить свою эффективность в отношении мутировавшего возбудителя. Так, согласно имеющимся данным [26], эффективность вакцины NVX-CoV2373 (Novavax, США) против исходного штамма вируса SARS-CoV-2 составляет 95,6%, против штамма B.1.1.7 (выявленный в Великобритании штамм вируса) — 85,6%, против южноафриканского штамма возбудителя COVID-19 — только 60%.

Необходимо иметь в виду, что субъединичные белковые вакцины высокого уровня качества могут быть получены только при использовании структурных белков вируса, наработанных в эукариотических клетках. Так, например, мономер S-белка вируса SARS-CoV-2 имеет 22 сайта гликозилирования (процесс, который не проходит в клетках прокариот) [27], что создает дополнительные сложности при создании генно-инженерной конструкции, экспрессирующей рекомбинантный вирусный антиген.

Векторные рекомбинантные вакцины, как правило, состоят из безопасного для человека вируса (в качестве вектора), в геном которого встроены ген целевого белка (S-белок для вируса SARS-CoV-2). При проникновении вектора в клетки запускается процесс экспрессии целевого белка [28, 29]. Из вакцин данной группы, используемых при борьбе с пандемией COVID-19, наиболее известными являются вакцины Ad26.COV2.S (Johnson&Johnson, США, Нидерланды), ChAdOx1-S (AZD1222) (AstraZeneca, Великобритания, Швеция) и разработанная в России вакцина Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия).

Векторами могут служить разные вирусы (чаще всего аденовирусы, вирус ветряночного стоматита, ортопоксвирусы, ретровирусы). Одним из возможных препятствий для применения векторных рекомбинантных вакцин является наличие предсуществующего иммунитета к конструкции, используемой в качестве вектора. Для уменьшения влияния этого фактора возможно использование двух различных вирусных векторов [30]. Кроме того, возможно использование в роли вектора вирусов, которые либо вообще не циркулируют среди людей (например, аденовирус шимпанзе), либо крайне редки. Так, отличительной особенностью вакцины AZD1222 от вакцин Спутник V и Ad26.COV2.S является использование в качестве вектора аденовируса шимпанзе, а не человека. Предполагалось, что это должно снизить риски как возникновения нежелательных иммунных реакций, так и снижения эффективности иммунизации вследствие наличия у вакцинированного предсуществующего иммунитета к вектору, сформировавшемуся вследствие ранее перенесенной аденовирусной инфекции [29].

Безопасность аденовирусных векторов для создания вакцин на их основе достаточно хорошо изучена в клинической практике [31–33].

⁴ <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341534>

Аденовирусный вектор индуцирует как гуморальный, так и клеточный иммунитет, причем после однократной иммунизации. Проведение двух иммунизаций обеспечивает формирование долговременного иммунитета. Двухвекторный подход позволяет эффективнее стимулировать оба вида иммунитета (клеточный и гуморальный) и примерно на порядок увеличивает силу иммунного ответа по сравнению с использованием одного вектора. Наличие предсуществующего иммунитета к аденовирусу определенного типа может быть устранено за счет использования в вакцине гетерологичных аденовирусных векторов, например аденовирусов человека 26 и 5 типов (подход реализован в вакцине Гам-КОВИД-Вак) [34].

В настоящее время имеется положительный опыт использования аденовирусного вектора как платформы для создания векторных рекомбинантных вакцин. Так, вакцина Гам-КОВИД-Вак разработана на технологической платформе, которую ранее использовали для создания вакцин против лихорадки Эбола, ближневосточного респираторного синдрома (MERS), лихорадки Ласса [35, 36]. Вакцина Ad26.COVS.2 создана на основе уже ранее разработанной технологической платформы для конструирования вакцин против лихорадки Эбола, ВИЧ-инфекции и лихорадки Зика. При этом рекомбинантный аденовирус человека 26 типа, содержащий фрагмент гетерологичной ДНК, кодирующей синтез белков, аналогичных белкам оболочки вируса SARS-CoV-2, модифицирован таким образом, что при вакцинации в организме человека не происходит его репродукции.

Использование аденовирусного вектора в силу высокого уровня накопления аденовирусов в культурах клеток и возможности использования интенсивных способов накопления их биомассы сможет в сжатые сроки обеспечить наработку необходимого количества доз вакцины для массовой иммунизации.

Эффективность векторных рекомбинантных вакцин на основе аденовирусов достаточно высока. Так, защитная эффективность вакцины Гам-КОВИД-Вак в клинических исследованиях фазы III составила 91,6% [37], вакцины Ad26.COVS.2 (при однократном введении препарата) составила в разных регионах от 57 до 72%, средняя эффективность вакцины AZD1222 определена равной 70% [38].

При анализе векторных рекомбинантных вакцин в целом как средства борьбы с распространением новых вирусных заболеваний с пандемическим потенциалом необходимо отметить, что помимо достаточно высокой реактогенности, их вероятным недостатком будет являться наличие (или формирование) иммунитета к вектору, что уже достаточно давно рассматривалось как возможная причина снижения эффективности проведения повторных иммунизаций [9]. Успешному применению векторных рекомбинантных вакцин против COVID-19 на основе аденовирусных векторов способствовала не только предсуществующая разработка платформы, но и отсутствие ее использования в широком масштабе. При гипотетическом появлении (особенно в ближайшее время) новой коронавирусной инфекции с пандемическим потенциалом эффективность данной платформы может оказаться сниженной, что уменьшает долгосрочный потенциал применения защитных препаратов, созданных на платформе векторных вакцин [30–32]. Этот недостаток отсутствует у вакцин на основе нуклеиновой кислоты (ДНК- и РНК-вакцин). Для них может быть реализована максимально короткая схема экспрессии антигена для последующей индукции иммунного ответа в макроорганизме: ДНК→РНК→специфический белок (для ДНК-вакцин) или РНК→специфический белок (для РНК-вакцин).

Необходимо подчеркнуть следующие дополнительные достоинства РНК-вакцин:

- расщепление рибонуклеазами препятствует накоплению мРНК в макроорганизме;

- при уже имеющейся биотехнологической базе производства РНК-вакцин можно наладить в сжатые сроки. Так, дизайн вакцины mRNA-1273 (Moderna, США) был разработан всего через 48 ч после появления расшифровки генома SARS-CoV-2, а для производства первой партии вакцины понадобилось менее полутора месяцев [39].

Защитная эффективность вакцин Pfizer/BioNTech и Moderna по результатам III фазы клинических исследований превысила 94% [40].

Вероятно, что в ближайшие десятилетия ДНК- или РНК-вакцины могут стать приоритетными вакцинными платформами для создания защитных препаратов против опасных и особо опасных вирусных инфекций независимо от таксономической принадлежности их возбудителей.

Возможным недостатком ДНК-вакцин является теоретически возможная (хотя и с очень небольшой вероятностью)стройка гетерологичной ДНК в геном хозяина [38]. Другим недостатком ДНК-вакцин является недостаточная эффективность трансфекции [41]. Для РНК-вакцин подобных опасностей нет, и возможно, именно поэтому они получили приоритетное значение при разработке вакцин против COVID-19. Определенным недостатком ДНК-вакцин является то, что они *a priori* являются менее иммуногенными по сравнению с аттенуированными вакцинами. Для РНК-вакцин Pfizer/BioNTech и Moderna доказана существенно большая иммуногенность по сравнению с инактивированными цельновирионными вакцинами и продолжительный иммунитет после вакцинации [39]. Согласно данным производителя РНК-вакцины Pfizer/BioNTech, вакцина обеспечивает иммунитет на четыре-пять месяцев, после чего может возникнуть необходимость проведения повторной вакцинации [39], вероятность получения положительного эффекта от которой достаточно высока ввиду отсутствия иммунитета к генно-инженерной конструкции, используемой при иммунизации. При появлении в ходе естественной эволюции новых генетических вариантов вируса, обладающих комплексом новых свойств, состав конструкции может быть скорректирован на основании данных секвенирования генома вновь выделенных вариантов.

Важной проблемой является относительно низкая стабильность РНК-вакцин, что приводит к серьезным логистическим проблемам при их практическом использовании в ходе массовой иммунизации [39, 41].

Однако следует указать, что упомянутые выше недостатки являются следствием недостаточной полноты изученности свойств ДНК- и РНК-вакцин и оптимальной схемы их применения. К середине XXI в. данные платформы, вероятно, могут занять лидирующее положение, причем по отношению ко всем возбудителям опасных и особо опасных инфекций, независимо от их таксономической принадлежности.

Перспективы использования вакцинных платформ для проведения специфической профилактики вирусных инфекционных заболеваний с пандемическим потенциалом

Наиболее вероятными инфекционными агентами будущих пандемий могут быть представители семейств *Poxviridae*, *Orthomyxoviridae* и *Coronaviridae*. Представители указанных семейств уже вызывали пандемии, которые наносили колоссальный ущерб всем сферам деятельности человечества. Факторы, способствующие возможности возникновения новых пандемий, вызванных данными возбудителями, а также выбор наиболее перспективных вакцинных платформ для проведения специфической профилактики представлены в таблице 2.

Таблица 2. Обоснование выбора перспективных платформ для создания вакцин, предназначенных для проведения специфической профилактики эмерджентных инфекционных заболеваний с пандемическим потенциалом
Table 2. Rationale for choosing of promising platforms for the development of vaccines for specific prophylaxis of emergent diseases with pandemic potential

Сравниваемые показатели Parameters	Таксономическая принадлежность агента эмерджентного заболевания с пандемическим потенциалом Taxonomic affiliation of an emergent disease agent with pandemic potential		
	Семейство <i>Poxviridae</i> <i>Poxviridae</i> family	Семейство <i>Orthomyxoviridae</i> <i>Orthomyxoviridae</i> family	Семейство <i>Coronaviridae</i> <i>Coronaviridae</i> family
Факторы, способствующие появлению эмерджентных заболеваний с пандемическим потенциалом Factors contributing to emergent infections with pandemic potential	Трансмиссия в человеческую популяцию патогенных для человека реликтовых поксвирусов вследствие освоения арктических регионов в условиях снижения популяционного иммунитета Transmission of long-dormant human pathogenic poxviruses due to the development of the Arctic regions, combined with weakened herd immunity	Появление высокопатогенного для человека вируса гриппа птиц, способного к трансмиссии от человека к человеку The emergence of the avian influenza virus, highly pathogenic for humans and capable of human-to-human transmission	Спонтанное появление нового высокопатогенного для человека коронавируса (по типу возбудителя COVID-19) из зоонозного потенциала A spontaneous emergence of a new, highly pathogenic coronavirus (COVID-19) from a zoonotic source
Возможная эффективность перекрестной защиты, создаваемой существующими на момент начала эпидемии вакцинными препаратами в соответствии с таксономической принадлежностью инфекционного агента Potential efficacy of cross protection created by the existing vaccines at the time of the epidemic outbreak, with due regard to the taxonomic group of the infectious agent	Вероятно высокая Likely to be high	Неопределенная Not known	Вероятно будет отсутствовать Likely to be absent
Существующие в настоящее время платформы для создания вакцин Available vaccine platforms	Наличие аттенуированных штаммов вируса вакцины Availability of attenuated vaccine strains	Инактивированная вакцина Inactivated vaccine	РНК-вакцина. Векторная рекомбинантная вакцина. Инактивированная вакцина. Субъединичная вакцина RNA vaccine. Recombinant vector vaccine. Inactivated vaccine. Subunit vaccine
Основные проблемы, возникающие при эксплуатации разработанных платформ The main problems arising with the available platforms	Остаточная вирулентность Residual virulence	Недостаточные иммуногенные и протективные свойства Insufficient immunogenic and protective properties	Производственные и логистические проблемы, для векторных рекомбинантных вакцин — возможность предсуществующего иммунитета к вектору Production and logistics problems, and in the case of recombinant vector vaccines—potential pre-existing immunity to the vector
Наиболее перспективная платформа в настоящее время The most promising available vaccine platform	Аттенуированная вакцина Attenuated vaccine	Инактивированная вакцина Inactivated vaccine	Векторная рекомбинантная вакцина и РНК-вакцина Recombinant vector vaccine and RNA vaccine
Прогноз по наиболее перспективной платформе к 2050 г. The most promising vaccine platform in the next few decades (by 2050)	ДНК-вакцина DNA vaccine	РНК-вакцина RNA vaccine	

Заключение

Карантинные мероприятия, проводимые при возникновении пандемии нового инфекционного заболевания, являются необходимым, но недостаточным средством, ограничивающим распространение заболевания. Положительный эффект от этих мероприятий, как правило, снижается по мере их

снятия или даже ослабления. Для успешной борьбы с пандемией необходимо проведение массовой вакцинации против соответствующей нозологической формы инфекционного заболевания, направленной на активное формирование коллективного иммунитета, в основе которого лежит не прямая защита человеческого коллектива в целом, при иммунизации

определенной его части. Обоснованный выбор платформы для разработки вакцины является важным звеном решения данной задачи.

Проведенный анализ данных научной литературы позволяет сделать вывод, что наиболее эффективная платформа для разработки вакцин в отношении опасных инфекций определяется таксономической принадлежностью возбудителя: для представителей семейства *Poxviridae* — аттенуированные вакцины, для представителей семейства *Orthomyxoviridae* — инактивированные вакцины, для представителей семейства *Coronaviridae* — векторные рекомбинантные и РНК-вакцины. Это связано с существующим в настоящее время уровнем разработок по созданию вакцин в отношении вызываемых данными возбудителями инфекционных заболеваний.

Предполагается, что в ближайшие десятилетия приоритетными вакцинными платформами для создания защитных препаратов против опасных и особо опасных вирусных инфекций с пандемическим потенциалом, независимо от таксономической принадлежности их возбудителей, станут ДНК- или РНК-вакцины.

Вклад авторов. Г. Г. Онищенко — обоснование концепции проводимых исследований; Т. Е. Сизикова — анализ и обобщение данных литературы по созданию вакцин против COVID-19, обобщение опубликованных данных клинических исследований, написание текста рукописи; В. Н. Лебедев — анализ существующих технологических платформ для создания вакцин против COVID-19; С. В. Борисевич — разработка дизайна исследования, анализ и обобщение данных литературы по COVID-19, редактирование и переработка текста рукописи.

Authors' contributions. Gennadiy G. Onishchenko—substantiation of the study concept; Tatyana E. Sizikova—analysis and summarising of literature data on COVID-19 vaccine development, summarising of published data on clinical trials; writing of the text; Vitaliy N. Lebedev—analysis of the existing technological platforms for COVID-19 vaccine development; Sergey V. Borisevich—elaboration of the study design, analysis and summarising of literature data on COVID-19, editing and revision of the paper.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. С. В. Борисевич является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Sergey V. Borisevich is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Львов ДК, Альховский СВ, Колобухина ЛВ, Бурцева ЕИ. Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика), ассоциированной с вирусом 2019-nCoV (*Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus*, подрод *Sarbecoronavirus*): уроки эпидемии SARS-CoV. *Вопросы вирусологии*. 2020;65(1):6–15. [Lvov DK, Alkhovsky SV, Kolobukhina LV, Burtseva EI. Etiology of epidemic outbreaks COVID-19 in Wuhan, Hubei province, Chinese People Republic associated with 2019-nCoV (*Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus*, Subgenus *Sarbecovirus*): lessons of SARS-CoV outbreak. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2020;65(1):6–15 (In Russ.)] <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15>
2. Taubenberger JK, Kash JC, Morens DM. The 1918 influenza pandemic: 100 years of questions answered and unanswered. *Sci Transl Med*. 2019;11(502):eaau5485. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau5485>
3. Ижуткин ВС, Семин ПН. Программная реализация математических моделей распространения эпидемий. *Международный журнал экспериментального образования*. 2015;(2-1):32–3. [Izhutkin VS, Semin PN. Software implementation of mathematical models of the spread of epidemics. *Mezhdunarodnyi zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya = International Journal of Experimental Education*. 2015;(2-1):32–3 (In Russ.)]
4. Holme P, Masuda N. The basic reproductive number as a predictor for epidemic outbreaks in temporal networks. *PloS One*. 2015;10(3):e0120567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120567>
5. Gouglas D, Christodoulou M, Plotkin SA, Hatchett R. CEPI: Driving progress toward epidemic preparedness and response. *Epidemiol Rev*. 2019;41(1):28–33. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxz012>
6. Щелкунов СН, Щелкунова ГА. Нужно быть готовыми к возврату оспы. *Вопросы вирусологии*. 2019;64(5):206–14. [Shchekunov SN, Shchekunova GA. We should be prepared to smallpox re-emergence. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, Russian journal*. 2019;64(5):206–14 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-206-214>
7. Iwasaki A, Omer SB. Why and how vaccines work. *Cell*. 2020;183(2):290–5. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.040>
8. Calina D, Docea AO, Petrakis D, Egorov AM, Ishmukhametov AA, Gabibov AG, et al. Towards effective COVID-19 vaccines: updates, perspectives and challenges (review). *Int J Mol Med*. 2020;46:3–16. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4596>
9. Ройт А, Бростофф Дж, Мейл Д. *Иммунология*. Пер с англ. М.: Мир; 2000. [Roit A, Brostoff J, Mail D. *Immunology*. Moscow: Mir; 2000 (In Russ.)]
10. Лашкевич ВА. История создания в 1959 г. живой вакцины из аттенуированных штаммов А. Сэбина и идея искоренения полиомиелита. *Вопросы вирусологии*. 2013;58(1):4–10. [Lashkevich VA. History of development of the live poliomyelitis vaccine from Sabin attenuated strains in 1959 and idea of poliomyelitis eradication. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2013;58(1):4–10 (In Russ.)]
11. Behbehani AM. The smallpox story: life and death of an old disease. *Microbiol Rev*. 1983;47(4):455–509. <https://doi.org/10.1128/mr.47.4.455-509.1983>
12. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020;11:1620. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>
13. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res*. 2020;176:104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>
14. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J Virol*. 2020;94(7):e00127–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>
15. Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(6):613–20. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0400-4>
16. Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2006;66:193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
17. Khattari Z, Brotons G, Akkawi M, Arbely E, Arkin IT, Salditt T. SARS coronavirus E protein in phospholipid bilayers: an X-ray study. *Biophys J*. 2006;90(6):2038–50. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.072892>
18. Kuo L, Hurst KR, Masters PS. Exceptional flexibility in the sequence requirements for coronavirus small envelope

- lope protein function. *J Virol.* 2007;81(5):2249–62. <https://doi.org/10.1128/JVI.01577-06>
19. Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(17):9241–3. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004999117>
20. Siu YL, Teoh KT, Lo J, Chan CM, Kien F, Escriu N, et al. The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *J Virol.* 2008;82(22):11318–30. <https://doi.org/10.1128/JVI.01052-08>
21. Fan K, Wei P, Feng Q, Chen S, Huang C, Ma L, et al. Biosynthesis, purification, and substrate specificity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like proteinase. *J Biol Chem.* 2004;279(3):1637–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310875200>
22. Calisher C, Carroll D, Colwell R, Corley RB, Daszak P, Drosten C, et al. Statement in support of the scientists, public health professionals, and medical professionals of China combating COVID-19. *Lancet.* 2020;395(10226):e42–3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30418-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30418-9)
23. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* 2021;27(7):1205–11. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01377-8>
24. Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F, et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 vaccine. *N Engl J Med.* 2021;385:1172–83. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>
25. Callaway E, Mallapaty S. Novavax offers first evidence that COVID vaccines protect people against variants. *Nature.* 2021;590(7844):17. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-00268-9>
26. Pollet J, Chen WH, Strych U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;170:71–82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.001>
27. Kaur SP, Gupta V. COVID-19 vaccine: a comprehensive status report. *Virus Res.* 2020;288:198114. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198114>
28. Callaway E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. *Nature.* 2020;580: 576–7. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-01221-y>
29. Bull JJ, Nuismer SL, Antia R. Recombinant vector vaccine evolution. *PLoS Comput Biol.* 2019;15(7):e1006857. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006857>
30. Trigg CR, Bansal D, Ding H, Islam MM, Farag EABA, Hadi HA, Sultan AA. A comprehensive review of viral characteristics, transmission, pathophysiology, immune response, and management of SARS-CoV-2 and COVID-19 as a basis for controlling the pandemic. *Front Immunol.* 2021;12:631139. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631139>
31. Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med.* 2004;6(Suppl 1):S164–71. <https://doi.org/10.1002/jgm.496>
32. Tatsis N, Ertl HCJ. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther.* 2004;10(4):616–29. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.013>
33. Afkhami S, Yao Y, Xing Z. Methods and clinical development of adenovirus-vectored vaccines against mucosal pathogens. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:16030. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.30>
34. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
35. Должикова ИВ, Токарская ЕА, Джаруллаева АШ, Тухватулин АИ, Щебляков ДВ, Воронина ОЛ и др. Векторные вакцины против болезни, вызванной вирусом Эбола. *Acta Naturae.* 2017;9(3):4–12. [Dolzhikova IV, Tokarskaya EA, Dzharullaeva AS, Tukhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Voronina OL, et al. Virus-vectored Ebola vaccines. *Acta Naturae.* 2017;9(3):4–12 (In Russ.)]
36. Ковыршина АВ, Должикова ИВ, Гроусова ДМ, Баясин МВ, Ботиков АГ, Панина ЛВ и др. Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ. *Иммунология.* 2020;41(2):135–43. [Kovyrshina AV, Dolzhikova IV, Grousova DM, Balyasin MV, Botikov AG, Panina LV, et al. A heterologous virus-vectored vaccine for prevention of Middle East respiratory syndrome induces long protective immune response against MERS-CoV. *Immunologiya = Immunology.* 2020;41(2):135–43 (In Russ.)] <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143>
37. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet.* 2021;397(10275):671–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
38. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet.* 2021;397(10269):99–111. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1)
39. Thompson MG, Burgess JL, Naleway AL, Tyner HL, Yoon SK, Meece J, et al. Interim estimates of vaccine effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 vaccines in preventing SARS-CoV-2 infection among health care personnel, first responders, and other essential and frontline workers — eight U.S. Locations, December 2020–March 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2021;70(13):495–500. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7013e3>
40. Cui Z. DNA vaccine. *Adv Genet.* 2005;54:257–89. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)54011-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(05)54011-2)
41. Liu MA. A comparison of plasmid DNA and mRNA as vaccine technologies. *Vaccines.* 2019;7(2):37. <https://doi.org/10.3390/vaccines7020037>

Об авторах / Authors

Онищенко Геннадий Григорьевич, д-р мед. наук, проф., акад. РАН. *Gennadiy G. Onishchenko*, Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0135-7258>

Сизикова Татьяна Евгеньевна, канд. биол. наук. *Tatyana E. Sizikova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Лебедев Виталий Николаевич, д-р биол. наук, проф. *Vitaliy N. Lebedev*, Dr. Sci. (Biol.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

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

Поступила 08.07.2021

После доработки 18.10.2021

Принята к публикации 10.12.2021

Received 8 July 2021

Revised 18 October 2021

Accepted 10 December 2021

Обзор мирового опыта применения зарегистрированных вакцин и разработки новых вакцин для профилактики пневмококковой инфекции

М. В. Савкина^{1*}, М. А. Кривых¹, Н. А. Гаврилова¹, Л. В. Саяпина¹, Ю. И. Обухов¹, В. А. Меркулов^{1,2}, В. П. Бондарев¹

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 (Сеченовский Университет),
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

Инфекция, вызванная *Streptococcus pneumoniae*, является наиболее частой причиной высокой заболеваемости и смертности среди детей до 5 лет, людей с ослабленным иммунитетом и пожилых. Несмотря на значительный успех, одобренные пневмококковые конъюгированные и полисахаридные вакцины имеют ограниченную эффективность, обеспечивая защиту от небольшой части известных серотипов пневмококков. Быстрое распространение мультирезистентных штаммов усугубляет глобальную проблему лечения инфекционного заболевания, вызванного *S. pneumoniae*. При этом появление новых штаммов возбудителя диктует необходимость включения новых серотипов в состав вакцин. Ввиду этого дальнейшее совершенствование вакцин для профилактики пневмококковых инфекций является актуальной задачей. Цель работы — рассмотрение достижений в разработке пневмококковых вакцин (полисахаридных, конъюгированных, цельноклеточных), а также вакцин на основе белковых антигенов и вакцин, снабженных системой доставки антигена. В настоящее время на основе данных геномики и протеомики усовершенствованы подходы к созданию полисахаридных и белковых вакцин, а также созданию цельноклеточных вакцин, имеющих потенциал для профилактического охвата населения от различных серотипов пневмококков, не вошедших в состав зарегистрированных пневмококковых вакцин. Важное значение при разработке вакцин имеет способ доставки антигена в клетку. Наиболее перспективной стратегией усовершенствования пневмококковых вакцин является создание вакцин на основе бактериоподобных или синтетических частиц, несущих несколько антигенов, в том числе поверхностные белки пневмококка. В заключение необходимо отметить, что наиболее приоритетными пневмококковыми вакцинами являются те, которые обеспечивают широкий комплекс защиты в отношении спектра циркулирующих серотипов пневмококка и, помимо развития системного иммунного ответа, вызывают индукцию местного иммунитета.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*; конъюгированные вакцины; полисахаридные вакцины; цельноклеточные вакцины; пневмококковые вакцины на основе белковых антигенов; пневмококковые вакцины, снабженные системой доставки антигенов

Для цитирования: Савкина МВ, Кривых МА, Гаврилова НА, Саяпина ЛВ, Обухов ЮИ, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Обзор мирового опыта применения зарегистрированных вакцин и разработки новых вакцин для профилактики пневмококковой инфекции. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(4):234–243. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-234-243>

* Контактное лицо: Савкина Мария Владимировна; savkina@expmed.ru

Review of global use of licensed vaccines and development of new vaccines for the prevention of pneumococcal infection

M. V. Savkina^{1*}, M. A. Krivikh¹, N. A. Gavrilova¹, L. V. Sayapina¹, Yu. I. Obukhov¹, V. A. Merkulov^{1,2}, V. P. Bondarev¹

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 (Sechenov University),
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

Streptococcus pneumoniae infection is the most common cause of high morbidity and mortality among children under 5 years of age, immunocompromised people, and the elderly. Despite significant success, the approved pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines are of limited efficacy, providing protection against a small fraction of the known pneumococcal serotypes. The rapid spread of multidrug-resistant strains exacerbates the global challenge of treating infection caused by *S. pneumoniae*. At the same time, the emerging new strains dictate the need to include new serotypes into vaccines. In view of this, further improvement of vaccines for the prevention of pneumococcal infections is an urgent task. The aim of this study was to review advances in the development of polysaccharide, conjugate, whole-cell pneumococcal vaccines, as well as vaccines based on protein antigens and vaccines with an antigen delivery system. Genomics and proteomics data have helped to improve approaches to the creation of polysaccharide and protein-based vaccines, as well as whole-cell vaccines with the potential for population prophylactic coverage against various pneumococcal serotypes that are not included in the licensed pneumococcal vaccines. The method of antigen delivery to the cell is of great importance in the development of vaccines. The most promising strategy for improving pneumococcal vaccines

is the creation of vaccines based on bacterium-like or synthetic particles carrying several antigens, including pneumococcal surface proteins. In conclusion, it should be noted that top-priority vaccines are those that provide a wide range of protection against circulating pneumococcal serotypes and, in addition to eliciting a systemic immune response, also induce local immunity.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; conjugate vaccines; polysaccharide vaccines; whole-cell vaccines; protein-based pneumococcal vaccines; pneumococcal vaccines with an antigen delivery system

For citation: Savkina MV, Krivikh MA, Gavrilova NA, Sayapina LV, Obukhov Yul, Merkulov VA, Bondarev VP. Review of global use of licensed vaccines and development of new vaccines for the prevention of pneumococcal infection. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(4):234–243. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-234-243>

*Corresponding author: Maria V. Savkina; savkina@expmed.ru

Бактерии *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) являются одними из основных возбудителей синуситов и отитов, а также тяжелых и жизнеугрожающих инфекционных заболеваний (менингит, пневмония, сепсис). Пневмококковая инфекция главным образом передается воздушно-капельным путем. Существует более 93 серотипов пневмококков, из которых на долю 6–11 серотипов приходится более 70% всех пневмококковых заболеваний у детей¹. Особенно восприимчивы к пневмококковым инфекциям дети с хроническими заболеваниями (болезни сердца и легких, диабет или ВИЧ-инфекция)². Инфекционные болезни, вызванные *S. pneumoniae*, также являются одной из основных причин высокой смертности пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом [1, 2]. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), примерно 75% случаев инвазивной пневмококковой инфекции (ИПИ) и 83% пневмококкового менингита возникают у детей в возрасте до двух лет. При этом в странах с низким и средним уровнем дохода коэффициент летальности от сепсиса, вызванного *S. pneumoniae*, составляет до 20%, от менингита — до 50%³.

Некоторые серотипы *S. pneumoniae* способны колонизировать носоглотку и при способности к активной инвазии становятся преобладающими в инфекционном процессе. Ранее проведенные многочисленные исследования позволили определить факторы вирулентности *S. pneumoniae*, которые способствуют колонизации и развитию пневмококковой инфекции [3]. Полученные данные позволили подобрать антигены, на основе которых созданы современные вакцины [4, 5].

Для предотвращения заболеваний, вызываемых пневмококковой инфекцией, таких как менингит, пневмония и сепсис, ВОЗ рекомендует в национальные программы вакцинации включать пневмококковую конъюгированную вакцину (ПКВ)⁴.

Следует отметить, что, несмотря на значительный успех, зарегистрированные ПКВ и пневмококковые полисахаридные вакцины (ППВ) имеют ограниченную специфичность и обеспечивают защиту от небольшой части известных серотипов пневмококков. Быстрое распространение мультирезистентных штаммов, в свою очередь, усугубляют глобальную проблему лечения пневмококковых инфекций. На основании анализа данных, полученных в ходе проведения мониторинга после внедрения вакцин, показано, что в выделенных клинических изолятах обнаружены серотипы, отсутствующие в вакцинах,

что требует оптимизации состава вакцин (замещения или дополнения спектра серотипов) [4].

Цель работы — рассмотрение достижений в разработке пневмококковых вакцин (полисахаридных, конъюгированных, цельноклеточных), а также вакцин на основе белковых антигенов и вакцин, снабженных системой доставки антигена.

Преквалифицированные ВОЗ полисахаридные пневмококковые вакцины

В настоящее время доступны два типа пневмококковых вакцин: неконъюгированные вакцины на основе полисахаридов (23-валентная ППВ, ППВ23) и полисахаридные конъюгированные вакцины (10-валентная ПКВ, ПКВ10 и 13-валентная ПКВ, ПКВ13). В Российской Федерации данные вакцины зарегистрированы под торговыми наименованиями: Пневмовакс[®] 23, Синфлорикс и Превенар[®] 13 (табл. 1).

Вакцины (Синфлорикс и Превенар 13[®]) входят в перечень преквалифицированных ВОЗ вакцин⁵. В 2019 г. ВОЗ провела предварительную квалификацию еще двух форм выпуска 10-валентной ПКВ (Пневмосил[®]) Института сывороток Индии (SI). Таким образом, в настоящее время общее количество преквалифицированных ВОЗ вакцин достигло трех наименований (в семи формах выпуска) от трех производителей (табл. 1)⁶. Несмотря на то что Синфлорикс и Пневмосил[®] содержат полисахариды одинакового количества серотипов, они различаются по двум серотипам: в вакцине Синфлорикс содержатся полисахариды серотипов 4 и 18С, а в вакцине Пневмосил[®] — 6А и 19А.

Следует обратить внимание на то, что в августе 2019 г. 23-валентная ПКВ китайского производителя Beijing Minhai Biological Technology Co., Ltd., успешно прошла проверку Государственного управления по лекарственным средствам Китая и получила сертификат на выпуск⁷, а в декабре 2019 г. в Китае зарегистрирована 13-валентная ПКВ компании Walvax[®].

Факторы вирулентности *Streptococcus pneumoniae*

Одним из главных факторов вирулентности *S. pneumoniae* является цитолитический токсин пневмолизин (Ply), который функционирует как лиганд Toll-подобных

¹ Pneumococcal conjugate vaccine supply and demand update. UNICEF; 2020. <https://www.unicef.org/supply/media/4636/file/Pneumococcal-conjugate-vaccine-supply-update-July2020.pdf>

² Там же.

³ Pneumococcal conjugate vaccines in infants and children under 5 years of age: WHO position paper — February 2019. Wkly Epidemiol Rec. 2019;94(8):85–103. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/310970>

⁴ WHO Prequalified Vaccines. Geneva; 2020. https://extranet.who.int/pqweb/vaccines/prequalified-vaccines?field_vaccines_effective_date%5Bdate%5D=&field_vaccines_effective_date_1%5Bdate%5D=&field_vaccines_type%5B%5D=Pneumococcal+%28conjugate%29&field_vaccines_name=&search_api_views_fulltext=&field_vaccines_number_of_doses=

⁵ Там же.

⁶ Там же.

⁷ <http://en.biominhai.com/news/224.html>

⁸ Pneumococcal conjugate vaccine supply and demand update. UNICEF; 2020. <https://www.unicef.org/supply/media/4636/file/Pneumococcal-conjugate-vaccine-supply-update-July2020.pdf>

рецепторов, активирует систему комплемента и стимулирует выработку различных провоспалительных цитокинов [6]. Пневмококковый поверхностный белок А (PspA) ингибирует фиксацию компонента комплемента С3 на поверхности клеточной стенки бактерии и способствует накоплению бактерий при носительстве [7]. Аутолизин (LytA) расщепляет клеточную стенку бактерии, что приводит к высвобождению пневмолизина и других токсичных компонентов [8], а также подавляет образование С3 конвертазы [9]. Пневмококковый поверхностный антиген А (PsaA) связывает ионы металла (марганца), что способствует защите пневмококка от окислительного стресса [3]. PiaA, компонент ABC-транспортной

системы, участвует в доставке железа для роста бактерий [8]. Нейраминидаза (NanA)/сиалидаза расщепляет концевые остатки сиаловой кислоты на поверхности эпителиальных клеток, что способствует адгезии и колонизации *S. pneumoniae* [3], а также дегликозилирует компоненты системы комплемента хозяина [10].

Разрабатываемые новые полисахаридные пневмококковые вакцины

В настоящее время разрабатывается более десяти новых пневмококковых вакцин (табл. 2), находящихся на различных стадиях клинических исследований (КИ).

Таблица 1. Преквалифицированные ВОЗ пневмококковые вакцины
Table 1. WHO-prequalified pneumococcal vaccines

Дата преквалификации Prequalification date	Торговое наименование Trade name	Число доз Number of doses	Производитель Manufacturer
18.12.2019	Пневмосил® Pneumosil®	1	Институт сывороток Индии Serum Institute of India Pvt. Ltd.
18.12.2019	Пневмосил® Pneumosil®	5	
20.08.2010	Превенар 13® Prevenar 13®	1	Пфайзер Европа Pfizer Europe MA EEIG
14.07.2016	Превенар 13® (многодозовая форма выпуска) Prevenar 13® (multidose vial)	4	
30.10.2009	Синфлорикс Synflorix	1	ГлаксосмитКлайн GlaxoSmithKline Biologicals SA
19.03.2010	Синфлорикс Synflorix	2	
16.10.2017	Синфлорикс Synflorix	4	

Таблица 2. Разрабатываемые полисахаридные пневмококковые вакцины
Table 2. Polysaccharide pneumococcal vaccines currently under development

Препарат Product	Серотип Serotype	Стадия разработки Development stage	Производитель Manufacturer	Источник Reference
ПКВ13 PCV13	—	Завершена фаза 3 КИ Phase 3 trials completed	Пекин Минхай Beijing Minhai	Сноска ⁹ Footnote ⁹
ПКВ12/11 PCV12/11	—	Завершена фаза 2 КИ Phase 2 trials completed	ГлаксосмитКлайн GlaxoSmithKline	[11]
ПКВ12 PCV12	—	Завершена фаза 1 КИ Phase 1 trials completed		[11]
ПКВ24 PCV24	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20B, 22F, 33F	Завершена фаза 1 КИ Phase 1 trials completed	Аффинивакс Инк Affinivax Inc	[12]
Мультивалентная ПКВ Multivalent PCV	—	Завершена фаза 2 КИ Phase 2 trials completed	ЭлДжи Кемикалс LG Chemicals	Сноска ¹⁰ Footnote ¹⁰
ПКВ15 (V114) PCV15 (V114)	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 22F, 33F	Поданы заявки в FDA и EMA на лицензирование. Фаза 2 КИ в России (в процессе) Marketing authorisation applications submitted to the FDA and EMA. Ongoing Phase 3 trials in Russia	Мерк Merck Sharp & Dohme Corp	Сноска ¹¹ Footnote ¹¹
ПКВ24 PCV24	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20, 22F, 33F	Фаза 2 КИ (в процессе) Ongoing Phase 2 trials	Мерк Merck Sharp & Dohme Corp	[12] Сноска ¹² Footnote ¹²

⁹ Pneumococcal conjugate vaccine supply and demand update. UNICEF; 2020. <https://www.unicef.org/supply/media/4636/file/Pneumococcal-conjugate-vaccine-supply-update-July2020.pdf>

¹⁰ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03467984>

¹¹ <https://www.merck.com/news/merck-submits-applications-for-licensure-of-v114-the-companys-investigational-15-valent-pneumococcal-conjugate-vaccine-for-use-in-adults-to-the-u-s-fda-and-european-medicines-agency/>

¹² <https://www.merck.com/wp-content/uploads/sites/5/2020/08/Merck-Public-Pipeline.pdf>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Препарат Product	Серотип Serotype	Стадия разработки Development stage	Производитель Manufacturer	Источник Reference
ПКВ10 PCV10	—	Фаза 2 КИ (в процессе) Ongoing Phase 2 trials	Панацеабиотек PanaceaBiotech	Сноска ¹³ Footnote ¹³
ПКВ20 PCV20	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 8, 10A, 11A, 12F, 15B/C, 22F, 33F	Зарегистрирована в США Licensed in the USA	Пфайзер Pfizer	Сноска ¹⁴ Footnote ¹⁴
ППВ23 PPV23	—	Завершена фаза 3 КИ Phase 3 trials completed	СиновакБиотек SinovacBiotech	[13]
Мультивалент- ная ПКВ Multivalent PCV	—	Фаза 2 КИ (в процессе) Ongoing Phase 2 trials	СК Биосайенс SK Bioscience	Сноска ¹⁵ Footnote ¹⁵
ПКВ13 PCV13	—	Завершена фаза 3 КИ Phase 3 trials completed	ООО «Нанолек» Nanolek OOO	Сноска ¹⁶ Footnote ¹⁶
ПКВ13 (Пнев- моксил 13) PCV13 (Pneumoxil 13)	—	Завершена фаза 3 КИ Phase 3 trials completed	ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова I.I. Mechnikov Biomed OAO	Сноска ¹⁷ Footnote ¹⁷

Примечание. ПКВ — пневмококковая конъюгированная вакцина, ППВ — пневмококковая полисахаридная вакцина, ПКВ10, 12, 13, 15, 20, 24 — 10-, 12-, 13-, 15-, 20-, 24-валентная ПКВ, ППВ23 — 23-валентная полисахаридная вакцина, КИ — клинические исследования, «—» — нет данных.
Note. PCV—pneumococcal conjugate vaccine, PPV—pneumococcal polysaccharide vaccine, PCV10, 12, 13, 15, 20, 24—10-, 12-, 13-, 15-, 20-, 24-valent PCV, PPV23—23-valent polysaccharide vaccine, FDA—U.S. Food and Drug Administration, EMA—European Medicines Agency, — no data available.

В исследовании H.L. Stacey с соавт. [14] убедительно продемонстрировано, что препарат с более широкой валентностью ПКВ15 имеет профиль безопасности, сравнимый с профилем безопасности препарата ПКВ13. Препарат ПКВ15 (включает антигены серотипов вакцины ПКВ13 с добавлением антигенов серотипов 22F и 33F) индуцировал серотип-специфический иммунный ответ к антигенам всех 15 вакцинных серотипов, и данные иммунные ответы не уступали таковым от применения ПКВ13 для общих серотипов, измеряемых как по серотип-специфической опсонофагоцитарной активности (ОФА), так и по средним геометрическим титров антител (IgG).

Компания Пфайзер провела оценку эффективности и безопасности 20-валентной ПКВ (20vPnC). Вакцина 20vPnC включает антигены 13 серотипов препарата Превенар 13[®] и антигены семи дополнительных серотипов (8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F), которые также вызывают инвазивную пневмонию и менингит¹⁸. Семь новых серотипов часто характеризуются устойчивостью к антибиотикам, а вызванная ими инфекция — высокой летальностью¹⁹. КИ фазы 1 на здоровых взрослых добровольцах (18–49 лет) показали значительную функциональную ОФА и гуморальные ответы на антигены всех серотипов вакцины [15]. Завершены КИ фазы 3²⁰, проводившиеся на 6000 взрослых, включая популяции невакцинированных взрослых и взрослых, ранее получивших вакцину от пневмококковой инфекции. Продemonстрирована эквивалентность иммунных ответов (среднее геометрическое титров ОФА) для всех 20 серотипов вакцины, а также устойчивая и стойкая

иммуногенность. Выявлен приемлемый профиль безопасности и переносимости вакцины 20vPnC, сходный с ПКВ13 [16]. Компания Пфайзер 8 июня 2021 г. объявила, что Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) одобрило Prevnar 20[™] (пневмококковая 20-валентная конъюгированная вакцина) для профилактики инвазивных пневмококковых инфекций и пневмонии у взрослых в возрасте 18 лет и старше²¹.

Современные тенденции в разработке пневмококковых вакцин

Большое внимание ученых направлено на разработку цельноклеточных, полисахаридных и белковых пневмококковых вакцин.

В таблице 3 приведены находящиеся в разработке цельноклеточные пневмококковые вакцины и вакцины на основе белков *S. pneumoniae*.

Пневмококковые вакцины на основе белковых антигенов

Факторы вирулентности пневмококков, которые имеют консервативные последовательности и широко представлены во всех серотипах, являются предпочтительными кандидатами для разработки вакцин. К тому же вакцина на основе белковых антигенов дешевле в производстве, чем ПКВ. Несколько пневмококковых белков были изучены в качестве кандидатов в вакцины, например PspA, Ply, PsaA, PhtD и EF-Tu (табл. 3).

Разработанные пневмококковые вакцины на основе рекомбинантных авирулентных штаммов *Salmonella typhi*

¹³ Pneumococcal conjugate vaccine supply and demand update. UNICEF; 2020. <https://www.unicef.org/supply/media/4636/file/Pneumococcal-conjugate-vaccine-supply-update-July2020.pdf>

¹⁴ <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/us-fda-approves-prevnar-20tm-pfizers-pneumococcal-20-valent>

¹⁵ https://www.skbioscience.co.kr/en/tech/rnd_01

¹⁶ <http://grls.rosminzdrav.ru>

¹⁷ Там же.

¹⁸ <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/us-fda-approves-prevnar-20tm-pfizers-pneumococcal-20-valent>

¹⁹ Там же.

²⁰ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03828617>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03835975>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03760146>

²¹ <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/us-fda-approves-prevnar-20tm-pfizers-pneumococcal-20-valent>

Таблица 3. Цельноклеточные пневмококковые вакцины и вакцины на основе белков *S. pneumoniae*, находящиеся в разработке

Table 3. Whole-cell pneumococcal and protein-based *S. pneumoniae* vaccines under development

Тип вакцины Vaccine type	Стадия разработки Development stage	Источник Reference
Пневмококковые вакцины на основе белковых антигенов Protein-based pneumococcal vaccines		
Вакцины, содержащие белок PspA Vaccines containing PspA		
Рекомбинантные авирулентные векторные вакцины на основе штамма <i>Salmonella typhi</i> , экспрессирующего PspA Recombinant avirulent <i>Salmonella typhi</i> vector vaccines expressing PspA	Завершена фаза 1 КИ Phase 1 trials completed	Сноска ²² Footnote ²²
Вакцины, содержащие белки Ply, PhtD, PspA, PsaA и PiuA Vaccines containing Ply, PhtD, PspA, PsaA, and PiuA		
Комбинация белков Ply, PhtD и вакцины Синфлорикс Combination of Ply, PhtD proteins and Synflorix vaccine	Завершена фаза 1 и 2 КИ Phase 1 and 2 trials completed	Сноска ²³ Footnote ²³
Вакцина PnuBioVax, содержащая белки Ply, PspA, PsaA и PiuA PnuBioVax vaccine containing Ply, PspA, PsaA, and PiuA proteins	Завершена фаза 1 КИ Phase 1 trials completed	Сноска ²⁴ Footnote ²⁴
Вакцины, содержащие белок EF-Tu Vaccines containing EF-Tu		
Рекомбинантная вакцина, содержащая рекомбинантный белок EF-Tu <i>S. pneumoniae</i> штамма D39 Recombinant vaccine containing recombinant EF-Tu protein of <i>S. pneumoniae</i> D39 strain	Доклинические исследования Preclinical studies	[17]
Цельноклеточные пневмококковые вакцины Whole-cell pneumococcal vaccines		
Цельноклеточная вакцина на основе штамма <i>S. pneumoniae</i> RM200 (RX1E PdTΔlytA) Whole-cell vaccine based on <i>S. pneumoniae</i> RM200 strain (RX1E PdTΔlytA)	Завершена фаза 2 КИ Phase 2 trials completed	Сноска ²⁵ Footnote ²⁵
Цельноклеточная вакцина (SPWCV)/AI на основе инактивированного неинкапсулированного штамма <i>S. pneumoniae</i> , адсорбированного на гидроксиде алюминия Whole-cell vaccine (SPWCV)/AI based on inactivated non-encapsulated <i>S. pneumoniae</i> strain adsorbed on aluminum hydroxide	Завершена фаза 1 КИ Phase 1 trials completed	Сноска ²⁶ Footnote ²⁶
Живой аттенуированный вакцинный штамм с делецией гена <i>lgt</i> инкапсулированного пневмококкового штамма TIGR4 <i>S. pneumoniae</i> (TIGR4Δlgt) Live attenuated vaccine strain with <i>lgt</i> gene deleted from the encapsulated <i>S. pneumoniae</i> TIGR4 strain (TIGR4Δlgt)	Доклинические исследования Preclinical studies	[18]

Примечание. PspA — пневмококковый поверхностный белок A, Ply — пневмоллизин, PhtD — белок D пневмококковой гистидиновой триады, PsaA — пневмококковый холин-связывающий белок A, PsaA — пневмококковый поверхностный антиген A, PiuA — липопротеиновый компонент ABC-транспортёров железа *S. pneumoniae*, EF-Tu — прокариотический фактор элонгации, *lgt* — ген пролипопротеин диацилглицерил трансферазы, КИ — клинические исследования.

Note. PspA—pneumococcal surface protein A, Ply—pneumolysin, PhtD—protein D of the pneumococcal histidine triad, PcpA—pneumococcal choline binding protein A, PsaA—pneumococcal surface antigen A, PiuA—lipoprotein component of two *S. pneumoniae* iron-uptake ABC transporters, EF-Tu—prokaryotic elongation factor, *lgt*—prolipoprotein diacylglycerol transferase gene.

(RASV), экспрессирующих белок PspA, при парентеральном введении оказывали защитное действие в исследованиях на мышах, зараженных вирулентным штаммом [19]. В дальнейшем для оценки безопасности и иммуногенности созданных вакцин, а также для выбора вектора *S. typhi*, который обеспечивает оптимальную доставку антигена PspA, в КИ фазы 1 изучали пероральный способ однократного введения взрослым людям²⁷.

Введение кандидатной вакцины на основе белка PspA обладает перекрестной защитой против нескольких серотипов пневмококков, вызывающих носительство и инвазивные инфекции, что показано на моделях на животных [20]. В КИ фазы 1 вакцины на основе белка PspA продемонстрировали

безопасность и иммуногенность. Показано, что выделенные от вакцинированных людей антитела к PspA после введения мышам защищали их от пневмококковой инфекции [21]. Однако дальнейшее использование полноразмерного белка PspA вызывает опасения, так как данный белок имеет области гомологии с человеческим белком миозином, что может вызывать образование аутоантител и способствовать развитию воспалительных заболеваний сердца. В связи с этим поиск новых вариантов для разработки вакцин на основе PspA сосредоточен на обнаружении тех областей PspA, которые не содержат гомологии с миозином [4].

В ряде проведенных исследований показано, что пневмококковый поверхностный белок C (PspC) обладает

²² <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01033409>

²³ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00707798>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00985751>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01262872>

²⁴ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02572635>

²⁵ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02097472>

²⁶ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01537185>

²⁷ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01033409>

высокой иммуногенностью [22, 23]. Продemonстрировано, что антитела против PspC способны обеспечивать защиту от носительства и против развития инвазивной инфекции у мышей. Однако, несмотря на присутствие гена белка PspC почти у всех пневмококков, этот белок является весьма полиморфным, а варианты различаются по способности связывать фактор H (белок, регулирующий систему комплемента). Результаты исследования показали, что штамм *S. pneumoniae*, экспрессирующий вариант PspC, вызывающий образование специфичных антител, не защищает мышей против других вариантов PspC, что связано с высокой вариабельностью белка [22].

Проведенные исследования разработанной рекомбинантной кандидатной вакцины на основе белка гистидиновой триады PhtD выявили способность защищать иммунизированных мышей и приматов против пневмококковой колонизации носоглотки и легких [24–27]. Безопасность и иммуногенность рекомбинантной вакцины на основе белка PhtD доказана при введении взрослым добровольцам (18–50 лет) в КИ фазы 1, а вторая бустерная вакцинация приводила к увеличению уровня антител к PhtD [28]. Кроме этого выявлено, что человеческие антитела против PhtD обеспечивают пассивную защиту мышей против развития инфекции [29].

Изучение белков Ply и PhtD, введенных отдельно или в комбинации, показало, что белки защищали мышей от пневмококковой инфекции [25, 30]. КИ были проведены компанией ГлаксосмитКляйн для оценки безопасности, реактогенности и иммуногенности различных составов вакцины на основе пневмококковых белков Ply и PhtD в сравнении с препаратом Синфлорикс у взрослых и детей. В КИ фазы 1 здоровые взрослые (18–40 лет) получили две дозы одного из шести различных составов вакцин, содержащих инактивированный пневмолизин (dPly) или PhtD, или смесь двух белков (dPly и PhtD), или их комбинации в сочетании с вакциной Синфлорикс²⁸. Участники контрольной группы получали однократную дозу 23-валентной ППВ (Пневмовакс 23TM). Результаты показали, что составы вакцин, содержащие dPly и PhtD, отдельно или в сочетании с Синфлорикс, дают хорошую переносимость и иммуногенность [31]. В другом завершенном КИ фазы 2 дети от 12 до 23 месяцев получали одну из четырех исследуемых вакцин, содержащих суспензию из белков dPly и PhtD или их сочетания с Синфлорикс²⁹. Вакцина Синфлорикс использовалась в качестве контроля. Все составы вакцин хорошо переносились и были иммуногенны при введении в виде двух доз при первичной вакцинации с последующей бустерной дозой. В завершенном КИ фазы 2 влияние двух составов вакцин, содержащих dPly и PhtD в сочетании с Синфлорикс, оценивали у детей в возрасте 8–10 недель и у детей в возрасте 2–4 года³⁰. Вакцинация Синфлорикс/dPly/PhtD детей в возрасте 2–4 лет, ранее не получавших вакцину, показала хорошую переносимость и иммуногенность. При этом включение пневмококковых белков в вакцину Синфлорикс не оказало влияния на колонизацию пневмококков в носоглотке, несмотря на ранее показанную в клинических исследованиях у взрослых и детей иммуногенность этих составов и доказанную в доклинических исследованиях способность снижать колонизацию слизистых у мышей и приматов. Возможно, это связано с различиями в путях иммунизации и исходном иммунном статусе. Вместе с тем наличие взаимосвязи между воздействием вакцин на основе пневмококковых белков dPly/PhtD и распространенностью

носоглоточного носительства *S. pneumoniae* еще предстоит определить [32].

Исследование трехвалентной белковой вакцины PPrV, несущей рекомбинантные белки PspA, PhtD и PlyD1, показало, что иммунизация мышей данным препаратом защищает их от летального заражения *S. pneumoniae* [33]. В КИ фазы 1, проведенных компанией Sanofi Pasteur, кандидатная вакцина PPrV оказалась безопасной и иммуногенной для взрослых и детей [34]. Вакцина обеспечивает защиту посредством вовлечения макрофагального звена и комплементзависимых механизмов, а также снижения прикрепления пневмококка к эпителию слизистой и колонизации носоглотки [35].

Новая пневмококковая вакцина PnuBioVax, содержащая четыре белковых антигена Ply, PspA, PsaA и PiuA, сконструирована на основе штамма *S. pneumoniae* серотипа 4 TIGR4 с мутацией в гене *ply* с сохранением иммуногенности токсина, способности активировать систему комплемента, Toll-подобный рецептор 4 и миграцию CD4 Т-клеток [36]. В доклинических исследованиях было продемонстрировано, что при проведении анализа ОФА сыворотки крови кроликов, иммунизированных PnuBioVax, вызывали нейтрализацию вакцинного штамма TIGR4, а также штаммов серотипов 6B, 19F и 15B. В экспериментах *in vitro* было показано, что инкубация пневмококков в иммунных сыворотках приводила к агрегации бактерий, подавлению опосредованного пневмолизином лизиса эритроцитов и снижению бактериальной инвазии в эпителиальные клетки легких [36, 37]. Таким образом, вакцина PnuBioVax обладает расширенным потенциалом для защиты с вовлечением нескольких механизмов действия независимо от серотипов пневмококка. Вакцина PnuBioVax прошла фазу 1 КИ³¹, по результатам которых была показана безопасность и иммуногенность на здоровых взрослых (18–40 лет) [37].

Разработана кандидатная рекомбинантная вакцина против пневмококковой инфекции, содержащая белок EF-Tu штамма D39 *S. pneumoniae* [17]. Выявлено, что иммунизация мышей рекомбинантным белком EF-Tu вызывала у них значительное увеличение продукции цитокинов, включая IL-6, TNF-α, IFN-γ и IL-17. Кроме этого наблюдалось увеличение популяции CD4⁺ Т-клеток спленцитов мышей, а также повышение уровня антител IgG1 и IgG2a. Иммунизация мышей рекомбинантным белком EF-Tu обеспечивала защиту в условиях заражения летальной дозой штаммов *S. pneumoniae* серотипа 2 и серотипа 15A, обладающего множественной лекарственной устойчивостью [17]. Следовательно, пневмококковый белок EF-Tu можно рассматривать в качестве кандидата при разработке серотипнезависимой вакцины против пневмококковой инфекции.

Цельноклеточные пневмококковые вакцины

Исследования в отношении цельноклеточных вакцин показали, что инактивированные неинкапсулированные клетки бактерий *S. pneumoniae* были способны обеспечивать серотипнезависимую защиту, вызывать как гуморальный, так и клеточные иммунные ответы против множества пневмококковых антигенов у животных [38–40].

Сконструирована инактивированная цельноклеточная кандидатная вакцина на основе штамма *S. pneumoniae* RX1, полученного из мутантного капсулированного пневмококка серотипа 2, не способного к капсулированию. Вакцина, введенная

²⁸ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00707798>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00985751>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01262872>

²⁹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00985751>

³⁰ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01262872>

³¹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02572635>

интраназально с холерным токсином в качестве адьюванта, обеспечивала защиту от колонизации *S. pneumoniae* и инвазивной пневмококковой инфекции у мышей и крыс в отношении инкапсулированных штаммов серотипов 6B и 3, а также значительно снижала колонизацию серотипами 6B, 14, 23F носоглотки и среднего уха у мышей [41].

Цельноклеточная вакцина RM200, инактивированная бета-пропиолактоном, созданная на основе *S. pneumoniae* штамма RM200 (RX1E PdTΔ*lytA*) с заменой гена *lytA* на ген устойчивости к канамицину, проявила хорошие защитные свойства от колонизации носоглотки *S. pneumoniae* серотипа 6B, а также стимулировала повышение уровня интерлейкина 17A (IL-17A) [42]. Доклинические исследования показали, что введение данной вакцины вместе с гидроксидом алюминия в качестве адьюванта приводило к увеличению титра IgG и уровня IL-17 [43]. Также для данной вакцины завершены КИ фазы 2 для определения оптимальной дозировки на здоровых молодых добровольцах кенийского происхождения (от 18 до 45 лет) и детей в возрасте от 12 до 15 месяцев³².

Результаты КИ фазы 1 для кандидатной цельноклеточной инактивированной вакцины (SPWCV)/AI на основе неинкапсулированного штамма *S. pneumoniae* с гидроксидом алюминия показали безопасность и иммуногенность вакцины³³. Введение вакцины приводило к индукции иммунного ответа на несколько пневмококковых антигенов, в том числе на PspA и Ply, и не вызывало развития нежелательных явлений. Кроме того, у вакцинированных выявлено повышение уровня Т-клеточных цитокинов, включая интерлейкин 17A [44].

Разработанная живая аттенуированная цельноклеточная вакцина на основе штамма *S. pneumoniae* D39, ослабленного за счет удаления гена *rep27* (Δ*rep27*), обеспечивала серотипнезависимую защиту, препятствуя прикреплению и колонизации пневмококка. Проведенные исследования показали, что интраназальное введение кандидата в вакцины мышам обеспечивало длительную защиту от гетерологичных штаммов и от вторичных пневмококковых инфекций [45, 46]. Так как возникли опасения по поводу вероятности реверсии пневмококка штамма Δ*rep27* в фенотип дикого типа при иммунизации, то для повышения безопасности данной вакцины в штамме был дополнительно удален ген *comD*. Обнаружено, что иммунизация мышей аттенуированной цельноклеточной вакциной на основе штамма *S. pneumoniae* Δ*rep27*Δ*comD* приводила к значительному увеличению титра IgG к антигенам *S. pneumoniae* серотипа D39 и вызывала PspA-специфический IgG ответ. Кроме того, введение вакцины приводило к повышению выживаемости мышей более чем на 80% по сравнению с контрольной группой, а также снижению уровня пневмококковой колонизации независимо от серотипа. Безопасность и эффективность вакцины на основе штамма *S. pneumoniae* Δ*rep27*Δ*comD* была подтверждена на мышах с нормальным иммунным статусом и на иммунодефицитных мышах [47].

Сконструированный живой аттенуированный вакцинный штамм на основе инкапсулированного пневмококкового штамма TIGR4 с делецией гена пролипопротеин диацилглицерин трансферазы *lgt* (TIGR4Δ*lgt*), обладающий сниженной вирулентностью и воспалительной активностью, был способен защищать мышей от заражения гетерологичными штаммами пневмококка [18]. При этом интраназальная иммунизация мышей штаммом TIGR4Δ*lgt* обеспечивала защиту от пневмококковой инфекции, вызываемой штаммами серотипов 2 (D39), 3 (wu2), 6B, 9V, 19F и 23F; индуцировала IgA и IgG2b-доминантные

иммунные ответы, обладающие перекрестной реактивностью к различным серотипам пневмококка. Полученные результаты показали, что TIGR4Δ*lgt* является потенциальным кандидатом пневмококковой вакцины широкого спектра действия [18].

Цельноклеточные вакцины содержат все пневмококковые белковые антигены. Доклинические исследования и КИ фазы 1 показали, что цельноклеточные инактивированные вакцины или живые ослабленные вакцины на основе неинкапсулированного штамма *S. pneumoniae* способны обеспечивать серотипнезависимую защиту и стимулируют как гуморальные, так и клеточные иммунные ответы против нескольких антигенов.

Разработка пневмококковых вакцин, снабженных системой доставки антигенов

Перспективным подходом в разработке новых пневмококковых вакцин является использование систем доставки антигенов на основе микрочастиц и наночастиц. При введении сконструированной кандидатной вакцины на основе белка PspA и системы доставки в виде частиц на основе полимолочной кислоты (PLA) и поли(глицеринадипат-ко-ω-пентадекалактона) (PGA-co-PDL) наблюдали устойчивые IgG-ассоциированные иммунные ответы у мышей и крыс. При этом взаимодействие носителя с белком PspA не влияло на структурные и антигенные свойства PspA [48, 49].

Вакцины на основе бактериоподобных частиц обладают иммуностимулирующей активностью при местном применении в области слизистой оболочки носоглотки. Примером могут служить бактериоподобные частицы, содержащие гибридный белок на основе антигена и якорного белка AcpA — гидролазы клеточной стенки *Lactococcus lactis*, обладающие высокой протективной и адьювантной активностью [50]. Белковая кандидатная вакцина, содержащая антиген PspA, снабженная системой доставки на основе бактериоподобных частиц, обладала способностью к активации антигенпрезентирующих клеток, иммуностимулирующему действию при нанесении на слизистую оболочку и протективным эффектом, обеспечивая защиту от пневмококковой пневмонии у мышей при интраназальном заражении летальной дозой *S. pneumoniae* независимо от серотипа [51].

В работе Т. Gupalova с соавт. [52] описана новая пневмококковая инъекционная вакцина, в которой на поверхности живого пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L3 экспрессируются антигены химерного белка PSPF, состоящего из фрагментов консервативных и иммуногенных поверхностных белков *S. pneumoniae* (PspA, PsaA, Spr1875) и концевых доменов флагеллина *Salmonella typhimurium* (FlaC1) в качестве адьюванта. Результаты исследования вакцины на лабораторных мышах продемонстрировали появление специфических антител IgA и IgG, обеспечивающих защиту от инфицирования летальной дозой *S. pneumoniae*, что позволяет рассматривать рекомбинантный пробиотический штамм с химерным белком как возможный прототип пневмококковой вакцины [52].

Пневмококковая кандидатная вакцина на основе наночастиц хитозан-ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген PsaA, при интраназальной иммунизации мышей BALB/c вызывала увеличение уровней IFN-γ, IL-17A, IL-4, IgG и IgA в слизистой оболочке, а также обладала защитным действием против пневмококковой колонизации носоглотки [53]. При внутрибрюшинном заражении *S. pneumoniae* (серотипа 3 или 14) иммунизированных вакциной мышей наблюдали увеличение их выживаемости. Другая вакцина на основе наночастиц хитозана и 13-валентной пневмококковой

³² <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02097472>

³³ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01537185>

конъюгированной вакцины (Превенар®13) вызывала при иммунизации значительное увеличение уровня антител подкласса IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3) к Pn14PS (пневмококковый полисахарид типа 14) [54].

Применение катионных липосом (липосомы DOTAP/DC-chol) способствовало повышению эффективности доставки антигена PspA к дендритным клеткам слизистой оболочки в назальной области у мышей, а также обеспечивало протективный эффект при инфицировании летальной дозой *S. pneumoniae* [55].

Интраназальная иммунизация мышей рекомбинантными липопротеинами — пневмококковым нуклеозид-связывающим белком (PnA), метионин-связывающим белком (MetQ), L,D-карбоксипептидазой (DacB) и PsaA, с использованием субъединицы В холерного токсина в качестве адьюванта защищала от пневмококковой колонизации носоглотки после интраназального заражения штаммом *S. pneumoniae* D39 [56].

Таким образом, представленные варианты систем доставки антигена для разрабатываемых кандидатных вакцин против пневмококковой инфекции являются весьма перспективными и могут быть использованы в качестве носителей антигена в составе будущих вакцин, однако требуют дальнейшего изучения.

Заключение

В настоящее время исследования ученых направлены на разработку вакцин, которые должны обеспечивать широкий комплекс защиты от циркулирующих серотипов пневмококка. Некоторые из разработанных кандидатных вакцин уже находятся на завершающих стадиях клинических исследований. При этом выявлено, что сконструированные белковые и цельноклеточные вакцины проявляют эффективность вне зависимости от серотипа.

Живые аттенуированные вакцины, полученные путем введения нескольких мутаций в геноме пневмококка, главным образом делеций, характеризуются низкой патогенностью и способностью индуцировать местный и системный иммунный ответ на пневмококковую инфекцию, обеспечивая защиту слизистой от колонизации пневмококком. В то же время заслуживает внимания и новое направление разработки пневмококковых вакцин, основанное на использовании в качестве антигенов факторов вирулентности *S. pneumoniae*, характеризующихся высокой вариабельностью и различиями в уровнях экспрессии для разных серотипов. При этом идентификация высококонсервативных антигенных областей полноразмерных факторов вирулентности, идентичных у разных серотипов *S. pneumoniae*, позволяет создавать отдельные пептидные фрагменты факторов вирулентности и комбинировать их. Помимо этого, дальнейшая разработка вакцин, обеспечивающих серотипнезависимую защиту, может быть направлена на включение в состав вакцины бактериоподобных частиц или микрочастиц/наночастиц, содержащих антигенные белки, являющиеся факторами вирулентности *S. pneumoniae*, в частности PsaA или комбинацию из нескольких поверхностных антигенов.

Таким образом, наиболее перспективными пневмококковыми вакцинами являются те, которые обеспечивают широкий комплекс защиты в отношении спектра циркулирующих серотипов пневмококка и помимо развития системного иммунного ответа вызывают индукцию местного иммунитета, позволяющего предотвращать колонизацию слизистых на начальных стадиях заболевания.

Вклад авторов. М. В. Савкина — дизайн статьи, анализ данных литературы, написание текста рукописи; М. А. Кривых — существенный вклад в концепцию работы;

Н. А. Гаврилова — критический пересмотр содержания текста, доработка текста рукописи; Л. В. Саяпина — редактирование текста рукописи; Ю. И. Обухов — критическое обсуждение текста рукописи; В. А. Меркулов — окончательное утверждение версии рукописи для публикации; В. П. Бондарев — формирование концепции рукописи, окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. Maria V. Savkina—elaboration of the study design, analysis of literature, writing of the text; Maksim A. Krivikh—participation in elaboration of the concept of the study; Natalia A. Gavrilova—revision of the text of the paper; Lidia V. Sayapina—editing of the text; Yuriy I. Obukhov—review of the text of the paper; Vadim A. Merkulov—approval of the final version of the paper for publication; Vladimir P. Bondarev—elaboration of the concept of the paper, 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. В. А. Меркулов является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». В. П. Бондарев является заместителем главного редактора 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*.

Литература / References

1. Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*. 2010;375(9730):1969–87. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60549-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60549-1)
2. Wunderink RG, Waterer GW. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med*. 2014;370:543–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1214869>
3. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(4):288–301. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1871>
4. Masomian M, Ahmad Z, Gew LT, Poh CL. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. *Vaccines*. 2020;8(1):132. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010132>
5. Kwambana-Adams BA, Mulholland EK, Satzke C, ISPPD group. State-of-the-art in the pneumococcal field: Proceedings of the 11th International symposium on pneumococci and pneumococcal diseases (ISPPD-11). *Pneumonia*. 2020;12:2. <https://doi.org/10.1186/s41479-019-0064-y>
6. Hirst RA, Kadioglu A, O'callaghan C, Andrew PW. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol*. 2004;138(2):195–201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02611.x>
7. Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH Jr, Briles DE. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. *Infect Immun*. 2004;72(9):5031–40. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5031-5040.2004>
8. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009;374(9700):1543–56. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61114-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61114-4)
9. Andre GO, Converso TR, Politano WR, Ferraz LF, Ribeiro ML, Leite LCC, Darrieux M. Role of *Streptococcus*

- pneumoniae* proteins in evasion of complement-mediated immunity. *Front Microbiol.* 2017;8:224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00224>
10. Mukerji R, Briles DE. New strategy is needed to prevent pneumococcal meningitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2020;39(4):298–304. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002581>
 11. Pichichero ME. Pneumococcal whole-cell and protein-based vaccines: changing the paradigm. *Expert Rev Vaccines.* 2017;16(12):1181–90. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1393335>
 12. Klugman KP, Rodgers GL. Time for a third-generation pneumococcal conjugate vaccine. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(1):14–6. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30513-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30513-2)
 13. Huang L, Wang L, Li H, Hu Y, Ru W, Han W, et al. A phase III clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23) in healthy children, adults, and elderly. *Hum Vaccin Immunother.* 2019;15(1):249–55. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1509648>
 14. Stacey HL, Rosen J, Peterson JT, Williams-Diaz A, Gakhar V, Sterling TM, et al. Safety and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV-15) compared to PCV-13 in healthy older adults. *Hum Vaccin Immunother.* 2019;15(3):530–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1532249>
 15. Thompson A, Lamberth E, Severs J, Scully I, Tarabar S, Ginis J, et al. Phase 1 trial of a 20-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine.* 2019;37(42):6201–07. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.08.048>
 16. Klein NP, Peyrani P, Yacisin K, Caldwell N, Xu X, Scully IL, et al. A phase 3, randomized, double-blind study to evaluate the immunogenicity and safety of 3 lots of 20-valent pneumococcal conjugate vaccine in pneumococcal vaccine-naïve adults 18 through 49 years of age. *Vaccine.* 2021;39(38):5428–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.07.004>
 17. Nagai K, Domon H, Maekawa T, Hiyoshi T, Tamura H, Yonezawa D, et al. Immunization with pneumococcal elongation factor Tu enhances serotype-independent protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Vaccine.* 2019;37(1):160–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.015>
 18. Jang A-Y, Ahn KB, Zhi Y, Ji H-J, Zhang J, Han SH, et al. Serotype-independent protection against invasive pneumococcal infections conferred by live vaccine with *igt* deletion. *Front Immunol.* 2019;10:1212. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01212>
 19. Li Y, Wang S, Scarpellini G, Gunn B, Xin W, Wanda S-Y, et al. Evaluation of new generation *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(2):593–8. <https://www.jstor.org/stable/40254825>
 20. Briles DE, Hollingshead SK, Nabors GS, Paton JC, Brooks-Walter A. The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine.* 2000;19(Suppl 1):S87–95. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00285-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00285-1)
 21. Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A, Braun PA, Park MK, et al. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *J Infect Dis.* 2000;182(6):1694–701. <https://doi.org/10.1086/317602>
 22. Georgieva M, Kagedan L, Lu Y-J, Thompson CM, Lipsitch M. Antigenic variation in *Streptococcus pneumoniae* PspC promotes immune escape in the presence of variant-specific immunity. *mBio.* 2018;9(2):e00264-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00264-18>
 23. Brooks-Walter A, Briles DE, Hollingshead SK. The *pspC* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. *Infect Immun.* 1999;67(12):6533–42. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.12.6533-6542.1999>
 24. Khan MN, Pichichero ME. CD4 T cell memory and antibody responses directed against the pneumococcal histidine triad proteins PhtD and PhtE following nasopharyngeal colonization and immunization and their role in protection against pneumococcal colonization in mice. *Infect Immun.* 2013;81(10):3781–92. <https://doi.org/10.1128/IAI.00313-13>
 25. Godfroid F, Hermand P, Verlant V, Denoël P, Poolman JT. Preclinical evaluation of the Pht proteins as potential cross-protective pneumococcal vaccine antigens. *Infect Immun.* 2011;79(1):238–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.00378-10>
 26. Verhoeven D, Perry S, Pichichero ME. Contributions to protection from *Streptococcus pneumoniae* infection using the monovalent recombinant protein vaccine candidates PcpA, PhtD, and PlyD1 in an infant murine model during challenge. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(8):1037–45. <https://doi.org/10.1128/CLVI.00052-14>
 27. Denoël P, Philipp MT, Doyle L, Martin D, Carletti G, et al. A protein-based pneumococcal vaccine protects rhesus macaques from pneumonia after experimental infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine.* 2011;29(33):5495–501. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.051>
 28. Seiberling M, Bologna M, Brookes R, Ochs M, Go K, Neveu D, et al. Safety and immunogenicity of a pneumococcal histidine triad protein D vaccine candidate in adults. *Vaccine.* 2012;30(52):7455–60. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.080>
 29. Brookes RH, Ming M, Williams K, Hopfer R, Gurunathan S, Gallichan S, et al. Passive protection of mice against *Streptococcus pneumoniae* challenge by naturally occurring and vaccine-induced human anti-PhtD antibodies. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(7):1836–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1039210>
 30. Hermand P, Vandercammen A, Mertens E, Di Paolo E, Verlant V, Denoël P, Godfroid F. Preclinical evaluation of a chemically detoxified pneumolysin as pneumococcal vaccine antigen. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(1):220–8. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1234553>
 31. Leroux-Roels G, Maes C, De Boever F, Traskine M, Rüggeberg JU, Borys D. Safety, reactogenicity and immunogenicity of a novel pneumococcal protein-based vaccine in adults: a phase I/II randomized clinical study. *Vaccine.* 2014;32(50):6838–46. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.052>
 32. Odutola A, Ota MOC, Antonio M, Ogundare EO, Saidu Y, Foster-Nyarko E, et al. Efficacy of a novel, protein-based pneumococcal vaccine against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in infants: a phase 2, randomized, controlled, observer-blind study. *Vaccine.* 2017;35(19):2531–42. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.071>
 33. Verhoeven D, Xu Q, Pichichero ME. Vaccination with a *Streptococcus pneumoniae* trivalent recombinant PcpA, PhtD and PlyD1 protein vaccine candidate protects against lethal pneumonia in an infant murine model. *Vaccine.* 2014;32(26):3205–10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.004>
 34. Brooks WA, Chang L-J, Sheng X, Hopfer R. Safety and immunogenicity of a trivalent recombinant PcpA, PhtD, and PlyD1 pneumococcal protein vaccine in adults, toddlers, and infants: a phase I randomized controlled study. *Vaccine.* 2015;33(36):4610–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.078>
 35. Visan L, Rouleau N, Proust E, Peyrot L, Donadieu A, Ochs M. Antibodies to PcpA and PhtD protect mice against *Streptococcus pneumoniae* by a macrophage- and complement-dependent mechanism. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(2):489–94. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1403698>
 36. Hill S, Entwistle C, Pang Y, Joachim M, McIlgorm A, Dalton K, et al. Immunogenicity and mechanisms of action of PnuBioVax, a multi-antigen serotype-independent prophylactic vaccine against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine.* 2018;36(29):4255–64. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.122>
 37. Entwistle C, Hill S, Pang Y, Joachim M, McIlgorm A, Colaco C, et al. Safety and immunogenicity of a novel multiple antigen pneumococcal vaccine in adults: a phase 1 randomised clinical trial. *Vaccine.* 2017;35(51):7181–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.076>
 38. Liberman C, Takagi M, Cabrera-Crespo J, Sbroglio-Almeida ME, Dias WO, Leite LCC, Gonçalves VM. Pneumococcal whole-cell vaccine: optimization of cell growth of unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* in bioreactor using animal-free medium.

- J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008;35(11):1441–5. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0445-3>
39. Lu YJ, Leite L, Gonçalves VM, Dias WO, Liberman C, Fratelli F, et al. GMP-grade pneumococcal whole-cell vaccine injected subcutaneously protects mice from nasopharyngeal colonization and fatal aspiration-sepsis. *Vaccine.* 2010;28(47):7468–75. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.09.031>
40. Gonçalves VM, Dias WO, Campos IB, Liberman C, Sbrógio-Almeida ME, Silva EP, et al. Development of a whole cell pneumococcal vaccine: BPL inactivation, cGMP production, and stability. *Vaccine.* 2014;32(9):1113–20. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.091>
41. Malley R, Lipsitch M, Stack A, Saladino R, Fleisher G, Pelton S, et al. Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by capsulated pneumococci. *Infect Immun.* 2001;69(8):4870–3. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4870-4873.2001>
42. Lu YJ, Yadav P, Clements JD, Forte S, Srivastava A, Thompson CM, et al. Options for inactivation, adjuvant, and route of topical administration of a killed, unencapsulated pneumococcal whole-cell vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(6):1005–12. <https://doi.org/10.1128/CI.00036-10>
43. Hogenesch H, Dunham A, Hansen B, Anderson K, Maisonneuve JF, Hem SL. Formulation of a killed whole cell pneumococcus vaccine — effect of aluminum adjuvants on the antibody and IL-17 response. *J Immune Based Ther Vaccines.* 2011;29(9):5. <https://doi.org/10.1186/1476-8518-9-5>
44. Keech CA, Morrison R, Anderson P, Tate A, Flores J, Goldblatt D, et al. A phase 1 randomized, placebo-controlled, observer-blinded trial to evaluate the safety and immunogenicity of inactivated *Streptococcus pneumoniae* whole-cell vaccine in adults. *Pediatr Infect Dis J.* 2020;39(4):345–51. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000002567>
45. Kim EH, Choi SY, Kwon MK, Tran TD, Park SS, Lee KJ, et al. *Streptococcus pneumoniae* pep27 mutant as a live vaccine for serotype-independent protection in mice. *Vaccine.* 2012;30:2008–19. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.073>
46. Seon SH, Choi JA, Yang E, Pyo S, Song MK, Rhee DK. Intranasal immunization with an attenuated pep27 mutant provides protection from influenza virus and secondary pneumococcal infections. *J Infect Dis.* 2018;217:637–40. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix594>
47. Kim SJ, Seon SH, Luong TT, Ghosh P, Pyo S, Rhee DK. Immunization with attenuated non-transformable pneumococcal pep27 and comD mutant provides serotype-independent protection against pneumococcal infection. *Vaccine.* 2019;37:90–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.027>
48. Anish C, Upadhyay AK, Sehgal D, Panda AK. Influences of process and formulation parameters on powder flow properties and immunogenicity of spray dried polymer particles entrapping recombinant pneumococcal surface protein A. *Int J Pharm.* 2014;466:198–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.025>
49. Kunda NK, Alfagih IM, Miyaji EN, Figueiredo DB, Gonçalves VM, Ferreira DM, et al. Pulmonary dry powder vaccine of pneumococcal antigen loaded nanoparticles. *Int J Pharm.* 2015;495:903–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.034>
50. van Roosmalen ML, Kanninga R, El Khatibi M, Neef J, Audouy S, Bosma T, et al. Mucosal vaccine delivery of antigens tightly bound to an adjuvant particle made from food-grade bacteria. *Methods.* 2006;38:144–9. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2005.09.015>
51. Lu J, Guo J, Wang D, Yu T, Gu T, Jiang C, et al. Broad protective immune responses elicited by bacterium-like particle-based intranasal pneumococcal particle vaccine displaying PspA2 and PspA4 fragments. *Hum Vaccin Immunother.* 2019;15:371–80. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1526556>
52. Gupalova T, Leontieva G, Kramskaya T, Grabovskaya K, Kuleshevich E, Suvorov A. Development of experimental pneumococcal vaccine for mucosal immunization. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218679>
53. Xu JH, Dai WJ, Chen B, Fan XY. Mucosal immunization with PsaA protein, using chitosan as a delivery system, increases protection against acute otitis media and invasive infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Scand J Immunol.* 2015;81:177–85. <https://doi.org/10.1111/sji.12267>
54. Haryono A, Salsabila K, Restu WK, Harmami SB, Safari D. Effect of chitosan and liposome nanoparticles as adjuvant codelivery on the immunoglobulin G subclass distribution in a mouse model. *J Immunol Res.* 2017;2017:9125048. <https://doi.org/10.1155/2017/9125048>
55. Tada R, Suzuki H, Takahashi S, Negishi Y, Kiyono H, Kunisawa J, Aramaki Y. Nasal vaccination with pneumococcal surface protein A in combination with cationic liposomes consisting of DOTAP and DC-chol confers antigen-mediated protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infections in mice. *Int Immunopharmacol.* 2018;61:385–93. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.027>
56. Voß F, Kohler TP, Meyer T, Abdullah MR, van Opzeeland FJ, Saleh M, et al. Intranasal vaccination with lipoproteins confers protection against pneumococcal colonisation. *Front Microbiol.* 2018;9:2405. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02405>

Об авторах / Authors

Савкина Мария Владимировна, канд. биол. наук. *Maria V. Savkina*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8527-2157>

Кривых Максим Андреевич, канд. фарм. наук. *Maksim A. Krivykh*, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2003-1264>

Гаврилова Наталья Андреевна, канд. биол. наук. *Natalia A. Gavrilova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4624-9189>

Саяпина Лидия Васильевна, д-р мед. наук. *Lidia V. Sayapina*, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2272-2621>

Обухов Юрий Иванович. *Yuriy I. Obukhov*. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7729-9800>

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

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

Поступила 03.06.2021

После доработки 19.10.2021

Принята к публикации 10.12.2021

Received 3 June 2021

Revised 19 October 2021

Accepted 10 December 2021

Получение твердых лекарственных форм препаратов иммуноглобулиновой природы

Е. Г. Абрамова^{1,2}, А. В. Комиссаров^{1,*}, Н. В. Синицына¹, И. М. Жулидов¹, 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, г. Саратов, 410005, Российская Федерация

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

На данный момент отсутствуют научные издания, посвященные технологическим вопросам производства твердых лекарственных форм препаратов иммуноглобулиновой природы. Цель работы — обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященной вопросам получения твердых лекарственных форм препаратов иммуноглобулиновой природы, а также представление результатов собственных исследований по этому вопросу. Проанализированы сведения Государственного реестра лекарственных средств в Российской Федерации по состоянию на середину 2021 г. о зарегистрированных препаратах с группировочным наименованием — глобулин в твердой лекарственной форме, дана их характеристика. Рассмотрены данные о качественном и количественном составе вспомогательных веществ, используемых при лиофилизации, получении таблеток и капсул. На ряде примеров показано влияние технологических параметров процессов получения твердых лекарственных форм препаратов иммуноглобулиновой природы на качество препаратов. Подтверждено, что получение препаратов иммуноглобулиновой природы в твердой форме предотвращает агрегацию и фрагментацию белков в процессе хранения, негативно влияющих на специфическую активность препарата, а также способствует более длительному сохранению целевых характеристик в сравнении с жидкими иммуноглобулинами. Результаты проведенного анализа могут быть положены в основу при создании технологии изготовления твердых форм препаратов иммуноглобулиновой природы.

Ключевые слова: лекарственные препараты иммуноглобулиновой природы; лиофилизация; таблетки; капсулы; вспомогательные вещества; технологические параметры

Для цитирования: Абрамова ЕГ, Комиссаров АВ, Синицына НВ, Жулидов ИМ, Никифоров АК. Получение твердых лекарственных форм препаратов иммуноглобулиновой природы. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(4):244–255. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-244-255>

*** Контактное лицо:** Комиссаров Александр Владимирович; Komissarov-9@yandex.ru

Production of solid dosage forms of immunoglobulin products

E. G. Abramova^{1,2}, A. V. Komissarov^{1,*}, N. V. Sinitsyna¹, I. M. Zhulidov¹, A. K. Nikiforov^{1,2}

¹ Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”,
46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russian Federation

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

At the moment, there are no scientific publications devoted to the technological aspects of production of immunoglobulin solid dosage forms. The aim of the study was to review Russian and foreign literature on production of immunoglobulin solid dosage forms, and present the results of the authors' own research. The authors analysed data of the National Register of Medicines of the Russian Federation as of mid-2021 on the authorised medicines with a generic name 'globulin in a solid dosage form', and summarised their characteristics. They reviewed data on the qualitative and quantitative composition of excipients used in lyophilisation, preparation of tablets and capsules. A number of examples were used to illustrate the effect of technological parameters of immunoglobulin solid form production on the quality of the finished products. It was demonstrated that the production of solid forms of immunoglobulin products prevents aggregation and fragmentation of proteins during storage, which affect the product's specific activity, and also help to preserve the product's target characteristics for a longer period of time as compared to liquid dosage forms of immunoglobulins. The results of the study may be used as a basis for development of a manufacturing technology for solid forms of immunoglobulin products.

Key words: immunoglobulin products; lyophilisation; tablets; capsules; excipients; technological parameters

For citation: Abramova EG, Komissarov AV, Sinitsyna NV, Zhulidov IM, Nikiforov AK. Production of solid dosage forms of immunoglobulin products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(4):244–255. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-244-255>

*** Corresponding author:** Aleksandr V. Komissarov; Komissarov-9@yandex.ru

Жидкая форма иммунобиологических лекарственных препаратов считается наиболее экономичной и удобной для потребителей, однако лечебным иммуноглобулинам (ИГ) в жидком виде присущи значительные минусы, к которым можно отнести более низкую стабильность, потенциальное уменьшение лечебных свойств в процессе долгосрочного хранения, а также вероятность возникновения агрегатов и фрагментов [1, 2].

Помимо сохранения неизменности молекулярных характеристик, а также лечебно-профилактических свойств ИГ их сухая форма сводит к минимуму появление агрегации и фрагментации белков, оказывающих отрицательное воздействие на лечебные свойства. Появление агрегатов в растворах ИГ может привести к аллергическим проявлениям у пациента в ответ на инъекцию [1, 2], провоцирует формирование труднорастворимых высокомолекулярных комплексов, приводящих к активации комплекса защитных белков крови пациента [3]. Не исключено, что явление молекулярной агрегации растворов ИГ возникает, если стекло ампул или флаконов обладает высоким отрицательным зарядом [4–6]. Присутствие в ИГ следов спирта, применяемого в технологии производства препаратов, также может привести к агрегации белков [7]. Выявлено, что окислительная деградация липидов, обусловленная присутствием в лекарственной форме лабильных липопротеинов и прооксидантов (металлов переменной валентности, гемопротеинов), может приводить к агрегации белковых молекул ИГ [8]. Продукты окисления липидов, вступая во взаимодействие с молекулами ИГ, вызывают агрегацию белков. Устойчивость белковых растворов снижается за счет образования дисульфидных связей между молекулами белка и липидами. Есть мнение, что агрегации ИГ, снижающей эффективность иммунологических реакций, может способствовать высокая концентрация белка в жидких формах ИГ [9–14].

Фрагментация, как и агрегация, является следствием неустойчивости жидкой формы ИГ и может способствовать снижению нейтрализующей активности антител и повышенному клиренсу ИГ [15]. ИГ, изолированные из сыворотки крови, могут содержать в своем составе небольшое количество сывороточных протеаз типа фибринолизина и тканевых катепсинов, которые в процессе хранения ИГ жидкой формы способны вызывать расщепление иммуноглобулина с образованием низкомолекулярных фрагментов [16, 17].

Стабильность ИГ можно повысить при снижении концентрации липопротеинов и применении антиоксидантов, ингибирующих свободные радикалы [16, 17], однако лучшим способом достижения стабильности качественных показателей иммуноглобулиновых препаратов в процессе длительного хранения является лиофилизация [18–21].

Цель работы — обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященной вопросам получения твердых лекарственных форм препаратов иммуноглобулиновой природы, а также изложение результатов собственных исследований по этому вопросу.

Согласно данным Государственного реестра лекарственных средств в Российской Федерации¹ (по состоянию на середину 2021 г.), зарегистрированы более 60 наименований с группировочным наименованием — иммуноглобулин. При этом в твердой лекарственной форме представлены 8 наименований ИГ, выпускаемых различными производителями (табл. 1).

Следует отметить, что практически все твердые лекарственные формы ИГ производятся как лиофилизаты во флаконах. Обращает на себя внимание разнообразие вспомогательных веществ, применяемых при лиофилизации, или даже

их отсутствие, как в случае Лактоглобулина против условно-патогенных бактерий и сальмонелл коровьего, Лактоглобулина противополипротейного коровьего, выпускаемых ФБУН «РостовНИИМП» Роспотребнадзора. Отсутствие вспомогательных веществ в последних двух препаратах, на наш взгляд, объясняется наличием в самом препарате веществ (по всей видимости, белков молозива коров), позволяющих избежать денатурирующего действия на ИГ в процессе лиофилизации. Все другие перечисленные ИГ получают из плазмы крови человека или кроликов, и в них присутствуют вспомогательные вещества. При этом следует отметить, что наиболее часто используемой в качестве компонента среды высушивания является аминокислота глицин, которая применяется для стабилизации свойств жидких форм ИГ.

Первоначально был проведен анализ данных литературы о технологических аспектах производства твердых лекарственных форм ИГ, зарегистрированных в России. К сожалению, в доступных источниках имеются сведения лишь о двух препаратах: Иммуновенин («НПО «Микроген») и КИП (АО «Иммуно-Гем»).

Технологические особенности получения твердой формы препарата Иммуновенин®

В статье сотрудников «НПО «Микроген» описаны технологические приемы получения препарата Иммуновенин® во флаконах вместимостью 50 мл для приготовления раствора для инфузий, а также исследования по оптимизации производственного процесса сушки [22].

Индустриальный способ его сублимационной сушки в количестве 800 флаконов за один цикл включал до начала лиофилизации заблаговременное замораживание до температуры минус 40 °С с выдерживанием при данной температуре в течение 10 ч и последующую лиофилизацию в установке ТГ-50 (ГДР) в течение (85±7) ч. Температуру греющих плит в течение 10 ч поднимали до 10 °С, выдерживали при данной температуре в течение 25 ч, далее температуру поднимали до 25 °С и оставляли ее неизменной до окончания сушки. Температура препарата от начала процесса к 55 ч повышалась от минус 40 до минус 25 °С, далее к 65 ч — до 20 °С, к 75 ч была достигнута температура 25 °С, после чего препарат выдерживали при данной температуре 10 ч. Вакуум в камере поддерживали на уровне 10–15 Па.

Необходимость проведения исследований по совершенствованию технологии лиофилизации была вызвана потребностью увеличения количества первичных упаковок препарата, получаемых за один цикл сушки, с 800 до 1600 флаконов. Для достижения поставленной задачи были вычислены необходимые габариты и произведены оригинальные поддоны, что позволило задействовать неиспользуемые площади продуктового отсека сушильной установки, а также предложена новая схема лиофильной сушки, при этом показано, что снижение теплоподвода к материалу в период постоянной скорости сушки и удлинение периода десорбции при температуре ниже эвтектической снижают риск повреждения препарата во время лиофилизации [22]. Было выявлено, что увеличение объема загрузки в 2 раза (до 1600 флаконов) приводит к повышению нагрузки на вакуумные насосы. Однако производительность вакуумного насоса и конденсатора ограничена, а повышение рабочего давления в камере сопровождается повышением температуры материала, которая может стать выше эвтектической, что приведет к карамелизации материала.

¹ <https://grls.rosminzdrav.ru>

Таблица 1. Сведения об иммуноглобулинах в твердой лекарственной форме, зарегистрированных в Российской Федерации²
Table 1. The solid dosage forms of immunoglobulins authorised in the Russian Federation²

Наименование препарата Name	Лекарственная форма Dosage form	Состав Composition	Производитель Manufacturer	Условия хранения Storage conditions
Иммуноглобулиновый комплексный препарат для энтерального применения (КИП) (глобулин) Immunoglobulin complex preparation for enteral use (CIP) (globulin)	Лиофилизат для приготовления раствора для приема внутрь (во флаконах) Lyophilisate for oral solution (vials)	Состав (на 1 дозу): действующее вещество: белки плазмы крови человека, из которых ИГ классов IgG, IgA, IgM не менее 97% — 300 мг; вспомогательные вещества: глицин — 150 мг Composition (for 1 dose): active substance: human blood plasma proteins, of which IgG, IgA, IgM classes account for not less than 97%—300 mg; excipients: glycine—150 mg	АО «НПО «Микроген» (Россия) JSC “NPO Microgen” (Russia)	При температуре от 2 до 8 °C At 2 °C to 8 °C
Иммуноглобулиновый комплексный препарат для энтерального применения (КИП) (глобулин) Immunoglobulin complex preparation for enteral use (CIP) (globulin)	Лиофилизат для приготовления раствора для приема внутрь (во флаконах) Lyophilisate for oral solution (vials)	Состав (на 1 дозу): действующее вещество: белки плазмы крови человека, из которых ИГ классов IgG, IgA, IgM не менее 97% — 300 мг; вспомогательные вещества: глицин — 100 мг Composition (for 1 dose): active substance: human blood plasma proteins, of which IgG, IgA, IgM classes account for not less than 97%—300 mg; excipients: glycine—100 mg	АО «Иммуно-Гем» (Россия) JSC “Immuno-Gem” (Russia)	При температуре от 2 до 8 °C At 2 °C to 8 °C
Иммуноглобулиновый комплексный препарат для энтерального применения (КИП) (глобулин) Immunoglobulin complex preparation for enteral use (CIP) (globulin)	Лиофилизат для приготовления раствора для приема внутрь (во флаконах) Lyophilisate for oral solution (vials)	Состав (на 1 дозу): действующее вещество: белки плазмы крови человека, из которых ИГ классов IgG, IgA, IgM не менее 97% — 300 мг; вспомогательные вещества: глицин — 100 мг Composition (for 1 dose): active substance: human blood plasma proteins, of which IgG, IgA, IgM classes account for not less than 97%—300 mg; excipients: glycine—100 mg	ООО «Инновационный центр биотехнологий» (Россия) ООО “Innovation Centre of Biotechnologies” (Russia)	При температуре от 2 до 8 °C At 2 °C to 8 °C
Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл коровий (глобулин) Lactoglobulin against opportunistic bacteria and Salmonella, bovine (globulin)	Лиофилизат для приготовления раствора для приема внутрь (в пенициллиновых флаконах по 1 (2) дозе) Lyophilisate for oral solution (1 (2) dose(s) in serum vials)	Состав (на 1 дозу): действующее вещество: иммунные глобулины молозива коров, содержащие антитела к сальмонеллам группы В (<i>Salmonella typhimurium</i>), сальмонеллам группы Д (<i>S. enteritidis</i> и <i>S. dublin</i>), протею (<i>Proteus mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i>), клебсиелле (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) и псевдомонас (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) — 0,5 (1,0) г; вспомогательные вещества: отсутствуют Composition (for 1 dose): active substance: bovine colostrum immunoglobulins containing antibodies to <i>Salmonella</i> group B (<i>Salmonella typhimurium</i>), <i>Salmonella</i> group D (<i>Salmonella enteritidis</i> and <i>S. dublin</i>), <i>Proteus</i> (<i>P. mirabilis</i> and <i>P. vulgaris</i>), <i>Klebsiella</i> (<i>K. pneumoniae</i>) and <i>Pseudomonas</i> (<i>P. aeruginosa</i>)—0.5 (1.0) g; excipients: none	ФБУН «РостовНИИМП» Роспотребнадзора (Россия) Federal State Budgetary Institution “Rostov Research Centre of Microbiology and Parasitology” of Rosпотребнадзор (Russia)	При температуре от 2 до 10 °C At 2 °C to 10 °C
Лактоглобулин противоколипротейный коровий (глобулин) Lactoglobulin against coli-proteus, bovine (globulin)	Лиофилизат для приготовления раствора для приема внутрь (в пенициллиновых флаконах по 1 (2) дозе) Lyophilisate for oral solution (1 (2) dose(s) in serum vials)	Состав (на 1 (2) дозу): действующее вещество: иммунные глобулины молозива коров, содержащие антитела к <i>Escherichia coli</i> серогрупп 026, 025, 0111, 0119, <i>Proteus vulgaris</i> серогруппы 043 и <i>P. mirabilis</i> серогруппы 035 — 0,5 (1,0) г; вспомогательные вещества: отсутствуют Composition (for 1 (2) dose(s)): active substance: bovine colostrum immunoglobulins containing antibodies to <i>Escherichia coli</i> serogroups 026, 025, 0111, 0119, <i>Proteus vulgaris</i> serogroup 043 and <i>P. mirabilis</i> serogroup 035—0.5 (1.0) g; excipients: none	ФБУН «РостовНИИМП» Роспотребнадзора (Россия) Federal State Budgetary Institution “Rostov Research Centre of Microbiology and Parasitology” of Rosпотребнадзор (Russia)	При температуре от 2 до 10 °C At 2 °C to 10 °C

² Там же.

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Наименование препарата Name	Лекарственная форма Dosage form	Состав Composition	Производитель Manufacturer	Условия хранения Storage conditions
Иммуноро Кедрион (глобулин) Immunorho Kedrion (globulin)	Лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения (во флаконах) Lyophilisate for solution for intramuscular injection (vials)	Состав (на 1 мл восстановленного препарата): действующее вещество: белки человеческой плазмы, содержащие не менее 90% ИГ (25–180 мг), в том числе ИГ человека антирезус (Rho(D) — 150 мг (750 МЕ); вспомогательные вещества: глицин — 22,5 мг, натрия хлорид — 9,0 мг Composition (per 1 mL of the reconstituted product): active substance: human plasma proteins containing at least 90% Ig (25–180 mg), including Immunoglobulin human antirhesus (Rho (D)—150 mg (750 IU); excipients: glycine—22.5 mg, sodium chloride—9.0 mg	«Кедрион С.п.А.» (Италия) Kedrion, S.p.a. (Italy)	При температуре не выше 25 °C At a temperature not exceeding 25 °C
Иммуновенин (глобулин) Immunovenin (globulin)	Лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (во флаконах) Lyophilisate for solution for infusions (vials)	Состав (на 25 мл восстановленного препарата): действующее вещество: ИГ человека класса G — 1,25 г (750 МЕ); вспомогательные вещества: мальтоза моногидрат — 0,35 г, декстроза моногидрат — 0,35 г, глицин — 0,2 г Composition (per 25 mL of the reconstituted product): active substance: human IgG—1.25 g (750 IU); excipients: maltose monohydrate—0.35 g, dextrose monohydrate—0.35 g, glycine—0.2 g	«НПО «Микроген» (Россия) JSC «NPO Microgen» (Russia)	При температуре от 2 до 8 °C At 2 °C to 8 °C
Габриглобин (глобулин) Gabriglobin (globulin)	Лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (во флаконах по 2,5 г вместимостью 100 мл) Lyophilisate for solution for infusions (2.5 g in a 100 mL vial)	Состав: действующее вещество: ИГ человека класса G; вспомогательные вещества: мальтоза Composition: active substance: human IgG; excipients: maltose	ГУЗ «Ивановская областная станция переливания крови» (Россия) National Healthcare Institution "Ivanovo Regional Blood Transfusion Station" (Russia)	При температуре от 2 до 10 °C At 2 °C to 10 °C
Антилимфолин (иммунодепрессивное средство — глобулин) Antilimfolin (immunosuppressive agent — globulin)	Лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (в ампулах) Lyophilisate for solution for infusions (ampoules)	Состав (на 1 ампулу): действующее вещество: ИГ антиtimoцитарный (кроличий) класса G — 50 или 100 мг; вспомогательные вещества: глицин — 2,25% Composition (per 1 ampoule): active substance: (rabbit) anti-thymocyte globulin class G—50 or 100 mg; excipients: glycine—2.25%	«Российский геронтологический научно-клинический центр» (Россия) Russian Clinical and Research Center of Gerontology (Russia)	При температуре от 5 до 15 °C At 5 °C to 15 °C
Тимоглобулин (иммунодепрессивное средство — глобулин) Thymoglobulin (immunosuppressive agent — globulin)	Лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (во флаконах по 135 мг вместимостью 10 мл) Lyophilisate for solution for infusions (135 mg in a 10 mL vial)	Состав (на 1 флакон): ИГ антиtimoцитарный (кроличий) класса G — 25 мг; вспомогательные вещества: глицин — 50 мг; натрия хлорид — 10 мг; маннитол — 50 мг Composition (per 1 vial): (rabbit) anti-thymocyte globulin class G—25 mg; excipients: glycine—50 mg; sodium chloride—10 mg; mannitol—50 mg	«Джензайм Ирландия Лимитед» (Ирландия) Genzyme Ireland Limited (Ireland)	При температуре от 2 до 8 °C At 2 °C to 8 °C

Примечание. ИГ — иммуноглобулины.
Note. Ig—immunoglobulins.

Для предотвращения этого рабочее давление регулировали снижением мощности теплоподвода [22].

Оптимизированная технология лиофилизации препарата Иммуновенин® предусматривала его предварительное замораживание до температуры минус 40 °С с выдерживанием при данной температуре в течение 10 ч и последующую лиофилизацию в установке ТГ-50 (ГДР) в течение (85±7) ч [23]. Температуру греющих плит в течение 10 ч поднимали до 10 °С, выдерживали при данной температуре в течение 45 ч, далее температуру поднимали до 25 °С и оставляли ее неизменной до окончания сушки. Температура препарата от начала процесса к 55 ч повышалась от минус 40 до минус 25 °С, далее к 65 ч — до 20 °С, к 75 ч — до 25 °С, после чего препарат выдерживали при данной температуре 10 ч. Вакуум в камере поддерживали на уровне 10–15 Па. Кроме того, исследователями показано, что сушка протекает дольше всего во флаконах, расположенных в центре полок установки.

Технологические особенности получения твердой формы комплексного иммуноглобулинового препарата для парентерального применения

А.В. Мелиховой был выделен ряд недостатков иммуноглобулинового комплексного препарата для энтерального применения (КИП) и технологии его приготовления³.

1. Выпускается в единственной лекарственной форме в виде сухой субстанции в стеклянных флаконах. Отмечено, что более перспективной лекарственной формой являются таблетки и капсулы, которые имеют ряд преимуществ: удобство применения, хранения и транспортировки; маскировка специфического вкуса сывороточных белков; возможность защиты от действия неблагоприятных факторов желудочно-кишечного тракта.

2. Сублимационное обезвоживание препарата в стеклянных флаконах чрезмерно продолжительно (до 2 сут) и не предусматривает возможности получения сухой субстанции КИП в количествах, необходимых для производства твердых дозированных форм (таблетки, капсулы)⁴.

Устранению названных недостатков был посвящен комплекс работ, проводимых в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора и обобщенных в диссертации А.В. Мелиховой⁵. Один из этапов исследований был посвящен изучению влияния стабилизаторов на физико-химические и биологические свойства КИП при сублимационном обезвоживании. КИП с концентрацией белка 5–6% стабилизировали введением защитных веществ в количестве 1–2% и корректировали значение pH до 7,0. В качестве защитных веществ были использованы: сахароза в конечной концентрации 2%, мальтоза — 2%, смесь: глицин — 1% и глюкоза — 2%. Раствор разливали во флаконы по 5 мл (высота слоя 12 мм) или в поддоны (лотки) из нержавеющей стали (высота слоя 7–15 мм) и помещали в сублиматор на замораживающую плиту или в морозильник при температуре минус 45–50 °С. После полного замораживания осуществляли процесс высушивания в установке LZ-9.2 Frigera (Чехия). Было установлено, что наиболее эффективным оказалось использование мальтозы (2%) и смеси глюкозы (2%) с глицином (1%)⁶. Показатель "Потеря в массе при высушивании" (ПМВ) во всех препаратах составлял

около 4%. Время растворения препаратов в воде не превышало 45 с. Также были апробированы 3 варианта лиофилизации со следующими параметрами (по вариантам от 1 до 3): начальная температура конденсатора — минус 70, минус 65, минус 65 °С; начальная температура полок сублиматора — минус 40, минус 45, минус 45 °С; начальная температура материала — минус 25, минус 45, минус 45 °С; максимальная температура полок — 55, 50, 35 °С. Длительность процесса составляла (по вариантам) — 14, 24 и 36 ч соответственно. Выявлена применимость всех трех вариантов, при этом показано, что повышение температуры греющей поверхности полки до 55 °С на этапе сублимации влаги не оказывало негативного влияния на специфические свойства ИГ, но существенно снижало время проведения процесса [23–25]. Применимость ускоренного варианта сушки была подтверждена результатами хранения сухого препарата в течение 6 месяцев при температуре 4±2 °С [26].

Следующей решенной задачей была разработка технологии твердых дозированных форм КИП (таблеток и капсул). Первоначально были подобраны условия проведения процесса помола лиофилизата полуфабриката в электромагнитном измельчителе, позволившие получить порошок КИП насыпной плотностью 0,40–0,44 г/см. Данный показатель был оптимален для сохранения биологической активности [27]. Подобранные наполнители для изготовления таблеточной смеси: молотый порошок КИП — 41–43%; сахарный гранулят — 55–57%; стеарат кальция — 1%; тальк — 1%. В результате отработки режимов прессования на однопуансонном прессе РТ-1 (МСЗ, г. Мариуполь) с диаметром пуансона 12 мм выявлена оптимальная производительность пресса, которая составила 4500 таблеток/ч. При данном режиме такие свойства таблеток, как масса, прочность на истирание и растворимость, соответствовали нормируемым требованиям при сохранении биологической активности [28]. Также были приготовлены экспериментальные препараты ИГ в желатиновых капсулах № 1. При этом выявлено, что по окончании срока годности, при содержании их в стеклянных вторичных упаковках, закрытых полимерными пробками, при 4±2 °С, ИГ соответствовали всем требованиям нормативной документации.

Технологические особенности получения твердой формы различных иммуноглобулиновых препаратов

Следующим этапом наших исследований был анализ данных патентной и научной литературы, посвященной вопросам получения твердых лекарственных форм препаратов ИГ природы.

Имеются сведения о разработке еще в конце 1970-х гг. лиофилизированного гамма-глобулина для внутривенного введения. Коммерческий 15% (w/v) раствор гамма-глобулина для внутримышечных инъекций, имеющего титр противокоревых антител 77 МЕ/100 мг и антикомплемментарную активность 69 (CH50), подвергали кислотной обработке диализом против 0,10 М глицинового буферного раствора (pH 3,1) в течение 48 ч. Обработанный таким образом раствор нейтрализовали диализом против 0,05 М фосфатного буферного раствора (pH 7,0) в течение 24 ч. Компоненты среды высушивания добавляли таким образом, чтобы конечный раствор содержал 0,20 мас.ч. человеческого сывороточного альбумина, 0,10 мас.ч. хлорида натрия и 0,40 мас.ч. маннита на 1 мас.ч. гамма-глобулина.

³ Мелихова АВ. Разработка технологии приготовления сухих дозированных форм комплексного иммуноглобулинового препарата: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: 2010.

⁴ Там же.

⁵ Там же.

⁶ Там же.

Полученный раствор доводили до pH 6,5 с помощью 0,025 М ацетатного буферного раствора, подвергали стерилизующей фильтрации и лиофилизации. Препарат до сушки и после нее имел следующие характеристики: антикомплемментарная активность 12 (CH50) и титр противокоревых антител 7 МЕ/100 мг. Эти значения остаются неизменными через 24 мес. [21].

Иранскими учеными констатировалось, что стабильность препаратов Анти-Rh D IgG в виде раствора низкая, со сроком годности 1 год и менее. Авторами исследования была поставлена задача получить лиофилизат и установить оптимальный состав среды высушивания [29]. Препарат в количестве 1 мл, разлитый в ампулы, замораживали при температуре минус 20 °C в течение 1–3 ч и подвергали сушке в аппарате Labconco (США) при температуре конденсатора минус 52 °C и вакууме 0,041 мбар. Среди более чем 20 различных составов сред высушивания наиболее стабильным был следующий: анти-Rh D IgG 5 мг/мл, твин 80 0,1%, глицин 0,15 М, маннитол 7% и сахараза 60 мМ в натриево-калиевом фосфатном буфере 25 мМ, pH 7,5. Результат биологического теста показал, что биоактивность препарата более чем на 93% превышает требования, установленные британской фармакопеей. Показатель ПМВ составлял менее 3%. Авторами был сделан вывод, что полученный препарат может быть кандидатом для получения анти-Rh D IgG в лиофилизированной форме.

В патенте США 2005 г. описана стабилизирующая композиция для IgG, полученного фракционированием плазмы крови человека, в жидкой и в лиофилизированной формах: маннит, глицин и Твин 80 с концентрациями 32, 7 г/л и 50 ppm соответственно [30]. Авторы утверждают, что композиция IgG в лиофилизированной форме содержит долю полимера примерно в 10 раз меньшую, чем допустимое количество, после хранения в течение 12 мес. при комнатной температуре или в течение 6 мес. при 40 °C.

В международном патенте на изобретение 2002 г. описан состав лиофилизата, содержащего 5–25 мМ гистидинового буфера, pH от 5,5 до 6,5, 0,005–0,03% полисорбата, 100–300 мМ сахарозы и более 50 мг/мл IgG, содержащего антитела к рецептору интерлейкина-2. Лيوфилизат восстанавливался жидкостью менее 2 мин и был пригоден для подкожного применения [31]. Для препарата, разлитого в 5 мл флаконы в количестве 2 мл, предложен следующий режим лиофилизации: замораживание до минус 40 °C со скоростью процесса 2 °C/мин и выдерживанием при данной температуре в течение 3 ч; первичная сушка при вакууме 150 мТорр и температуре минус 20 °C со скоростью повышения температуры от минус 40 до минус 20 °C, равной 1 °C/мин, время процесса 12 ч; вторичная сушка при вакууме 150 мТорр и температуре 20 °C со скоростью повышения температуры от минус 20 до 20 °C, равной 1 °C/мин, время процесса 10 ч. В дальнейшем этот препарат выпускался под торговой маркой Daclizumab. В этом же патенте раскрыт биофармацевтический состав препарата Synagis® для внутримышечного применения (гуманизированное моноклональное IgG1-антитело, полученное по технологии рекомбинантной ДНК и представляющее собой слияние последовательностей антител человека (95%) и мыши (5%)). Препарат содержит следующие вспомогательные вещества: 47 мМ гистидина, 3,0 мМ глицина и 5,6% маннита, а также активный ингредиент — антитело IgG1 в концентрации 100 мг на флакон.

Японскими исследователями запатентован препарат в форме лиофилизата для профилактики вирусных гепатитов типа В следующего состава: 10% (w/v) очищенного анти-HBs глобулина, 5% (w/v) нейтральной аминокислоты (предпочтительно аминокислоты), 2% (w/v) хлорида натрия, полимерный неионный поверхностно-активный агент (предпочтительно

полиоксизтилен-полиоксипропиленовый сополимер), pH смеси 5,0–7,5. Авторы декларируют, что полученный лиофилизат может храниться более 5 лет при температуре менее 10 °C без снижения титра антител [32].

В патенте на изобретение США 1986 г. [33] раскрыт способ получения лиофилизата препарата глобулина — фибронектина, применяемого для лечения септического шока и инфекционных заболеваний на основе усиления опсонической активности фагоцитов. Авторы констатировали, что препарат в жидкой форме обладает низкой стабильностью при хранении. Попытки получения сухой формы препарата при применении нейтральной аминокислоты, моносахарида, дисахарида в качестве стабилизатора привели к плохой растворимости препарата и образованию волокнистых нерастворимых веществ. Было выявлено, что добавление альбумина к вышеперечисленным веществам устраняет указанные недостатки. Предложена методика получения лиофилизата фибронектина, которая заключалась в следующем. К раствору препарата добавляли 5% (w/v) сахарозы и 0,25% (w/v) альбумина, доводили концентрацию фибронектина до 20 мг/мл, разливали по 2 мл во флаконы вместимостью 10 мл и лиофилизировали при таком режиме сушки, чтобы температура препарата в конце процесса достигла 30 °C. ПМВ составила 0,2%. Лيوфилизированный препарат при добавлении 2 мл воды для инъекций растворялся почти мгновенно, представляя собой бесцветный прозрачный раствор. Специфические характеристики соответствовали значениям, определенным до лиофилизации. Следует отметить, что американскими учеными еще в 1976 г. показана эффективность применения человеческого альбумина для стабилизации свойств фактора VIII крови при его лиофилизации [34].

В международном патенте на изобретение 1989 г. [35] раскрыт состав и способ получения лиофилизированной композиции, содержащей моноклональное антитело или фрагменты антител, такие как ИГ класса G (IgG), буферный раствор и мальтозу, предназначенной для парентерального введения. Показано, что препарат сохраняет биологическую активность и сводит к минимуму образование осажженных или агрегированных частиц при восстановлении сублимированного продукта. Авторами приведен пример получения лиофилизата IgG. Для обессоливания IgG на хроматографическую колонку объемом 3,3 л, предварительно упакованную Sephadex G-25 и уравновешенную раствором 10 мМ ацетата натрия (pH 4,5), содержащим 10% мальтозы, со скоростью потока 550 мл/ч наносили 500 мл IgG в концентрации 11,54 мг/мл (всего 5,693 г). Фракцию, соответствующую пику белка, собирали и концентрировали до 10 мг/мл. Флаконы вместимостью 20 мл заполняли 10 мл препарата, помещали в сублимационный аппарат и замораживали до минус 45 °C. Далее температура поверхности полки регулировалась в диапазоне от минус 40 до минус 42 °C, а давление снижалось до 50 мТорр для начала этапа первичной сушки. При завершении данного этапа температура поверхности полки повышалась до 20 °C. Этап вторичной сушки протекал около 8 ч. При достижении температуры препарата 20 °C камера установки наполнялась сухим азотом и флаконы закупоривались.

Учеными из университета Пёрдью (США) выявлено, что быстрое охлаждение ИГ (путем закалки в жидком азоте) приводит к большему количеству и более крупным агрегатам, чем медленное охлаждение на полке сублимационной сушилки. Также выявлено, что процедура отжига (при которой препарат замораживают до нужной температуры, далее нагревают до определенной температуры, выдерживают при ней и снова охлаждают до требуемой температуры) быстроохлажденных растворов приводит к значительно меньшей агрегации

в восстановленных лиофилизатах [36]. Следует отметить, что процедура отжига успешно была применена и нами в процессе сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины [37].

Исследования, проведенные С.Л. Шарыгиным⁷, позволили создать противостолбнячный ИГВВ в лиофилизированной форме, пригодной для длительного хранения (до 3 лет). Противостолбнячный ИГВВ разливали по 25 мл во флаконы вместимостью 50 мл или по 50 мл во флаконы на 100 мл, замораживали в спиртовой ванне охлаждающего устройства сублимационного аппарата при температуре спирта не выше минус 40 °С в течение 30 мин. Замороженный раствор выдерживали при температуре не выше минус 40 °С не менее 12 ч. Сублимационную сушку производили на аппарате КС-30. В качестве стабилизаторов, препятствующих денатурации ИГ в процессе сушки, препараты содержали гликокол 0,5±0,2 г/л и глюкозу 1,0±0,2 г/л. Процесс длится в течение 26±2 ч, температура ИГ в ходе процесса не превышает 38 °С. Сублимационно высушенный препарат обладал высокой специфической активностью — содержание столбнячного антитоксина соответствовало уровню в исходном жидком ИГ. Показатель ПМВ составлял 0,95±0,29%, время восстановления не превышало 3 мин⁸.

Технологические особенности получения сухой формы антирабического иммуноглобулина

В 90-х годах прошлого столетия была разработана лиофилизированная форма антирабического ИГ, полученного из человеческой плазмы крови [38]. Однако авторами изобретения не раскрыты технологические особенности приготовления препарата. Между тем констатируется, что сухой препарат антирабического ИГ выпускается в запаянных ампулах и представляет собой таблетку или порошок кремоватого цвета, который хранится при 18–22 °С и не требует специальных условий при транспортировке в очаги эпизоотий, не подвергается фрагментации в процессе хранения, безвреден для организма и пригоден для внутримышечного введения [39].

Коллективом ученых ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора была решена задача по разработке экспериментально-производственных технологий получения новых лекарственных форм лиофилизированных противовирусных лекарственных препаратов на модели коммерческого антирабического ИГ и варианта на основе F(ab')₂-фрагментов. Результаты, представленные далее, изложены в диссертации Е.Г. Абрамовой⁹ и ряде статей [38, 40–42].

Были отработаны оптимальные режимы лиофильного высушивания антирабического ИГ (содержание белка 9–11%) и его F(ab')₂-фрагментов (содержание белка 9–11%), обеспечивающих максимальное сохранение качественных показателей. Для проведения качественной лиофилизации первоначально были исследованы тепловые параметры раствора антирабического ИГ и определена температура эвтектики препарата с различными комбинациями стабилизаторов: глицина, мальтозы, сахарозы. Показано, что глицин в концентрации 2,25±0,25% является оптимальным лиопротектором. Исследование

температуры эвтектики показало, что для раствора ИГ со стабилизатором глицином данный параметр соответствует значению минус 36 °С. Лиофилизацию антирабического ИГ в дозировке 5 мл в стеклянных флаконах объемом 10 мл проводили на установке Power Dry PL9000-50/HSC (Дания). Выявлены основные оптимальные параметры сублимационного высушивания препарата: вакуум — 7±3 Па; температура замораживания — минус 38±1 °С; скорость замораживания — 7,6 °С/ч; продолжительность замораживания — 8±1 ч; температура полок с продуктом — 30±1 °С; скорость повышения температуры при сублимации — 1,56±0,59 °С/ч¹⁰. Кроме того, время сублимации — 18±1 ч; конечная температура материала при десорбции — 25±1 °С; продолжительность второй суши — 10±1 ч; длительность процесса — 28±1 ч. Изучение этапа десорбции ИГ выявило оптимальное значение показателя ПМВ — от 1 до 2%, при этом значении была зафиксирована хорошая растворимость¹¹. Также показана неизменность значения показателя специфической активности. Были получены 3 экспериментально-производственные серии лиофилизированного антирабического ИГ, изучение биологических и физико-химических показателей которых выявило их соответствие требованиям нормативной документации, что подтверждает эффективность предложенной технологии. В долгосрочных испытаниях показано, что гетерологичный антирабический ИГ в новой лекарственной форме — лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения сохраняет качественные показатели в течение 3 лет, что вдвое превышает срок годности препарата в жидкой лекарственной форме. Изучение ИГ против бешенства в жидком виде по окончании 36 месяцев выявило от 3,0 до 3,3% фракций фрагментов. Для лиофилизата регистрировали 100% фракцию мономеров и димеров, что демонстрирует преимущество лиофилизатов ИГ при длительном хранении по сравнению с препаратом в жидкой лекарственной форме.

При лиофилизации F(ab')₂-фрагментов антирабического ИГ в дозировке 1 мл в стеклянных флаконах объемом 3 мл определено, что процесс целесообразно осуществлять при следующих значениях технологических параметров¹²: вакуум — 7±3 Па; температура замораживания — минус 38±1 °С; скорость замораживания — 7,6 °С/ч; продолжительность замораживания — 6±1 ч; температура полок с продуктом — 30±1 °С; скорость повышения температуры при сублимации — 4,1±0,1 °С/ч; время сублимации — 12±1 ч; конечная температура материала при десорбции — 18±1 °С; время десорбции — 4±1 ч; общее время суши — 28±1 ч. Леофилизированные F(ab')₂-фрагменты представляли собой хорошо сформированную таблетку белого цвета с однородной мелкопористой структурой. Результаты изучения физико-химических и биологических свойств лиофилизатов подтвердили эффективность предложенных биотехнологических приемов по сублимационному высушиванию расщепленного очищенного ИГ.

Также были проведены эксперименты по лиофилизации антирабического ИГ в дозировке 1 мл во флаконах объемом 3 мл. Данная дозировка оптимальна при изготовлении стандартного образца предприятия специфической активности¹³.

⁷ Шарыгин С.Л. Препараты внутривенных иммуноглобулинов из донорской плазмы для терапии бактериальных и вирусных инфекций (получение и клиническое применение): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб.: 1997.

⁸ Там же.

⁹ Абрамова Е.Г. Совершенствование биотехнологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Оболensk; 2018.

¹⁰ Там же.

¹¹ Там же.

¹² Там же.

¹³ Там же.

Он необходим при проведении внутрипроизводственных и внешних контрольных исследований для обеспечения единства требований к качеству препаратов для постэкспозиционной профилактики бешенства при оценке показателя «Специфическая активность»¹⁴. Для высушивания была задействована лиофильная установка Epsilon 2-6D (Martin Christ, Германия). Процесс проводили в соответствии со следующими значениями технологических параметров: вакуум — 7 ± 3 Па; температура замораживания — минус 38 ± 1 °C; скорость замораживания — $6,5 \pm 0,1$ °C/ч; продолжительность замораживания — 2 ± 1 ч; температура полок с продуктом — 30 ± 1 °C; скорость повышения температуры при сублимации — $3,0 \pm 0,5$ °C/ч; время сублимации — 8 ± 1 ч; конечная температура материала при вторичной сушке — 25 ± 1 °C; длительность вторичной сушки — 2 ± 1 ч; итоговая продолжительность процесса — 11 ± 1 ч. Лيوфилизат представлял собой хорошо сформированную таблетку белого цвета. Значение показателя ПМВ составило $(1,09 \pm 0,03)\%$, обеспечив хорошую растворимость препарата в течение $(1,0 \pm 0,2)$ мин. Специфическая активность лиофилизированных образцов в тесте *in vivo*, откалиброванного против международного стандарта, превышала 150 МЕ/мл, что соответствует предъявляемым требованиям.

Технологические особенности получения сухой формы противосибиреязвенного иммуноглобулина

Коллективом ученых [43, 44] проведены исследования по разработке сухой формы полуфабриката сибиреязвенного гетерологичного ИГ из сыворотки крови лошади.

Предпосылкой для проведения исследовательских работ послужил тот факт, что жидкий полуфабрикат ИГ имеет ограниченный срок годности (1 мес.) до его переработки. Одним из путей решения данной проблемы являлось получение сухой формы полуфабриката ИГ, что позволило увеличить время его хранения до переработки и создать резерв полуфабриката ИГ. Для решения этой проблемы была разработана технология и среда высушивания полуфабриката ИГ.

Разведенный до концентрации белка 8,5–9,5% с применением в качестве стабилизаторов, препятствующих денатурации белка в процессе сушки, сахарозы и полиглюкина в количестве 7,5 и 1,5% соответственно, полуфабрикат противосибиреязвенного ИГ разливали в кюветы вместимостью 300 мл с таким расчетом, чтобы толщина высушиваемого слоя составляла 8–10 мм, и замораживали в охлаждающем устройстве сублимационного аппарата ТГ-16.50 (ГДР) [43, 44]. Сублимационную сушку вели в соответствии со следующими технологическими параметрами: вакуум — $3,3 \pm 0,2$ Па; температура замораживания — минус 40 ± 5 °C; продолжительность замораживания — 8 ± 2 ч; время сублимации до температуры вторичной сушки — 26 ± 2 ч; окончательная температура продукта при вторичной сушке — 37 ± 2 °C; продолжительность вторичной сушки — 6 ± 1 ч. Значение показателя ПМВ составляло $2 \pm 1\%$. Сухой полуфабрикат ИГ растворяли апиrogenной водой до исходного содержания белка. Растворы имели небольшую опалесценцию и слегка желтую окраску. Время растворения не превышало 2 мин. ИГ, приготовленный из сухого полуфабриката, по показателям качества удовлетворял нормативным требованиям. При этом в образцах препарата отсутствовал остаточный спирт, используемый в технологии выделения ИГ. Жидкий противосибиреязвенный ИГ, приготовленный из сухого полуфабриката после 12 месяцев его хранения, соответствовал требованиям нормативной документации. Также не наблюдалось снижения характеристик препарата через 2 года (установленный срок хранения).

¹⁴ Там же.

Продолжением этих исследований была разработка готовой лекарственной формы лيوфилизата противосибиреязвенного гетерологичного ИГ. Результаты изложены в патенте на изобретение Российской Федерации [45].

Для получения глобулина противосибиреязвенного лошадиного сухого к стерильному 10–11% раствору (по содержанию белка) иммуноактивных гамма- и бета-глобулиновых фракций, выделенных из белков сыворотки крови лошадей, иммунизированных вакцинным штаммом сибиреязвенного микроба СТИ-1, авирулентным штаммом Ихтиман и сибиреязвенным токсином, дополнительно вводили стерильные растворы полиглюкина — 0,5–1,5% и сахарозы — 7,0–7,5%. Внесение ингредиентов проводили при контроле содержания белка, значение которого должно находиться в пределах 8–10%. Конечная концентрация ингредиентов в смеси могла варьировать от 0,5 до 1,5% для полиглюкина и от 7,0 до 7,5% для сахарозы. Полученный препарат разливали по 5 мл в ампулы вместимостью 10 мл и замораживали в камере сушильного аппарата ТГ-16.50 (ГДР) при температуре минус 40 ± 5 °C в течение 4 ± 1 ч. Высушивание вели 30 ± 2 ч до температуры препарата 25 ± 2 °C [45]. Предложенные решения дали основания увеличить срок хранения готовой лекарственной формы глобулина противосибиреязвенного и обеспечить его резерв, необходимый для использования при возникновении вспышек сибиреязвенной инфекции у людей.

Далее были оптимизированы процессы получения сухой формы ИГ противосибиреязвенного [46]. При вертикальном расположении ампул площадь испарения жидкости для сублимации была недостаточной. Для увеличения площади испарения при высушивании препарата была изготовлена специальная оснастка, которая представляет собой кассеты для установки ампул ШП-10 таким образом, чтобы угол наклона ампул к плоскости кассеты составлял 10–15 градусов. Это позволило в 4 раза увеличить площадь поверхности, с которой происходит испарение влаги. Загрузка сублиматора составила 720 ампул [46]. Данный прием позволил уменьшить время проведения процесса, характеристики которого составили: вакуум — 30 ± 2 Па; температура замораживания — минус 40 ± 5 °C; продолжительность замораживания — 5 ± 1 ч; время сублимации до температуры десорбции — 15 ± 2 ч; конечная температура материала при десорбции — 35 ± 2 °C; время десорбции — 6 ± 1 ч. Образцы сухого противосибиреязвенного ИГ по своим биологическим и физико-химическим свойствам не отличались от жидкого ИГ. Сухой препарат представлял собой пористую массу белого цвета в виде скошенного столбика и имел остаточную влажность менее 5%. При добавлении к нему 5 мл 0,9% раствора хлорида натрия препарат растворялся с образованием гомогенной взвеси без посторонних примесей, комков и хлопьев. В ходе исследований по определению фракционного состава жидких и сухих препаратов выявлено отсутствие фрагментов, а основная часть агрегатов соответствовала фракции димеров (до 5%). Содержание полимерной фракции составляло в среднем 3%, мономеров — 91–94%. В процессе хранения при температуре 6 ± 4 °C в жидком препарате было выявлено увеличение фракции димеров (до 12%) и снижение фракции мономеров (до 85%), что отсутствовало в сухой форме препарата [46].

Также в научно-исследовательском институте микробиологии Министерства обороны Российской Федерации получили стерильные жидкие или сухие специфически активные $F(ab')_2$ -фрагменты противосибиреязвенных антител, содержащие 35 ± 5 мг/мл белка и не менее 96% $F(ab')_2$ -фрагментов антител, выделенных из ИГ противосибиреязвенного лошадиного

жидкого [47]. Висушивание препарата проводили на сублимационных установках (МАСС-25, МАСС-5, УЛЛ-1,0 и др.) при температуре материала минус 35–45 °С, при градиенте не более 3 °С/ч, досушивание материала вели при температуре 30±1 °С в течение 5±1 ч. Состав среды досушивания — концентрация сахарозы 7,0±0,1%, концентрация полиглюкина 1,0±0,1% [48].

Следует отметить, что среди вспомогательных веществ, используемых при лиофилизации ИГ препаратов, преобладают аминокислоты (глицин, гистидин), моносахариды (декстроза, глюкоза), дисахариды (мальтоза, сахароза), сахарные спирты (маннитол), декстраны (полиглюкин), полисорбаты (твин 80), человеческий сывороточный альбумин или их комбинации. Следует отметить, что схожий перечень вспомогательных веществ выявлен нами при обзоре литературы, посвященной лиофилизации живых вакцин [48].

Препараты иммуноглобулинов в форме суппозитория (свечи)

Суппозитории (свечи) не относятся к твердым лекарственным формам. Однако мы посчитали целесообразным дать сведения об имеющихся научных разработках приготовления этой формы ИГ препаратов. Так, имеются сведения о разработке свечевой формы препарата ИГ человека к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов [16]. Состав компонентов на 1 свечу был следующий: ИГ человека со специфическими антителами к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов лиофилизированный — 80 мг, гиалуроновая кислота (иммуностимулятор) — 0,005 г, гентамицина сульфат — не более 2 мкг, наполнители: кондитерский жир — до 75%, парафины нефтяные твердые — 7,5%, эмульгатор Т-2 — 7,5%. Следует отметить, что, по утверждению авторов, анализ всех стадий технологического процесса показал, что процесс лиофилизации как наиболее критичный не влиял на уровень вируснейтрализующих антител в препаратах [49]. Величина уровня вируснейтрализующих антител в свечевой форме препарата соответствовала определенному до приготовления готовой лекарственной формы. Значимых изменений также не происходило во время хранения. Препараты были нетоксичными, апиrogenными и стерильными.

Кроме того, в патенте на изобретение Российской Федерации [50] представлены данные о получении многокомпонентного ИГ препарата (содержащего ИГ трех основных классов: IgG, IgA, IgM) в форме суппозитория и таблеток. Состав таблетки (600 мг): лиофилизированный ИГ препарат — 150 мг, стеарат кальция — 6 мг, тальк — 6 мг, сахарный гранулят — 438 мг. Состав суппозитория: ИГ препарат в виде влажной пасты — 15 мас.%, эмульгатор — 10 мас.%, целевые добавки — 75 мас.%.

Выводы

Итоги проведенного обзора отечественной и зарубежной литературы, посвященного вопросам получения твердых лекарственных форм препаратов иммуноглобулиновой природы, а также результаты собственных исследований по этому вопросу дают основания сделать следующие выводы.

1. По результатам анализа Государственного реестра лекарственных средств выявлено:

- доля твердых лекарственных форм среди препаратов ИГ природы составляет 13%;
- основной формой твердых лекарственных форм препаратов ИГ природы являются лиофилизаты. Из зарегистрированных на территории России на их долю приходится 100%;

- практически все твердые лекарственные формы ИГ производятся как лиофилизаты во флаконах.

2. Выявлен спектр вспомогательных веществ, используемых при лиофилизации ИГ препаратов: аминокислоты (глицин, гистидин), моносахариды (декстроза, глюкоза), дисахариды (мальтоза, сахароза), сахарные спирты (маннитол), декстраны (полиглюкин), полисорбаты (твин 80), человеческий сывороточный альбумин или их комбинации.

3. Показано, что для приготовления таблеток нашли свое применение антифрикционные вещества (стеарат кальция, тальк), наполнители (сахарный гранулят).

4. На ряде примеров подтверждено, что получение ИГ препаратов в твердой форме предотвращает агрегацию и фрагментацию белков в процессе хранения, негативно влияющих на специфическую активность препарата, а также способствует более длительному сохранению целевых свойств в сравнении с жидкими препаратами.

Вклад авторов. **Е. Г. Абрамова** — сбор, анализ и систематизация информации, изложенной в научной литературе, написание и редактирование текста рукописи; **А. В. Комиссаров** — сбор, анализ и систематизация информации, изложенной в научной литературе, написание и редактирование текста рукописи; **Н. В. Сеницына** — сбор информации, изложенной в научной литературе; **И. М. Жулидов** — сбор информации, изложенной в научной литературе; **А. К. Никифоров** — формирование концепции статьи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. **Elena G. Abramova**—collection, analysis and systematisation of information presented in scientific literature, writing and editing of the text; **Aleksandr V. Komissarov**—collection, analysis and systematisation of information presented in scientific literature, writing and editing of the text; **Natalya V. Sinitsyna**—collection of information presented in scientific literature; **Ivan M. Zhulidov**—collection of information presented in scientific literature; **Aleksey K. Nikiforov**—elaboration of the concept of the study, final approval of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках НИР 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (номер государственной регистрации АААА-А21-121012090066-4).

Acknowledgements. The study was carried out as part of research project 89-2-21 "Theoretical and applied aspects of production and improvement of drugs for immunoprophylaxis and diagnosis of dangerous bacterial and viral infections" (state registration number АААА-А21-121012090066-4).

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

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

Литература/References

1. Супотницкий МВ, Елапов АА, Борисевич ИВ, Кудашева ЭЮ, Климов ВИ, Лебединская ЕВ и др. Препараты, полученные из крови человека и животных, в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2015;15(3):33–48. [Supotnitskiy MV, Elapov AA, Borisevich IV, Kudasheva EYu, Klimov VI, Lebedinskaya EV, et al. Blood preparations of humans and animals in terms of their quality, efficacy and safety. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2015;15(3):33–48 (In Russ.)]

2. Joubert MK, Luo Q, Nashed-Samuel Y, Wypych J, Narhi LO. Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates. *J Biol Chem*. 2011;286(28):25118–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160457>
3. Siew A. Freeze drying protein formulations. *Pharmaceutical Technology*. 2014;38(5):20.
4. Borchert SJ, Ryan MM, Davison RL, Speed W. Accelerated extractable studies of borosilicate glass containers. *J Parenter Sci Technol*. 1989;43(2):67–79.
5. Franks F. Scientific and technological aspects of aqueous glasses. *Biophys Chem*. 2003;105(2-3):251–61. [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(03\)00074-7](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(03)00074-7)
6. Wang Y, Chien Y. Sterile pharmaceutical packaging: compatibility and stability. In: *Technical Report No. 5. Parental Drug Association, Inc*; 1984. P. 107–25.
7. Змачинская ТБ, Анастасиев ВВ. Оптимизация технологической схемы получения препаратов иммуноглобулинов для внутримышечного введения. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. 2001;1:70–3. [Zmachinskaya TB, Anastasiev VV. Optimization of the technological scheme for obtaining preparations of immunoglobulins for intramuscular administration. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta imeni N.I. Lobachevskogo = Vestnik of Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod*. 2001;1:70–3 (In Russ.)]
8. Короткова ТВ, Анастасиев ВВ. Влияние различных факторов на содержание димеров в препарате иммуноглобулинов. *Вакцинология 2006: Материалы Всероссийской научно-практической конференции*. М.; 2006. С. 52. [Korotkova TV, Anastasiev VV. Influence of various factors on the content of dimers in immunoglobulin drugs. *Vaccinology 2006: Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference*. Moscow; 2006. P. 52 (In Russ.)]
9. Braun A, Kwee L, Labow MA, Alsenz J. Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN- α) in normal and transgenic mice. *Pharm Res*. 1997;14(10):1472–8. <https://doi.org/10.1023/a:1012193326789>
10. Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*. 2002;416:507–11. <https://doi.org/10.1038/416507a>
11. Demeule B, Gurny R, Arvinte T. Where disease pathogenesis meets protein formulation: Renal deposition of immunoglobulin aggregates. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;62(2):121–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.08.008>
12. Lin L-FH, Bunnell R. Overcoming challenges in the reconstitution of a high-concentration protein drug product. *Biopharm International*. 2013;26(3):28–39.
13. Moore SM, Hanlon CA. Rabies-specific antibodies: measuring surrogates of protection against a fatal disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3):e595. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000595>
14. Rayn ME, Webster ML, Statler JD. Adverse effects of intravenous immunoglobulin therapy. *Clin Pediatr (Phila)*. 1996;35:23–31. <https://doi.org/10.1177/000992289603500105>
15. Анастасиев ВВ, Короткова ТВ, Крайнова ТА, Ефремова ЛМ. Разработка производственной технологии получения иммуноглобулина для внутривенного введения нового поколения — имбиоглобулина. *Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний: Материалы научной конференции, посвященной 75-летию Нижегородского НИИЭМ*. Н. Новгород; 2004. [Anastasiev VV, Korotkova TV, Krainova TA, Efremova LM. Development of the production technology for manufacturing immunoglobulin for intravenous administration of the next generation — imbioglobulin. *New technologies in the prevention, diagnosis, surveillance and treatment of infectious diseases: Proceedings of the scientific conference dedicated to the 75th anniversary of the Nizhny Novgorod RIEM*. N. Novgorod; 2004 (In Russ.)]
16. Лаптева ЛК, Минакова ЛВ, Гавриленкова ВЮ. Сохраняемость специфических антител в иммуноглобулине человека противостолбнячному в зависимости от степени фрагментации IgG. *Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов: Сборник научных трудов*. 1987;4:148–53. [Lapteva LK, Minakova LV, Gavrilenkova VYu. Conservability of specific antibodies in human tetanus immunoglobulin depending on the degree of IgG fragmentation. *Standards, strains and methods for the control of bacterial and viral drugs. Collection of scientific works*. 1987;4:148–53 (In Russ.)]
17. Никитина ВД, Холчев ИВ, Колесникова ЛИ, Кораблева ЗИ. Исследование фрагментации препаратов гамма-глобулинов, выпускаемых в СССР. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1975;1:44–8. [Nikitina VD, Kholchev IV, Kolesnikova LI, Korableva ZI. Investigation of fragmentation of gamma globulin preparations produced in the USSR. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1975;1:44–8 (In Russ.)]
18. Гусаров ДА. Лиофилизация биофармацевтических белков (мини-обзор). *Биофармацевтический журнал*. 2010;2(5):3–7. [Gusarov DA. Lyophilization of biopharmaceutical proteins (mini-review). *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2010;2(5):3–7 (In Russ.)]
19. Carpenter JF, Growe JH, Arakawa T. Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in frozen and dried state. *J Dairy Sci*. 1990;73(12):3627–36. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)79065-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)79065-0)
20. Mayberry J. The new scope of pharmaceutical lyophilization: New technologies can optimize and control the lyophilization process, thereby creating a higher-quality end product. *Pharmaceutical Processing*. 2012;27(6):36–7.
21. Nishida M, Yabushita S, Fujita S, Saki T. Lyophilized native gamma globulin preparation for intravenous administration. Patent of the USA US4168303; 1979.
22. Варламова ТИ, Кукунина ТВ, Жмыхов АА. Оптимизация производственного процесса сушки препарата Иммуновенин®. *Вестник современных исследований*. 2017;9-1(12):12–8. [Varlamova TI, Kukunina TV, Zhmykhov AA. Optimization of the Production Drying Process of the Drug Immunovenin®. *Vestnik sovremennykh issledovaniy = Bulletin of Modern Research*. 2017;9-1(12):12–8 (In Russ.)]
23. Давыдкин ВЮ, Гаврин АГ, Алешкин ВА, Лютов АГ, Афанасьев СС, Зорик АВ и др. Отработка процесса сублимационного высушивания комплексного иммуноглобулинового препарата. В кн.: *Сборник научных трудов ГУ МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского МЗ РФ «Проблемы инфекционных болезней (клиника, диагностика, лечение)»*. М.; 2000. С. 61–6. [Davydkin VYu, Gavrin AG, Aleshkin VA, Lyutov AG, Afanas'ev SS, Zorik AV, et al. Optimization of the process of freeze drying of a complex immunoglobulin preparation. In: *Collection of scientific works "Problems of infectious diseases (clinical presentation, diagnosis, treatment)"*. Moscow; 2000. P. 61–6 (In Russ.)]
24. Мелихова АВ, Лютов АГ, Алешкин ВА, Гаврин АГ, Давыдкин ВЮ, Давыдкин ИЮ. Стабилизация фракций иммуноглобулинов при сублимационном высушивании комплексного иммуноглобулинового препарата. *International Journal on Immunorehabilitation*. 2003;5(2):172. [Melikhova AV, Lyutov AG, Aleshkin VA, Gavrin AG, Davydkin VYu, Davydkin IYu. Stabilization of immunoglobulin fractions during freeze-drying of a complex immunoglobulin preparation. *Mezhdunarodnyy zhurnal po immunoreabilitatsii = International Journal on Immunorehabilitation*. 2003;5(2):172 (In Russ.)]
25. Мелихова АВ, Лютов АГ, Гаврин АГ, Давыдкин ВЮ, Давыдкин ИЮ. Технологические аспекты рецептурования лекарственных форм иммуноглобулинов: Влияние стабилизаторов на качество иммуноглобу-

- линового препарата при сублимационном высушивании. В кн.: *Сборник материалов научно-практической конференции «Иммуноглобулиновые препараты энтерального и внутривенного применения»: Приложение к журналу «Вестник восстановительной медицины»*. М.; 2003. С. 22–3. [Melikhova AV, Lyutov AG, Gavrin AG, Davydkin VYu, Davydkin IYu. Technological aspects of the formulation of immunoglobulin dosage forms: The effect of stabilizers on the quality of an immunoglobulin preparation during freeze-drying. In: *Proceedings of the scientific-practical conference “Immunoglobulin preparations for enteric and intravenous use”: Appendix to the journal “Vestnik vosstanovitel'noy mediciny” = Bulletin of Rehabilitation Mediciny*. Moscow; 2003. P. 22–3 (In Russ.)]
26. Мелихова АВ, Алешкин ВА, Давыдкин ВЮ, Давыдкин ИЮ, Афанасьев СС, Борисова ИВ и др. Состав, обладающий противомикробным действием. Патент Российской Федерации № 2247578; 2005. [Melikhova AV, Aleshkin VA, Davydkin VYu, Davydkin IYu, Afanas'ev SS, Borisova IV, et al. Composition with antimicrobial action. Patent of the Russian Federation No. 2247578; 2005 (In Russ.)]
27. Давыдкин ВЮ, Давыдкин ИЮ, Алешкин ВА, Гаврин АГ, Афанасьев СС, Новикова ЛИ и др. Технологические аспекты рецептуростроения лекарственных форм иммуноглобулинов: Измельчение сублимированной биомассы иммуноглобулинового препарата. В кн.: *Сборник материалов научно-практической конференции «Иммуноглобулиновые препараты энтерального и внутривенного применения»: Приложение к журналу «Вестник восстановительной медицины»*. М.; 2003. С. 24–5. [Davydkin VYu, Davydkin IYu, Aleshkin VA, Gavrin AG, Afanas'ev SS, Novikova LI, et al. Technological aspects of the formulation of immunoglobulin dosage forms: Grinding of the sublimated biomass of the immunoglobulin preparation. In: *Proceedings of the scientific-practical conference “Immunoglobulin preparations for enteric and intravenous use”: Appendix to the journal “Vestnik vosstanovitel'noy mediciny” = Bulletin of Rehabilitation Mediciny*. Moscow; 2003. P. 24–5 (In Russ.)]
28. Давыдкин ВЮ, Давыдкин ИЮ, Алешкин ВА, Гаврин АГ, Афанасьев СС, Мелихова АВ и др. Разработка таблетированной формы комплексного иммуноглобулинового препарата. В кн.: *Тезисы докладов XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство»*. М.; 2004. С. 780. [Davydkin VYu, Davydkin IYu, Aleshkin VA, Gavrin AG, Afanas'ev SS, Melikhova AV, et al. Development of a tablet form of a complex immunoglobulin preparation. In: *Abstracts of the XI Russian National Congress “Man and Medicine”*. Moscow; 2004. P. 780 (In Russ.)]
29. Varasteh A-R, Hashemi M, Baranzadeh N, Jaafari M-R. Optimization of anti-Rh D immunoglobulin stability in the lyophilization processes. *IJBMS*. 2008;11(1):55–61.
30. Bardat A, Begin E, Khandoudi N, Just O, Chtourou S, Schmittaeusler R. Stabilising formulation for immunoglobulin G compositions in liquid form and in lyophilised form. Patent of the USA US8388954B2; 2005.
31. Kaisheva EA, Flores-Nate A, Gupta S. Stable lyophilized pharmaceutical formulation of IgG antibodies. International Application WO03/009817A2; 2002.
32. Funakoshi S, Kamimura Y. Freeze-dried preparation of anti-HBs globulin M. Patent of the Japan JPS55164630A; 1980.
33. Ohmura T, Hirao Y, Hamamura T, Ohmizu A, Funakoshi S. Method of lyophilizing cold insoluble globulin. Patent of the USA US4565651; 1986.
34. Bick RL, Fekete LF. Clottable fibrinogen free Factor VIII product and process. Patent of the USA US4085095; 1976.
35. Phillips CP, Mattis JA. Freeze-dried formulation for antibody products. International Application WO89/11297; 1989.
36. Sarciaux JM, Mansour S, Hageman MJ, Nail SL. Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying. *J Pharm Sci*. 1999;88(12):1354–61. <https://doi.org/10.1021/js980383n>
37. Комиссаров АВ, Кочкалова НН, Сеницына НВ, Бадарин СА, Костылева НИ, Волох ОА и др. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(1):90–3. [Komissarov AV, Kochkalova NN, Sinitsyna NV, Badarin SA, Kostyleva NI, Volokh OA, et al. Studies of Freeze-Drying of Cholera Chemical Vaccine Immunogens. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(1):90–3 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-1-90-93>
38. Абрамова ЕГ, Кочкалова НН, Никифоров АК, Бутырский АЮ, Иванов ЮВ, Сеницына НВ и др. Получение лиофилизированного препарата антирабического иммуноглобулина и исследование его основных свойств. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2011;(2(108)):75–8. [Abramova EG, Kochkalova NN, Nikiforov AK, Butyrskii AYU, Ivanov YUV, Sinitsyna NV, et al. Production of lyophilized preparation of anti-rabies immunoglobulin and examination of its main properties. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2011;(2(108)):75–8 (In Russ.)] [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-2\(108\)-75-78](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2011-2(108)-75-78)
39. Федоровская ЕА, Рыбальская АП, Селимов МА, Соболев ВФ, Шинкаренко АА, Логвинова ВП. Способ получения антирабического иммуноглобулина. Авторское свидетельство СССР № 1745257; 1992. [Fedorovskaya EA, Rybal'skaya AP, Selimov MA, Sobolev VF, Shinkarenko AA, Logvinova VP. Method for producing anti-rabies immunoglobulin. Author's certificate of the USSR No. 1745257; 1992 (In Russ.)]
40. Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Киреев МН, Кочкалова НН, Генералов СВ, Селезнева АГ и др. Определение молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина методом гель-фильтрации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010;(4):54–7. [Abramova EG, Nikiforov AK, Kireev MN, Kochkalova NN, Generalov SV, Selezneva AG, et al. Determination of the molecular parameters of heterologous anti-rabies immunoglobulin using gel-filtration. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2010;(4):54–7 (In Russ.)] [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-4\(106\)-54-57](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-4(106)-54-57)
41. Кочкалова НН, Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Киреев МН, Лобовикова ОА, Савицкая ЛВ и др. Оптимизация формы выпуска и потребительской тары иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН*. 2012;5(87):236–8. [Kochkalova NN, Abramova EG, Nikiforov AK, Kireev MN, Lobovikova OA, Savitskaya LV, et al. Optimization of the dosage form and consumer packaging of anti-rabies immunoglobulin from horse blood serum. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN = Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2012;5(87):236–8 (In Russ.)]
42. Кочкалова НН, Никифоров АК, Манин НГ, Абрамова ЕГ. Определение эвтектической температуры и исследование тепловых параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина методами электропроводности и дифференциальной сканирующей калориметрии. *Биотехнология*. 2011;(5):80–4. [Kochkalova NN, Nikiforov AK, Manin NG, Abramova EG. Determination of eutectic temperature and study of thermal parameters of heterologous anti-rabies immunoglobulin by means of electrical conductivity and differential scanning calorimetry. *Biotechnologiya = Russian Journal of Biotechnology*. 2011;(5):80–4 (In Russ.)]

43. Комиссаров АВ, Комоско ГВ, Лещенко АА, Луб МЮ, Пименов ЕВ, Дармов ИВ и др. Разработка сухой формы полуфабриката глобулина противосибиреязвенного лошадиного. *Биотехнология*. 2003;3:74–9. [Komissarov AV, Komosko GV, Leshchenko AA, Lub MYu, Pimenov EV, Darmov IV, et al. Development of the dry form of horse anti-anthrax globulin half-finished product. *Biotechnologiya = Russian Journal of Biotechnology*. 2003;3:74–9 (In Russ.)]
44. Комиссаров АВ, Пименов ЕВ, Комоско ГВ, Васильев ПГ, Луб МЮ и др. Полуфабрикат глобулина противосибиреязвенного лошадиного. Патент Российской Федерации № 2161985; 1999. [Komissarov AV, Pimenov EV, Komosko GV, Vasil'ev PG, Lub MYu, et al. Semi-finished product of equine anti-anthrax globulin. Patent of the Russian Federation No. 2161985; 1999 (In Russ.)]
45. Комиссаров АВ, Пименов ЕВ, Дармов ИВ, Лещенко АА, Комоско ГВ, Логвинов СВ и др. Глобулин противосибиреязвенный лошадиный сухой. Патент Российской Федерации № 2214836; 2003. [Komissarov AV, Pimenov EV, Darmov IV, Leshchenko AA, Komosko GV, Logvinov SV, et al. Dried equine anti-anthrax globulin. Patent of the Russian Federation No. 2214836; 2003 (In Russ.)]
46. Логвинов СВ, Бондарев ВП, Шевцов АН, Дармов ИВ, Ляпустин АВ, Луб МЮ и др. Оптимизация процессов получения и свойства сухой формы иммуноглобулина противосибиреязвенного. *Биотехнология*. 2007;(6):42–9. [Logvinov SV, Bondarev VP, Shevtsov AN, Darmov IV, Lyapustin AV, Lub MYu, et al. Optimization of the production processes and properties of the dried form of anti-anthrax immunoglobulin. *Biotechnologiya = Russian Journal of Biotechnology*. 2007;(6):42–9 (In Russ.)]
47. Луб МЮ, Шевцов АН, Кожухов ВВ, Логвинов СВ, Седельников ИН, Козлова ТН и др. Сывороточный иммунобиологический препарат для экстренной профилактики и лечения сибирской язвы. Патент Российской Федерации № 2381037; 2010. [Lub MYu, Shevtsov AN, Kozhukhov VV, Logvinov SV, Sedelnikov IN, Kozlova TN, et al. Serum immunobiological preparation for emergency prevention and treatment of anthrax. Patent of the Russian Federation No. 2381037; 2010 (In Russ.)]
48. Комиссаров АВ, Бибииков ДН, Волох ОА, Бадарин СА, Синецына НВ, Костылева НИ и др. Лиофилизации живых вакцин. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2018;14(3):56–73. [Komissarov AV, Bibikov DN, Volokh OA, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, et al. Lyophilization of live vaccines. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova = Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2018;14(3):56–73 (In Russ.)]
49. Лазаренко АА, Алимбарова ЛМ, Мордвинцева ЭЮ, Баринский ИФ. Разработка свечевой формы препарата иммуноглобулинов человека с высокими титрами антител к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов для лечения хронических форм герпетической болезни. *Вопросы вирусологии*. 2017;62(1):36–41. [Lazarenko AA, Alimbarova LM, Mordvintseva EYu, Barinsky IF. Development of the suppository form of human immunoglobulin preparation with high titers of antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 for the treatment of chronic forms of herpetic disease. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, Russian journal*. 2017;62(1):36–41 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-36-41>
50. Алешкин ВА, Новикова ЛИ, Афанасьев СС, Борисова ИВ, Зуева ММ, Зорик АВ. Способ получения иммуноглобулинового препарата для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций, иммуноглобулиновый препарат для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций (варианты) и суппозитории на основе иммуноглобулинового препарата. Патент Российской Федерации № 2255766; 2003. [Aleshkin VA, Novikova LI, Afanas'ev SS, Borisova IV, Zueva MM, Zorik AV. A method for the production of immunoglobulin preparation for the prevention and treatment of bacterial and viral infections, an immunoglobulin preparation for the prevention and treatment of bacterial and viral infections (variants) and suppositories based on an immunoglobulin preparation. Patent of the Russian Federation No. 2255766; 2003 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

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

Комиссаров Александр Владимирович, д-р биол. наук, проф. *Aleksandr V. Komissarov*, Dr. Sci. (Biol.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1609-0384>

Синецына Наталья Викторовна. *Natalya V. Sinitsyna*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5450-0594>

Жулидов Иван Михайлович, канд. биол. наук. *Ivan M. Zhulidov*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3322-5404>

Никифоров Алексей Константинович, д-р биол. наук, доцент. *Aleksey K. Nikiforov*, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1130-3504>

Поступила 29.06.2021

После доработки 30.09.2021

Принята к публикации 10.12.2021

Received 29 June 2021

Revised 30 September 2021

Accepted 10 December 2021

Оценка стабильности производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины с помощью контрольных карт Шухарта

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

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

В Российской Федерации, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, уделяют особое внимание вопросам, связанным с вакцинопрофилактикой. Учитывая, что в процесс вакцинации, в частности вакциной для профилактики дифтерии, коклюша и столбняка (АКДС-вакцина), вовлечены значительные слои населения, актуальными являются исследования, направленные на повышение качества вакцинных препаратов. Одна из возможностей получения качественных препаратов — изготовление их в стабильных условиях, гарантирующих на выходе однородность продукции. Оценить стабильность условий технологического процесса позволяют карты Шухарта. **Цель работы:** оценка стабильности производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины с помощью контрольных карт Шухарта. **Материалы и методы:** использованы данные сводных протоколов 60 серий АКДС-вакцины отечественного производства, поступивших в Испытательный центр ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России с сентября 2017 по апрель 2020 г. Для исследования был выбран один из основных показателей качества вакцины — специфическая (защитная) активность коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов препарата. Карты Шухарта для дифтерийного и столбнячного компонентов строили на основе сводных протоколов предприятия-производителя; для коклюшного компонента — как по данным сводных протоколов, так и по результатам, полученным в Испытательном центре при сертификационном контроле этих же серий. Исследование с использованием карт Шухарта проводили в соответствии с ГОСТ Р 50779.42-99 и ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. **Результаты:** проведенный за 2,5 года наблюдения ретроспективный анализ R- и X-карт выявил присутствие характерных трендов, присущих критериям для особых причин. Наиболее тревожная ситуация была выявлена при производстве дифтерийного компонента. Несколько благополучнее технологический процесс проходил при производстве столбнячного и коклюшного компонентов. Подтверждением того, что процесс находился в статистически неуправляемом состоянии, может являться отсутствие корреляции между результатами по оценке активности коклюшного компонента, полученными на предприятии и в Испытательном центре. **Выводы:** на протяжении анализируемого периода процесс производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины не всегда проходил в стабильных условиях. Это указывает на необходимость проведения исследований, направленных на стандартизацию как условий производства, так и условий проведения контрольных испытаний.

Ключевые слова: АКДС-вакцина; коклюш; дифтерия; столбняк; технологический процесс; карты Шухарта

Для цитирования: Алексеева ИА, Перелыгина ОВ, Колышкина ЕД. Оценка стабильности производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины с помощью контрольных карт Шухарта. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(4):256–265. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-256-265>

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

Estimation of production consistency of diphtheria, tetanus, and pertussis components of the DTP vaccine using Shewhart charts

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

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

The Russian Federation puts special emphasis on vaccination-related issues, in accordance with the WHO recommendations. The fact that vaccination, in particular with the diphtheria, tetanus, and pertussis vaccine (DTP vaccine), covers large population groups, accounts for the relevance of research aimed at improving the quality of vaccines. One of the ways to produce vaccines of assured quality is to maintain consistent manufacturing processes that ensure consistency of product characteristics. The stability of the technological processes may be assessed using Shewhart charts. **The aim of the study** was to assess the production consistency of diphtheria, tetanus, and pertussis components of DTP vaccine using Shewhart control charts. **Materials and methods:** the study used data from 60 batch summary protocols of a Russian-produced DTP vaccine that were submitted to the Testing Centre of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products from September 2017 until April 2020. The study assessed one of the main vaccine quality characteristics—specific (protective) activity of diphtheria, tetanus, and pertussis components. Shewhart charts for the diphtheria and tetanus components were constructed based on the manufacturer's summary protocols, while Shewhart charts for the pertussis component were constructed based on both summary protocols and the results obtained by the Testing Centre during certification of the product batches. The Shewhart charts were used in accordance with the national standards GOST R 50779.42-99 and GOST R ISO 7870-2-2015. **Results:** a retrospective analysis of R- and X-charts covering a 2.5-year period revealed some characteristic trends in special-cause criteria. The most alarming situation was observed for the production of the diphtheria component. The technological processes were somewhat safer in the case of the tetanus and pertussis components. The production

process lacked due statistical control, which is confirmed by the lack of correlation between the results of the pertussis component activity assessment obtained by the manufacturer and the Testing Centre. **Conclusions:** during the analysed period, the production of the diphtheria, tetanus, and pertussis components of the DTP vaccine was not always consistent. This highlights the need to conduct research aimed at standardisation of both production processes and control test conditions.

Key words: DTP vaccine; pertussis; diphtheria; tetanus; technological process; Shewhart charts

For citation: Alekseeva IA, Pereyagina OV, Kolyshkina ED. Estimation of production consistency of diphtheria, tetanus, and pertussis components of the DTP vaccine using Shewhart charts. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(4):256–265. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-256-265>

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

Иммунопрофилактика и ее эффективность признаны во всем мире. Благодаря проведению массовой вакцинации населения были достигнуты значительные успехи в борьбе с такими тяжелыми заболеваниями, как корь, паротит, краснуха, полиомиелит, гепатиты А и В¹ [1]. Применение вакцин для профилактики дифтерии, коклюша и столбняка (АКДС-вакцины) позволило снизить заболеваемость дифтерией, столбняком и коклюшем. Так, зарегистрированное в России в 1913 г. максимальное число случаев дифтерии — 349866 [2], было сведено в 2015 г. до 2; в 2019 г. заболеваемость дифтерией зарегистрирована не была². В 1955 г. в Советском Союзе было зарегистрировано 1043 случая столбняка. В настоящее время в России для столбняка характерна спорадическая заболеваемость, столбняка новорожденных нет³. Заболеваемость коклюшем после начала массовой профилактики АКДС-вакциной, включающей в свой состав цельноклеточный коклюшный компонент, снизилась в десятки и сотни раз. Так, показатель заболеваемости коклюшем в допрививочный период составлял 390 и выше на 100 тыс. населения, летальность могла достигать 10% [3]. После начала широкого использования АКДС-вакцины в 1964 г. заболеваемость уже к концу 1970-х годов составила 5,8–10,8 на 100 тыс. населения [3]. В настоящее время заболеваемость коклюшем держится на достигнутом уровне⁴.

Однако в настоящее время, несмотря на выдающиеся достижения иммунопрофилактики, во многих странах мира высказывают недоверие к вакцинам. Рекомендации Стратегической консультативной группы экспертов (SAGE) по иммунизации позволили классифицировать причины недоверия и выделить наиболее часто встречающиеся. Как оказалось, население прежде всего опасается последствий, которые могут быть связаны с вакцинацией, что поднимает другой не менее важный вопрос о недостаточности просветительской и разъяснительной деятельности, проводимой медицинскими учреждениями. К причинам, препятствующим вакцинации, также относят особенности, обусловленные религиозными взглядами населения, значение имеет уровень экономического развития стран и многое другое⁵.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) уделяет большое внимание проблеме вакцинопрофилактики населения, и в 2017 г. созданный под эгидой ВОЗ Глобальный план действий по вакцинам рекомендовал странам выработать стратегию, направленную на улучшение ситуации с использованием вакцин, в том числе повышение уровня доверия и принятие роли вакцинации в защите от инфекций. Одним из основных

положений стратегии являются периодически проводимые исследования по оценке отношения общества к вакцинации и разработка плана действий в ответ на возможные кризисные ситуации, которые могут иметь место при вакцинопрофилактике⁶. ВОЗ в своих документах отмечает, что вакцины должны соответствовать самым высоким стандартам качества и безопасности⁷.

В Российской Федерации качеству иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) уделяют особое внимание. В государственном стандарте — фармакопейной статье — изложены требования к качеству вакцинных препаратов и методы их контроля. За качество выпущенных вакцин несет ответственность предприятие-изготовитель. В свою очередь, государство осуществляет надзор за производством, который включает проведение контроля выпущенных серий в государственных испытательных центрах, а также регулярное обследование производств, направленное на оценку соблюдения предприятием требований надлежащих условий производства.

Контроль на производстве или контроль в государственных испытательных центрах основан на исследовании уже изготовленной, но не разлитой вакцины или готового препарата, то есть проводится оценка качества и выявление некачественных образцов среди уже изготовленной продукции.

Эффективный подход к оценке качества продукции предложил У. Шухарт [4, 5]. Применение предложенной им системы статистического управления качеством дает возможность в режиме реального времени проводить наблюдения за технологическим процессом. Постоянный анализ параметров процесса позволяет на самых ранних этапах выявлять отклонения и тем самым не допускать появления брака. Следствием постоянного использования карт Шухарта на производстве является непрерывное повышение стабильности технологического процесса, что обеспечивает выпуск более однородной продукции с показателями качества, соответствующими требованиям нормативной документации (НД). В настоящее время карты Шухарта используют в различных областях деятельности человека [6–8].

Учитывая, что в процесс вакцинации вовлечены значительные слои населения, актуальными являются исследования, направленные на повышение качества вакцинных препаратов. Одна из возможностей получения качественных препаратов — изготовление их в стабильных условиях, гарантирующих на выходе однородность продукции. Карты Шухарта являются именно тем методологическим инструментом, который позволяет оценить стабильность условий технологического процесса.

¹ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: государственный доклад. 2020. https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf

² Там же.

³ Таточенко ВК, Озерецковский НА. Иммунопрофилактика-2018. Справочник. М.: Боргес; 2018.

⁴ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: государственный доклад. 2020. https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf

⁵ Недоверие к вакцинам в мире: анализ данных за три года, представленных в совместном докладе ВОЗ/ЮНИСЕФ — 2015–2017. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2018;17(6):56.

⁶ Там же.

⁷ WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 2004; 79(29):269–72.

С использованием контрольных карт проводится анализ состояния производства паротитной, коревой, ассоциированной паротитно-коревой вакцин [9–11]. Ранее авторами была предпринята попытка с использованием карт Шухарта провести оценку стабильности производства коклюшного компонента АКДС-вакцины [12]. Было выявлено, что производственный процесс изготовления препарата не всегда проходил в стандартных условиях. В настоящей работе на большей выборке продолжили исследование по оценке возможности статистического управления технологическим процессом производства коклюшного компонента. Кроме того, проводилось изучение состояния производства и других компонентов АКДС-вакцины.

Цель работы — оценка стабильности производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины с помощью контрольных карт Шухарта.

Для достижения цели была поставлена задача: сбор и систематизация значений изучаемых показателей, построение контрольных карт Шухарта на основе собранных материалов и их анализ.

Материалы и методы

В исследовании использованы данные сводных протоколов анализа 60 серий АКДС-вакцины отечественного производства, поступивших в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России с сентября 2017 по апрель 2020 г. для подтверждения соответствия образцов требованиям нормативной документации (НД), а также данные Испытательного центра (ИЦ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, полученные в ходе испытаний этих же серий. Для исследования был выбран один из основных показателей качества вакцины — специфическая (защитная) активность коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов препарата.

Специфическую активность коклюшного компонента оценивали в соответствии с общей фармакопейной статьей (ОФС) 1.7.2.0005.15⁸ с использованием фармакопейного стандартного образца иммуногенной активности коклюшной вакцины ФСО 3.2.00089 (ОСО 42-28-89); дифтерийного и столбнячного компонентов — по ОФС.1.7.2.0003.15⁹ и ОФС.1.7.2.0004.15¹⁰.

Карты Шухарта для коклюшного компонента строили как по данным сводных протоколов предприятия-производителя, так и по результатам, полученным в ИЦ при сертификационном контроле этих же серий. Принимая во внимание высокую стоимость и продолжительность опытов по оценке специфической активности коклюшного компонента, для построения карт Шухарта использовали индивидуальные значения результатов опытов.

Для дифтерийного и столбнячного компонентов карты Шухарта строили на основе сводных протоколов предприятия-производителя.

Исследование с использованием карт Шухарта проводили в соответствии с ГОСТ Р 50779.42-99¹¹ и ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015¹².

Использование карт Шухарта включает в себя анализ двух контрольных карт: R-карты — карты размахов

и X-карты — карты средних значений подгрупп. R-карта демонстрирует изменчивость значения показателя по отношению к другому, последовательно следующему за первым, и отражает появление нежелательной вариации среди показателей исследуемой группы, сигнализируя таким образом о происходящих изменениях в анализируемой технологической цепи. Величину скользящего размаха R находят, определяя разность между двумя последовательными значениями анализируемого показателя. R-карта отражает однородность процесса. X-карта указывает расположение среднего значения процесса и его стабильность.

Построение карт заключается в нанесении на график по оси ординат значений размахов (R-карта) или значений анализируемого показателя (X-карта). Ось абсцисс отражает номера последовательности действий при вычислении размаха или номера серий показателя. Кроме того, на карту наносят центральную линию (CL), верхнюю (UCL) и нижнюю (LCL) контрольные границы. На X-карте центральную линию проводят в соответствии с рассчитанной средней величиной значений анализируемого показателя. На R-карте центральная линия — средняя размахов. Если X-карту строят исходя из индивидуальных значений показателя, то контрольные границы рассчитывают с учетом средней величины скользящих размахов (R). В противоположные стороны от центральной линии откладывают 1, 2 и 3 стандартных отклонения (σ), которые необходимы при выявлении критериев для особых причин, обозначенных У. Шухартом и описанных в ГОСТах¹³.

Для состояния стабильности или статистической управляемости качеством технологического процесса характерно хаотичное расположение точек, при этом точки не выходят за пределы контрольных границ и не выстраиваются в необычные структуры (тренды). При таком процессе имеется возможность предвидеть значения будущих вариаций. По мнению У. Шухарта, изменчивость статистически управляемого процесса обусловлена обычными, постоянно присутствующими причинами, к которым относят температуру, влажность, колебания электрического и магнитного полей, вибрацию и т. д. В итоге совокупность обычных причин обуславливает системную вариабельность процесса. Выход точек за пределы контрольных границ или их выстраивание в тренды сигнализирует, что процесс становится статистически неуправляемым, он выходит из состояния стабильности. При потере стабильности вариабельность процесса становится труднопредсказуемой, и колебания значения анализируемого показателя могут отличаться от регламентированной величины и превышать допустимый разброс, что отрицательно сказывается как на качестве технологического процесса, так и на качестве выпускаемых препаратов. Потерю статистической управляемости процессом обуславливают внешние, особые, неслучайные причины, приводящие к реальным изменениям в технологической цепи. Особые причины могут быть выявлены, и их воспринимают как непредсказуемые изменения в процессе, такие как, например, работа на неисправном оборудовании, неправильное выполнение технологических операций, несоответствующая квалификация сотрудников и т. д.

⁸ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0005.15. Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁹ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0003.15. Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹⁰ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0004.15. Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹¹ ГОСТ Р 50779.42-99. Статистические методы. Контрольные карты Шухарта.

¹² ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

¹³ ГОСТ Р 50779.42-99. Статистические методы. Контрольные карты Шухарта.

ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

Как предполагается, каждый выявленный с помощью карт сигнал о воздействии на процесс неслучайной причины должен быть подвергнут расследованию, что требует проведения анализа операций на данном участке технологической цепи. После выявления причины должны быть предприняты корректирующие и превентивные меры для предупреждения повторения причины.

Нормальность распределения значений показателей была оценена графическим методом и с помощью показателей асимметрии и эксцесса. Оценку распределения, как и статистическую обработку данных, проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2007.

Взаимосвязь между значениями специфической активности коклюшного компонента, полученными на предприятии и полученными в ИЦ, проводили, используя коэффициент парной ранговой корреляции Спирмена¹⁴. Коэффициент $\leq 0,3$ говорит о слабой тесноте (силе) корреляционной связи между рассматриваемыми показателями; значение коэффициента $\geq 0,4$, но $< 0,7$ — об умеренной тесноте связи, $\geq 0,7$ — о высокой тесноте связи.

Результаты и обсуждение

Нормальность распределения значений была подтверждена для данных сводных протоколов предприятия-производителя по анализу показателя активности коклюшного и столбнячного компонентов. Распределение значений данных предприятия для показателя активности дифтерийного компонента и значений показателя активности коклюшного компонента, полученных в ИЦ, были приближены к нормальному.

В настоящее время нет однозначного мнения об области применения контрольных карт. В стандартах¹⁵, описывающих использование карт Шухарта, предполагается нормальное распределение значений анализируемого показателя. Данное положение связано с тем, что коэффициенты, применяемые при расчете верхней и нижней контрольных границ карт, были получены исходя из допущения о нормальном распределении значений показателя. На основе этого предположения сформировалось мнение, что контрольные карты могут быть использованы для анализа только тех процессов, в которых имеет место нормальное распределение значений показателя [13]. В то же время в стандартах¹⁶ допускается возможность проведения анализа карт в случае, если распределение значений не является нормальным, а приближено к нормальному, но метод определения отклонения и его величина не регламентируются. При традиционном статистическом подходе используют генеральную совокупность, статистические показатели которой (средняя, стандартное отклонение и т. д.) имеют постоянные значения. Выборка подобной совокупности представляет собой статический объект изучения. Технологический процесс является динамическим объектом изучения, то есть у данного процесса отсутствуют фиксированные значения показателей, используемых для построения карт, — средней величины, стандартного отклонения и др. [13]. Ряд авторов предлагает рассматривать указание на необходимость нормального распределения более широко. Высказывается сомнение, что после воздействия на процесс неслучайной причины распределение значений показателя останется нормальным [13–15]. Было установлено, что при анализе данных, распределение

которых не является нормальным, расчетные коэффициенты изменяются примерно на 6%. Для практической деятельности, как считают авторы, это допустимая точность [15]. Как следует из опубликованных работ, контрольные карты Шухарта проявляют устойчивость при их использовании при разных типах распределения, отличных от нормального. В связи с чем авторы делают вывод о возможности применения контрольных карт Шухарта для анализа разных технологических процессов, в том числе и тех, в которых нормальность распределения показателя не подтверждается [13–15].

Если обратиться к мнению автора и разработчика контрольных карт, то можно отметить, что Уолтер Шухарт, имея докторскую степень по физике и являясь специалистом в области статистики, в систему анализа разработанных им карт сознательно не вводил строгих математических ограничений. Он считал, что процессы, проходящие в реальной жизни, практически всегда находятся под воздействием неслучайных причин. Возникающая при этом неконтролируемая изменчивость процесса указывает на отсутствие устойчивого распределения. У. Шухарт полагал, что в реальных условиях, в отличие от теоретических предположений, имеющие место процессы нельзя характеризовать как устойчивые [4, 5]. Проблемы, появляющиеся при вероятностном подходе статистики к анализу контрольных карт, обусловлены оторванностью такого подхода от практики, а условия, задаваемые при математической обработке данных процесса, существенно ограничивают возможность использования контрольных карт. Предложенное У. Шухартом ограничение границ в $\pm 3\sigma$ обусловлено не математическими расчетами и не предположением о нормальном распределении, а являлось следствием эмпирического доказательства, что при проведении анализа данное ограничение работает [4, 5].

Учитывая, что по ГОСТам¹⁷ допускается анализ контрольных карт, если распределение характеристики процесса не является нормальным, и в то же время разделяя точку зрения исследователей, считающих, что после вмешательства особых причин распределение не может не измениться, мы провели анализ всех построенных карт, в том числе тех, в которых распределение приближено к нормальному.

У. Шухарт, разрабатывая карты, предполагал их использовать как диагностический инструмент для выявления действия неслучайных причин вариабельности на технологический процесс. Основываясь на данных анализа контрольной карты, введенного в текущий момент или несколько ранее, пользователь карт имеет возможность с определенной точностью установить в обозримой перспективе границы технологического процесса при отсутствии воздействия неслучайных причин. В этом случае появление неслучайных причин может быть выявлено по признакам выхода значений показателя за установленные контрольные границы или выстраивания точек в тренды.

Оценка стабильности производства коклюшного компонента АКДС-вакцины

Анализ R- и X-карт, построенных по значениям показателя специфической активности (данные сводных протоколов предприятия-производителя), не выявил трендов, то есть характерного расположения точек, сигнализирующих о действии особых причин, приводящих к нарушению стабильности технологического процесса (рис. 1А и 1В). Однако

¹⁴ Коэффициент ранговой корреляции Спирмена. http://www.infamed.com/stat/sp05_js.html

¹⁵ ГОСТ Р 50779.42-99. Статистические методы. Контрольные карты Шухарта;

ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

¹⁶ Там же.

¹⁷ Там же.

имеются некоторые тревожные предупреждающие сигналы о том, что с технологическим процессом не все благополучно. Так, на R-карте в расположении точек 37–41 не хватает всего одной точки до формирования критерия для особых причин 3. Для точек 50–53 и 53–56 выявлена тенденция к образованию того же тренда.

На X-карте в расположении точек также были выявлены структуры, которым до критерия 3 не хватает всего по одной точке. Это пять возрастающих подряд точек 6–10 и 50–54 и пять убывающих подряд точек 34–38. В связи с тем что завершенных критериев для особых причин на картах не было выявлено, можно условно предположить, что на протяжении анализируемого 2,5-годичного периода производство коклюшного компонента проходило в стабильных условиях. Однако тревожные сигналы на картах не позволяют говорить о благополучии на предприятии.

Отсутствие в определенные промежутки времени стабильности при производстве коклюшного компонента было выявлено при ретроспективном анализе данных, полученных при проведении контроля этих же серий АКДС-вакцины в ИЦ (рис. 1С и 1D). Так, данные на R-карте демонстрируют, что точки 16 и 17 вышли за предел верхней контрольной границы, что является признаком критерия для особых причин 1. Точки 33–41 формируют тренд, соответствующий критерию 2. Также выявлены группы точек 19–23 и 25–29, которым не хватает всего по одному значению до завершения критерия 3. Кроме того, точки 50–53 и 53–56 выстраиваются в структуры, имеющие явную тенденцию к формированию критерия 3.

Признаки неблагополучия технологического процесса, выявленные с помощью R-карты, построенной по данным ИЦ, подтвердили данные X-карты. На карте можно выделить три критерия для особых причин. Так, выход точки 16 за пределы верхней контрольной границы и +3σ свидетельствует о присутствии критерия для особых причин 1. Точки 19–23 и 30–44 формируют тренд, соответствующий критериям 6 и 7 соответственно. Группа точек 49–52 проявляет тенденцию к формированию критерия 3. По всей видимости, на предприятии не смогли обнаружить и ликвидировать неслучайную причину/причины, вызвавшую появление критерия 1, так как выявление последующих завершенных и незавершенных критериев для особых причин происходило через сравнительно незначительные интервалы.

Таким образом, по представленным предприятием сводным протоколам процесс производства можно охарактеризовать как статистически управляемый, хотя и имеет место выявление трех незавершенных критериев для особых причин. При проведенном в ИЦ сертификационном контроле этих же серий препарата было выявлено, что на предприятии процесс изготовления коклюшного компонента не всегда находился в состоянии статистической управляемости, то есть не всегда проходил при стабильных условиях. Объективность полученных в ИЦ данных подтверждают общие точки, формирующие критерии (завершенные и незавершенные) и выявленные на R- и X-картах как предприятия, так и ИЦ. К таким точкам можно отнести 37–41 и 50–56 (R-карта предприятия); 34–38 и 50–54 (X-карта предприятия); 33–41 и 50–56 (R-карта ИЦ); 30–44 и 49–52 (X-карта ИЦ). Приведенные данные свидетельствуют о том, что действие неслучайных причин на производство препарата выявлено с помощью карт Шухарта в двух разных лабораториях независимо друг от друга.

Не все выявленные в ИЦ критерии нашли отражение в картах предприятия, что, по-видимому, можно объяснить различиями испытываемых образцов вакцины, использованных

при контроле в ИЦ и на предприятии. Различие образцов может быть объяснено их изготовлением в условиях неконтролируемой вариабельности при воздействии на технологический процесс неслучайных причин.

Если обратиться к ранее проведенному на том же предприятии исследованию [12], которое включало период с января 2017 по март 2018 г., то можно отметить тенденцию к улучшению ситуации при производстве коклюшного компонента. Так, если ранее за 1 год и 2 месяца из выпущенных 50 серий АКДС-вакцины 50% изготовленного коклюшного компонента было произведено не в стабильных условиях, то есть на процесс воздействовал ряд неслучайных причин, то в настоящее время из 60 серий АКДС-вакцины в условиях действия особых причин произведено 35% препарата. По-видимому, контролирующие структуры предприятия работают над возможностью восстановления состояния статистического управления процессом.

В каждом опыте в качестве референс-препарата, по отношению к которому рассчитывали специфическую активность испытуемого препарата, использовали фармакопейный стандартный образец иммуногенной активности коклюшной вакцины ФСО 3.2.00089 (ОСО 42-28-89). Рассчитанные для каждого опыта значения ED_{50} ФСО были нанесены на X-карты в соответствии с номерами серий вакцин, которые были испытаны в данном опыте. Как видно из рисунков 1В и 1D, за анализируемый период применительно к использованному ФСО не выявлены тренды, отражающие появление в процессе особых причин. Следовательно, можно констатировать, что тесты по определению специфической активности коклюшного компонента АКДС-вакцины, проводимые на предприятии и в ИЦ, в течение анализируемого периода проходили при стабильных условиях.

За анализируемый период предприятие выпустило 45,0% серий с активностью, превышающей среднюю арифметическую величину данного показателя, и, соответственно, 55,0% — с активностью ниже среднего значения. По данным ИЦ — 41,6 и 58,4% соответственно.

При анализе данных важным является вопрос о корреляции результатов контроля, проведенного на предприятии и в ИЦ, при использовании одних и тех же серий вакцины. Диаграмма рассеяния, построенная с использованием данных, полученных в ИЦ и на предприятии, продемонстрировала слабую отрицательную силу связи: коэффициент корреляции составил $-0,10255$ (рис. 2). Корреляция между полученными данными также была оценена с помощью коэффициента парной ранговой корреляции Спирмена, который составил 0,3, что подтвердило заключение, полученное при анализе диаграммы рассеяния о слабой тесноте связи между результатами, полученными на предприятии и в ИЦ. Тем не менее рассчитанное среднее арифметическое значение активности коклюшного компонента за анализируемый период по данным производителя составляет 11,3 МЕ/мл, по данным ИЦ — 11,8 МЕ/мл.

Оценка стабильности производства дифтерийного компонента АКДС-вакцины

Данные R-карты, построенной по значениям размахов показателя специфической активности дифтерийного компонента, демонстрируют присутствие ряда критериев для особых причин (рис. 3А). Так, расположение точек 11–19 и точек 23–31 формирует два тренда, соответствующих критерию 2. Точка 60 вышла за пределы верхней контрольной границы, что соответствует критерию 1. Кроме того, имеется две группы точек, 9–13 и 46–50, в которых не хватает всего по одной точке до формирования критерия 3. Группа точек 54–57 также демонстрирует выраженную тенденцию к формированию критерия 3. Таким образом, данные R-карты свидетельствуют, что технологический процесс

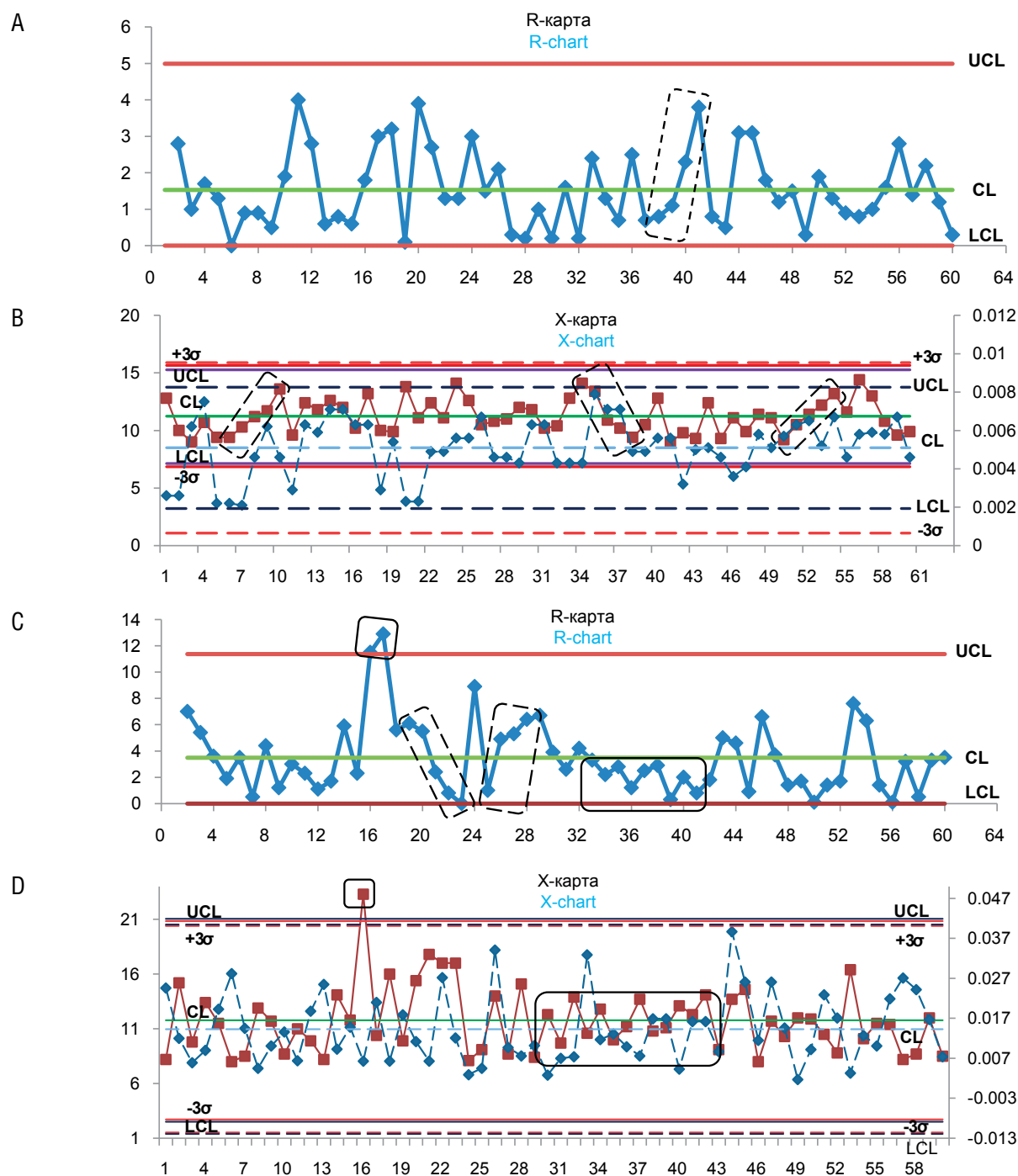


Рис. 1. R- и X-карты технологического процесса производства коклюшного компонента АКДС-вакцины (паспортные данные предприятия-производителя) (A и B соответственно); R- и X-карты технологического процесса производства коклюшного компонента АКДС-вакцины (данные Испытательного центра) (C и D соответственно). На R-картах ось ординат — значения размахов показателей активности между последовательными сериями вакцин; ось абсцисс — порядковые номера серий. На X-картах левая ось ординат — значения иммуногенной активности серий (МЕ/мл), правая ось ординат — значения ED_{50} (мл), ось абсцисс — порядковые номера серий. На X-карте непрерывная линия отражает показатели иммуногенной активности вакцины; прерывистая — значения ED_{50} ФСО иммуногенной активности коклюшной вакцины. UCL и LCL — верхняя и нижняя контрольные границы; CL — центральная линия; σ — стандартное отклонение. Для X-карт непрерывные линии относятся к графику иммуногенной активности вакцины; прерывистые линии относятся к графику ED_{50} .

Fig. 1. R- and X-charts of the DTP pertussis component technological process (release certificate provided by the manufacturer) (A and B respectively); R- and X-charts of the DTP pertussis component technological process (data obtained by the Testing Centre) (C and D respectively). For R-charts: Y axis—activity ranges between successive vaccine batches, X axis—vaccine batches. For X-charts: left Y axis—immunogenic activity of the batches (IU/mL), right Y axis— ED_{50} (mL), X axis—vaccine batches. The continuous line in the X-chart shows the vaccine immunogenic activity; the intermittent line— ED_{50} values of the pharmacopoeial reference standard of pertussis vaccine immunogenic activity. UCL and LCL—upper and lower control limits; CL—central line, σ —standard deviation. For X-charts continuous lines refer to the vaccine immunogenic activity graph; intermittent lines refer to the ED_{50} graph.

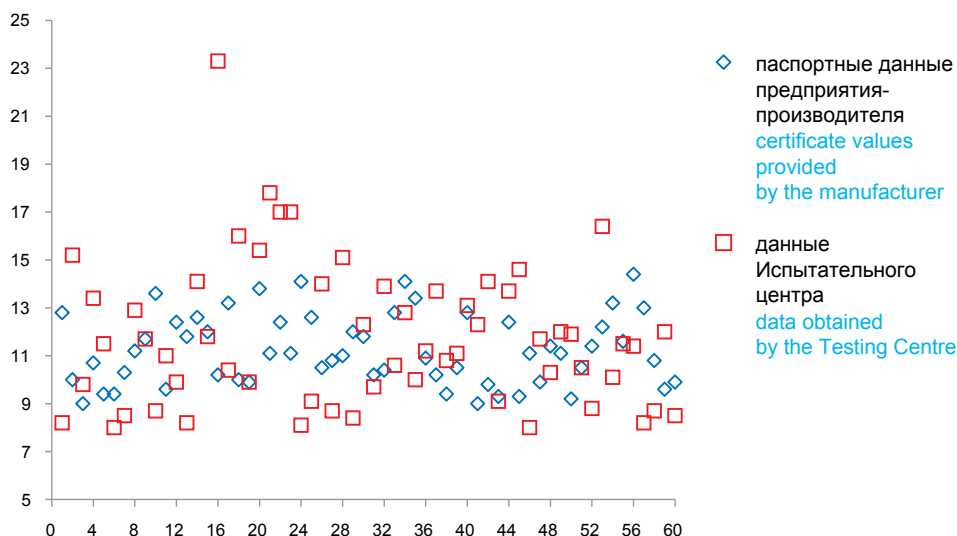


Рис. 2. Диаграмма рассеяния, отражающая взаимосвязь между показателями иммуногенной активности отдельных серий вакцины, полученными на предприятии-производителе и в Испытательном центре. Ось ординат — значения иммуногенной активности (МЕ/мл); ось абсцисс — порядковый номер серии.

Fig. 2. Scatter plot showing the correlation between the immunogenic activities of individual vaccine batches obtained by the manufacturer and the Testing Centre. Y axis—immunogenic activity (IU/mL), X axis—vaccine batch.

за анализируемый период неоднократно выходил из состояния статистической управляемости.

Тревожные сигналы, выявленные с помощью R-карты, были подтверждены результатами построенной X-карты, на которой выделено несколько сформированных критериев для особых причин (рис. 3В). Так, точки 4–12 формируют тренд, соответствующий критерию 2, точки 21–35 — критерию 7, точки 52, 53, 54, 56 — критерию 1, точки 55–59 — критерию 6. Кроме того, выявлены группы точек 13–20 и 33–37, демонстрирующие выраженную тенденцию к образованию критериев для особых причин: не хватает всего по одной точке для формирования критериев 2 и 3. Комбинация точек 38–51 представляет собой незавершенный критерий 7, а кроме того, эти точки имеют явную тенденцию к последовательному росту значений показателя, что впоследствии проявилось выходом точек за верхнюю контрольную границу. Следует отметить, что незавершенный критерий 2 непосредственно предшествовал завершённому критерию 7, а незавершенные критерии 3 и 7 — завершённым критериям 1 и 6.

Таким образом, за анализируемый период в технологическом процессе выявлена практически непрерывная цепь завершённых и незавершённых критериев для особых причин, что свидетельствует о потере предприятием состояния статистической управляемости процессом при производстве дифтерийного компонента. 53,3% выпущенных серий дифтерийного компонента были произведены в условиях воздействия необычных причин (рассчитано с учетом только завершённых критериев 2, 7, 1 и 6).

Необходимо отметить, что большинство точек R-карты, сигнализирующих о неблагоприятии производственного процесса, вошли в выявленные тренды на X-карте.

За анализируемый период предприятие выпустило 43,3% серий со значениями показателя активности, превышающими среднее арифметическое значение показателя, и, соответственно, 56,7% — со значениями ниже средней величины показателя.

Оценка стабильности производства столбнячного компонента АКДС-вакцины

Данные R-карты, построенной по значениям размахов показателя специфической активности столбнячного компонента, демонстрируют выход за пределы верхней контрольной границы точек 46 и 51, что сигнализирует о нарушении состояния статистического управления процессом (рис. 3С). Выходу за пределы границы предшествовали комбинации точек 12–16, 21–26 и 38–42, структура которых представляет собой незавершенный критерий 3.

Результаты анализа данных по построенной X-карте подтвердили тревожные сигналы R-карты (рис. 3D). На ней были выявлены группы точек 21–35 и 43–45, соответствующие критериям 7 и 5 соответственно, а также группы точек 36–39, 41, соответствующие незавершённому критерию 3. Необходимо отметить, что, как и в случае с дифтерийным компонентом, незавершенный критерий для особых причин предшествовал завершённому. Так, незавершенный критерий 3 (точки 36–39, 41) предшествовал завершённому критерию 5. О неблагоприятии процесса также говорит точка 51, максимально близко расположенная к верхней контрольной границе.

Взаимосвязь двух видов карт выражена через отражение критических структур R-карты в X-карте. Так, точки 21–26 карты значений размахов показателя активности и точка 46 вошли на X-карте в состав завершённых критериев 7 и 5 соответственно. Точка 51 R-карты, вышедшая за пределы границы, соответствует точке 51, максимально близко расположенной около верхней контрольной границы X-карты.

Анализ R- и X-карт позволил сделать заключение, что в течение анализируемого периода процесс производства столбнячного компонента АКДС-вакцины был подвержен воздействию необычных причин, в результате чего 18 из 60 серий, что составляет 30%, произведены в условиях, не соответствующих стабильным. 48,3% серий предприятие выпустило со значениями показателя активности, превосходящими среднее значение показателя, и 51,7% серий — со значением ниже средней величины.

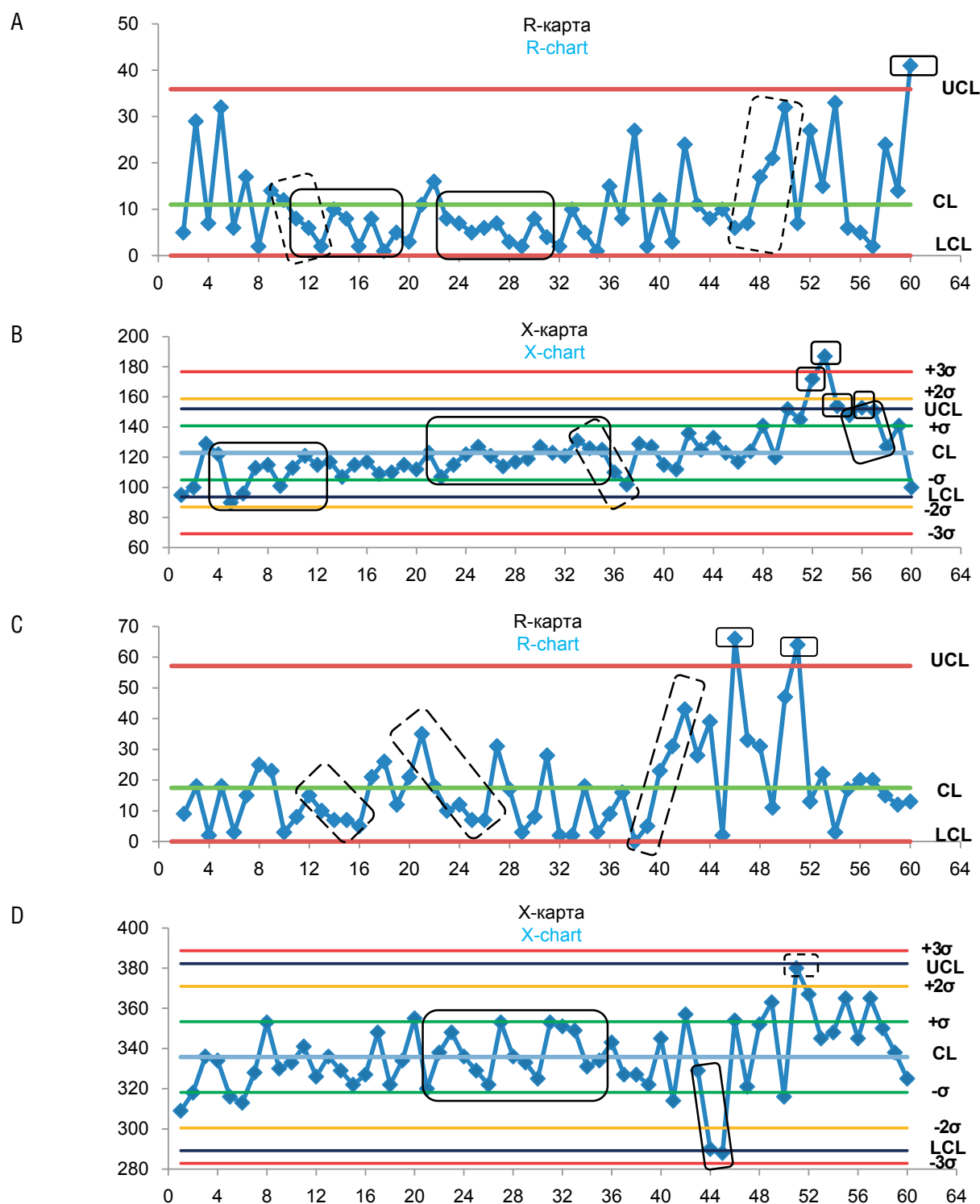


Рис. 3. R- и X-карты технологического процесса производства дифтерийного компонента АКДС-вакцины (паспортные данные предприятия-производителя) (А и В соответственно); R- и X-карты технологического процесса производства столбнячного компонента АКДС-вакцины (паспортные данные предприятия-производителя) (С и D соответственно). На R-картах ось ординат — значения размахов показателей активности между последовательными сериями вакцин; ось абсцисс — порядковые номера серий. На X-картах ось ординат — значения иммуногенной активности серий (МЕ/мл), ось абсцисс — порядковые номера серий. UCL и LCL — верхняя и нижняя контрольные границы; CL — центральная линия; σ — стандартное отклонение.

Fig. 3. R- and X-charts of the DTP diphtheria component technological process (release certificate provided by the manufacturer) (A and B respectively); R- and X-charts of the DTP tetanus component technological process (release certificate provided by the manufacturer) (C and D respectively). For R-charts: Y axis—activity ranges between successive vaccine batches, X axis—vaccine batches. For X-charts: Y axis—immunogenic activity of batches (IU/mL), X axis—vaccine batches. UCL and LCL—upper and lower control limits; CL—central line, σ —standard deviation.

Оценка состояния технологического процесса изготовления АКДС-вакцины, проведенная с использованием контрольных карт Шухарта, позволила установить, что производство препарата за 2,5 года наблюдения не всегда проходило в стабильных условиях. Так, для всех трех компонентов вакцины (коклюшного, дифтерийного и столбнячного) результаты анализа R-карты продемонстрировали нежелательные вариации значений показателя активности; результаты анализа X-карты — изменения в стабильности процесса. Это сигнализирует, что процесс в определенные промежутки времени был подвергнут воздействию особых (неслучайных) причин. В этой ситуации задача предприятия заключается в своевременном выявлении особых причин, их устранении и принятии мер по возвращению процесса в статистически управляемое состояние. Такая деятельность предприятия, направленная на восстановление стабильности производства, прослеживается в отношении коклюшного компонента. Так, по сравнению с ранее проведенным исследованием [12] число серий, изготовленных в условиях воздействия неслучайных причин, уменьшилось до 35% по сравнению с ранее установленными 50%.

Но, судя по представленным данным, предприятие не всегда успешно справлялось с возникающими проблемами. Наиболее тревожная ситуация была выявлена при производстве дифтерийного компонента. За период наблюдения (2,5 года) только 7 серий из 60 (11,7%) не были вовлечены в завершенные и приближенные к завершенным критерии для особых причин. По-видимому, контролирующие структуры предприятия по каким-то причинам не имеют возможности в полной мере активно проводить расследование выполненных не в стабильных условиях технологических операций и выявлять причины возникновения неконтролируемой изменчивости процесса. Предполагается, что расследование должно охватывать не только непосредственно сам технологический процесс, но и всю вспомогательную деятельность, связанную с процессом, включая контроль поступающих сырья и материалов, приготовление питательных сред, пробоподготовку, водо- и воздухоподготовку и многое другое. Это связано с тем, что необычная причина может возникнуть и проявить себя на любом этапе процесса. Важность выявления необычных причин очевидна. Если бы контролирующие структуры предприятия более внимательно отнеслись к анализу контрольных карт, в частности в отношении производства дифтерийного и столбнячного компонентов, то были бы выявлены явные тенденции к выходу процесса из состояния статистической управляемости, которые проявлялись незавершенными критериями для особых причин. Своевременно предприняв необходимые действия, можно было не допустить выход процесса из состояния стабильности.

Длительное нахождение процесса в состоянии статистической неуправляемости, по нашему мнению, сказалось на результатах проведенного анализа по корреляции данных по активности коклюшного компонента, полученных на предприятии и в ИЦ. По-видимому, это обусловлено тем, что при статистически неуправляемом состоянии процесса, то есть в условиях неконтролируемой изменчивости, конечная продукция характеризуется значительной неоднородностью, что не могло не повлиять на результаты контроля, проведенного на предприятии и в ИЦ. Вопрос, связанный с необходимостью получения на предприятии и в лаборатории контролирующего органа сходных результатов (при испытаниях одних и тех же серий препарата), является чрезвычайно важным, но может быть решен только после того, как предприятие восстановит состояние статистического управления процессом

производства, что будет гарантировать выпуск однородной продукции. При этом большое внимание следует уделить совершенствованию процедуры пробоботбора, вопросам как стандартизации операционных процедур, так и условий проведения испытаний.

Нестабильная ситуация при производстве препаратов опасна также тем, что возрастает опасность изготовления бракованных препаратов. Тем не менее, согласно данным сводных протоколов предприятия-производителя, а также результатам, полученным в ИЦ, произведенные и выпущенные предприятием за анализируемый период серии АКДС-вакцины по специфической активности, а также и по другим показателям спецификации соответствовали требованиям НД. Итог влияния неслучайных причин на технологический процесс неизвестен: информации о браке на производстве ИЦ не имеет.

Таким образом, использованные в данном исследовании контрольные карты Шухарта позволили оценить состояние производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины. Данный метод, позволяющий осуществлять статистическое управление качеством, при всей своей кажущейся простоте чрезвычайно эффективен, направлен на предупреждение потерь и позволяет избежать производства некачественной продукции. С помощью контрольных карт в режиме реального времени можно быстро выявить ошибки в технологическом процессе, а посредством своевременного вмешательства в процесс возможно избежать их накопления и воздействовать на качество продукции. В связи с этим непрерывный мониторинг технологических операций является неотъемлемой частью статистического управления процессом производства, так как направлен на снижение вариабельности технологического процесса, что в итоге должно обеспечить выпуск более однородной и качественной продукции. Предприятие, использующее статистическую систему управления качеством, способно увеличить объем выпускаемой продукции, добиться повышения производительности труда, обеспечить существенное снижение расходов на качество и повысить свою конкурентоспособность.

Выводы

1. Проведенная оценка стабильности производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины с помощью контрольных карт Шухарта продемонстрировала, что в течение периода сентябрь 2017 — апрель 2020 г. технологический процесс неоднократно выходил из состояния статистической управляемости.
2. Отсутствие корреляционной связи между результатами испытаний, полученными на предприятии — производителе вакцины и в Испытательном центре, должно стимулировать совместные исследования, направленные на стандартизацию как условий производства, так и условий проведения контроля произведенной продукции.

Вклад авторов. *И. А. Алексеева* — идея исследования, обобщение материала, написание, доработка текста рукописи; *О. В. Перельгина* — окончательное утверждение версии рукописи для публикации; *Е. Д. Колышкина* — сбор и систематизация данных, анализ и интерпретация результатов исследования, оформление графического материала.

Authors' contributions. *Irina A. Alekseeva*—elaboration of the study idea, summarising the data, writing and editing of the paper; *Olga V. PereLygina*—approval of the final version of the paper for publication; *Elena D. Kolyshkina*—collection and systematisation of data, analysis and interpretation of the study results, preparation of the graphic materials.

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

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

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

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

Литература / References

1. Юнасова ТН, Горенков ДВ, Рукавишников АВ, Мовсесянц АА, Меркулов ВА. Анализ заболеваемости корью в России и проблемы профилактики кори на этапе элиминации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(3):154–60. [Yunasova TN, Gorenkov DV, Rukavishnikov AV, Movsesyants AA, Merkulov VA. Analysis of Measles Incidence in Russia and Problems of Measles Prevention at the Elimination Stage. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(3):154–60 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-154-160>
2. Соловьев МЮ, Ковалев ЕВ, Ненадская СА, Мирошниченко ГА, Воронникова ИС, Слис СС и др. Об актуальных вопросах иммунопрофилактики инфекционных болезней. *Главный врач Юга России*. 2015;(4):6–9. [Solovyev MYu, Kovalev EV, Nenadskaya SA, Miroshnichenko GA, Voronnikova IS, Slis SS, et al. About actual questions of immunoprophylaxis of infectious diseases. *Glavnyy vrach Yuga Rossii* = *Chief Doctor of the South of Russia*. 2015;(4):6–9 (In Russ.)]
3. Покровский ВИ, Онищенко ГГ, Черкасский БЛ, Ковалева ЕП, Брико НИ, Сергиев ВП и др. *Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке: руководство для врачей*. М.: Медицина; 2003. [Pokrovskij VI, Onishchenko GG, Cherkasskij BL, Kovaleva EP, Briko NI, Sergiev VP, et al. *Evolution of infectious diseases in Russia in the XX century: a guide for doctors*. Moscow: Medicina; 2003 (In Russ.)]
4. Shewhart WA. Economic control of quality of manufactured product. New York: D Van Nostrand Reinhold Company, Inc.; 1931.
5. Shewhart WA. Statistical method from the viewpoint of quality control New York: Dover Publ., Inc.; 1986.
6. Адлер ЮП, Жулинский СФ, Шпер ВЛ. Проблемы применения методов статистического управления процессами на отечественных предприятиях. *Методы менеджмента качества*. 2009;8:36–40. [Adler YuP, Zhulinsky SF, Shper VL. Problems of using methods of statistical process control at domestic enterprises *Metody menedjmenta kachestva* = *Methods of Quality Management*. 2009;8:36–40 (In Russ.)]
7. Седдон Дж. *Свобода от приказов и контроля. Путь к эффективному сервису*. Пер. с англ. М.: РИА «Стандарты и качество»; 2009. [Seddon J. *Freedom from Command and Control. Rethinking Management for Lean Service*. Moscow: Standards and quality; 2009 (In Russ.)]
8. Батчиков СА, Глазьев СЮ, ред. *Эффективность государственного управления*. Пер. с англ. М.: Фонд «За экономическую грамотность», Российский экономический журнал, Изд. АО «Консалтбанк»; 1998. [Batchikov SA, Glazev SYu, Eds. *Effectiveness of public administration*. Moscow: Foundation "For Economic Literacy", Russian Economic Journal, "Consultbanker"; 1998 (In Russ.)]
9. Колышкин ВМ, Васильев АВ. Оценка стабильности производства коревой вакцины. *Биотехнология*. 2008;1:57–63. [Kolyshkin VM, Vasiliev AV. Assessment of the stability of the measles vaccine production. *Biotechnologiya* = *Biotechnology*. 2008;1:57–63 (In Russ.)]
10. Колышкин ВМ, Васильев АВ. Оценка стабильности производства ассоциированной паротитно-коревой вакцины. *Биотехнология*. 2008;4:64–8. [Kolyshkin VM, Vasiliev AV. Assessment of stability of mumps-measles associated vaccine production. *Biotechnologiya* = *Biotechnology*. 2008;4:64–8 (In Russ.)]
11. Колышкин ВМ, Васильев АВ. Оценка стабильности производства паротитной вакцины. *Биотехнология*. 2008;5:68–75. [Kolyshkin VM, Vasiliev AV. Assessment of the anti-mumps vaccine manufacturing stability. *Biotechnologiya* = *Biotechnology*. 2008;5:68–75 (In Russ.)]
12. Алексеева ИА, Перельгина ОВ, Колышкина ЕД. Оценка стабильности производства коклюшного компонента АКДС-вакцины по показателям иммуногенной активности и специфической безопасности с использованием карт Шухарта. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(4):243–8. [Alekseeva IA, Perelygina OV, Kolyshkina ED. Estimation of consistency of production of the pertussis component of DTP vaccine in terms of immunogenic activity and specific safety using Shewhart charts. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(4):243–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-243-248>
13. Васин ЛА, Нечаев ЮВ. Проблемы применения метода Шухарта для мониторинга технологических процессов. *Известия Тульского государственного университета. Технические науки*. 2013;5:133–40. [Vasin LA, Nechaev JV. Quandaries of a Shewhart method application for technological process monitoring. *Izvestiya Tula State University (Izvestiya TulGU)* = *Proceedings of the Tula State University. Technical science*. 2013;5:133–40 (In Russ.)]
14. Максимова ОВ, Шпер ВЛ. Исследование эффективности работы контрольных карт Шухарта. *Методы менеджмента качества*. 2010;12:40–5. [Maksimova OV, Shper VL. Quandaries of a Shewhart method application for technological process monitoring. *Metody menedjmenta kachestva* = *Methods of Quality Management*. 2010;12:40–5 (In Russ.)]
15. Уилер Д, Чамберс Д. *Статистическое управление процессами: Оптимизация бизнеса с использованием контрольных карт Шухарта*. М.: Альпина Бизнес Букс; 2009. [Wheeler D, Chambers D. *Understanding Statistical Process Control*. Moscow: Alpina Business Books; 2009 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

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

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

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

Поступила 06.04.2021

После доработки 05.10.2021

Принята к публикации 10.12.2021

Received 6 April 2021

Revised 5 October 2021

Accepted 10 December 2021

Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе

Е. И. Рябова, А. А. Деркаев, И. Б. Есмагамбетов*, Д. В. Щебляков, М. А. Довгий, Д. В. Бырихина,
В. В. Прокофьев, И. П. Чемоданова

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

Векторы на основе аденоассоциированного вируса являются одними из наиболее перспективных для доставки трансгенов в различные органы и ткани. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) способен трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, обладает низкой иммуногенностью и способен обеспечивать долгосрочную экспрессию трансгенов. На сегодняшний день существуют технологии, позволяющие получать rAAV для применения *in vivo*, однако они не лишены недостатков, связанных с трудоемкостью, сложностями масштабирования и высокой стоимостью, поэтому вопрос об усовершенствовании технологических схем получения rAAV является актуальным. **Цель работы:** сравнение технологических подходов к получению rAAV, основанных на различных условиях культивирования трансфицированной клеточной линии HEK293 в лабораторном масштабе. **Материалы и методы:** в исследовании использовали культуру клеток HEK293, плазмидную систему AAV-DJ Packaging System, систему PlasmidSelect Xtra Starter Kit. В качестве модели для сравнения технологий использовали вектор rAAV с трансгеном однодоменного антитела, слитого с Fc-фрагментом IgG1, специфичного к ботулотоксину. Применяли метод трансфекции клеток HEK293 суперскрученной плазмидной ДНК, выделенной при помощи трехступенчатой хроматографической очистки. Определение подлинности препарата rAAV проводили методами электрофореза, иммуноблоттинга и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. **Результаты:** продемонстрирована эффективность получения суперскрученной формы плазмидной ДНК, применимой для эффективной трансфекции с целью получения rAAV. Проведено сравнение процесса транзientной трансфекции и культивирования трансфицированных клеток HEK293 в условиях суспензии в колбах, адгезии в культуральных флаконах и адгезии в биореакторе BioBLU 5p на матрице из дисков Fibra-Cel с целью продукции rAAV. **Выводы:** показана возможность применения описанных подходов к очистке плазмидной ДНК, трансфекции и культивированию трансфицированных клеток в различных условиях для получения препарата rAAV, эспрессирующего ген антитела. Реактор BioBLU 5p с дисками Fibra-Cel был впервые использован для получения препаративных количеств rAAV в лабораторном масштабе, что позволило увеличить площадь поверхности адгезии при культивировании и трансфекции клеток и, как следствие, увеличить выход целевого продукта.

Ключевые слова: аденоассоциированный вирусный вектор; однодоменные антитела; трансфекция; аффинная хроматография; культура клеток HEK293; биореактор; суперскрученная форма плазмидной ДНК

Для цитирования: Рябова ЕИ, Деркаев АА, Есмагамбетов ИБ, Щебляков ДВ, Довгий МА, Бырихина ДВ, Прокофьев ВВ, Чемоданова ИП. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(4):266–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>

* **Контактное лицо:** Есмагамбетов Ильяс Булатович; esmagambetovib@gmail.com

Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale

E. I. Ryabova, A. A. Derkaev, I. B. Esmagambetov*, D. V. Shchelyakov, M. A. Dovgiy, D. V. Byrikhina,
V. V. Prokofiev, I. P. Chemodanova

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

Adeno-associated virus vectors are among the most promising ones for the delivery of transgenes to various organs and tissues. Recombinant adeno-associated virus (rAAV) is able to transduce both dividing and non-dividing cells, has low immunogenicity, and is able to provide long-term expression of transgenes. Modern technologies make it possible to obtain rAAV for *in vivo* use, but they are not without drawbacks associated with laboriousness, scalability difficulties, and high cost, therefore, improvement of technological schemes for obtaining rAAV is an urgent issue. **The aim of the study** was to compare different technological approaches to rAAV production based on different conditions of the transfected HEK293 cell line cultivation on a laboratory scale. **Materials and methods:** HEK293 cell culture, AAV-DJ Packaging System, PlasmidSelect Xtra Starter Kit were used in the study. The technologies were compared using a model rAAV vector with a single-domain antibody transgene fused to the Fc-fragment of IgG1 specific to botulinum toxin. HEK293 cells were transfected with supercoiled plasmid DNA isolated by three-step chromatographic purification. The identity of the rAAV preparation was determined by electrophoresis, immunoblotting, and real-time polymerase chain reaction. **Results:** the study demonstrated the efficiency of the chromatographic method for obtaining a supercoiled form of plasmid DNA that can be used for efficient transfection of cell culture in order to produce rAAV. The study compared the following processes of rAAV production: using transient transfection and cultivation of the transfected HEK293 cell suspension in Erlenmeyer flasks,

adherent culture in T-flasks, and adherent culture in a BioBLU 5p bioreactor on a matrix of Fibra-Cel disks. **Conclusions:** the data obtained showed the possibility of using the described approaches to purification of plasmid DNA, cell transfection, and cultivation of the transfected cells under various conditions to obtain rAAV samples that expresses the antibody gene. The BioBLU 5p reactor with Fibra-Cel discs was used for the first time to produce preparative quantities of rAAV on a laboratory scale, which increased the adherent surface area during cell culture and transfection, and, as a result, increased the yield of the target product.

Key words: adeno-associated viral vector; single domain antibodies; transfection; affinity chromatography; HEK293 cell culture; bioreactor; supercoiled form of plasmid DNA

For citation: Ryabova EI, Derkaev AA, Esmagambetov IB, Shcheblyakov DV, Dovgiy MA, Byrikhina DV, Prokofiev VV, Chemodanova IP. Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(4):266–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>

*Corresponding author: Ilias B. Esmagambetov; esmagambetovib@gmail.com

Аденоассоциированный вирус (AAV) принадлежит к роду *Dependoparvovirus* семейства вирусов *Parvoviridae*. Геном содержит одноцепочечную ДНК размером ~4,8 т.п.н. [1]. Особенностью AAV является зависимость его репликации от наличия в клетках аденовируса или вируса герпеса благодаря изменению характеристики клеточной среды в результате коинфекции. Геном AAV содержит гены *rep*, *cap* и *aap*: ген *rep* кодирует белки, необходимые для репликации и упаковки вирусного генома, ген *cap* — вирусные капсидные белки (VP1, VP2, VP3), образующие внешнюю оболочку капсида, защищающую вирусный геном [2]. Ген *aap* кодирует белок (AAP), активирующий сборку.

Для создания терапевтических препаратов используются рекомбинантные AAV (rAAV), в которых гены *rep* и *cap* заменены кассетой экспрессии трансгена. В отсутствие Rep белков кодируемые в rAAV трансгены могут образовывать кольцевые конкатемеры, которые сохраняются в виде эписом в ядре трансдуцированных клеток [3].

Одним из преимуществ использования rAAV является его низкая иммуногенность в сравнении с лентивирусными и аденовирусными векторами доставки. Причина этого до конца не изучена, однако предполагается, что AAV неэффективны в отношении активации антигенпрезентирующих клеток [4]. Благодаря этому векторы на основе AAV широко используются для создания терапевтических препаратов, требующих длительной экспрессии. Кроме того, AAV свободны от ряда недостатков других векторных систем. Известно, что лентивирусные векторы неспецифически интегрируются в геном клетки-хозяина, а аденовирусные — имеют высокий воспалительный потенциал, что вызывает сложности при их клиническом применении в качестве генотерапии [5].

При всех представленных преимуществах rAAV обладают и недостатками, такими как малая емкость генома, высокие трудозатраты и себестоимость при его получении [5]. Кроме того, на продукцию rAAV влияют многие факторы, включая клеточную линию, систему экспрессии, продолжительность культивирования трансфицированных клеток, общие условия культивирования и качество плазмидной ДНК [6].

Исходя из этого, для получения препаратов на основе rAAV необходимо наличие отработанной и масштабируемой технологии. Наибольшее практическое применение нашли методы, основанные на временном (транзентном) трансфицировании клеток, поскольку они обеспечивают больший выход продукта [7], а также позволяют получить безопасный и эффективный препарат rAAV, экспрессирующий трансген [8]. Данный метод включает трансфекцию клеток HEK293 двумя или тремя плазмидами: первая кодирует целевой ген, вторая несет гены *rep*

и *cap* AAV, третья содержит гены-помощники адено- или герпесвирусов.

Помимо этого, препараты rAAV на основе транзентной трансфекции апробированы для клинического применения, и сегодня существует несколько препаратов, находящихся на разных стадиях клинических исследований, из которых были зарегистрированы Glybera¹, Luxturna² и Zolgensma³ [9]. Однако позже препарат Glybera был снят с производства по причине высокой стоимости технологии. Таким образом, оптимизация и сравнение различных технологий получения rAAV является актуальной задачей.

В данной работе в качестве модели для сравнения технологий получения rAAV выбран rAAV, экспрессирующий однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1, специфичное к ботулиническому нейротоксину, полученное как описано S.A. Godakova с соавт. [10]. Нами впервые применен подход трехступенчатой очистки суперскрученной плазмидной ДНК (плазмидной scДНК), используемой для эффективной транзентной трансфекции клеток HEK293 с целью получения rAAV. Кроме того, было проведено сравнение трех подходов культивирования транзентно трансфицированных клеток HEK293: в условиях адгезии клеток — в культуральных флаконах и в биореакторе BioBLU, а также в виде суспензии в колбах. После тангенциальной фильтрации и хроматографической очистки препарата rAAV проводили его качественную и количественную характеристику.

Цель работы — сравнение технологических подходов к получению rAAV, основанных на различных условиях культивирования трансфицированной клеточной линии HEK293 в лабораторном масштабе. В ходе работы были поставлены следующие задачи: получение плазмидных scДНК в препаративных количествах; проведение транзентной трансфекции клеток HEK293 в различных условиях с целью продукции rAAV, экспрессирующего антитело; получение очищенного препарата rAAV; характеристика чистоты, подлинности и трансдуцирующей активности полученного препарата rAAV.

Материалы и методы

Материалы

Культура клеток почки эмбриона человека HEK293 (получена из коллекции клеточных культур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), компетентные бактерии *E. coli* (DH5α, Invitrogen, США), плазмидная система AAV-DJ Packaging System (Cell Biolabs Inc, США), бактериальная среда (2YT Sigma-Aldrich, США), среда для культивирования HEK293 CDM4HEK293 (Cytiva Life Sciences, HyClone, Швеция), среда для трансфекций Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco,

¹ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera>

² <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/luxturna>

³ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zolgensma>

Thermo Fisher Scientific, США), среда DMEM (Gibco, США), среда BalanCD (Irvine Scientific, США), сорбент AVB Sepharose (Cytiva Life Sciences, Швеция), 2-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США), Твин-20 (Sigma-Aldrich, США), поликлональные кроличьи антитела к AAV (adeno-associated virus 2/AAV2 (VP1 + VP2 + VP3) rabbit polyclonal antibody, OriGene, США), HRP-конъюгированные антикроличьи антитела (HRP-conjugated anti-rabbit IgG, Sigma-Aldrich, США), антитела к IgG человека (Fc-специфические) (anti-human IgG, Fc-specific, peroxidase goat antibody, Sigma-Aldrich, США), система ECL Substrate (BioRad, США), краситель для образцов (4x Laemmli Sample Buffer, BioRad, США), обезжиренное молоко (Sigma-Aldrich, США); остальные реактивы, использованные для приготовления буферов, производства Sigma-Aldrich, США.

Оборудование

Автоматический счетчик клеток TC20 Cell Counter (BioRad, США), установка тангенциальной фильтрации AKTA flux S (Cytiva Life Sciences, Швеция), хроматографическая система AKTA Pure 25 (Cytiva Life Sciences, Швеция), спектрофотометр NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, США), шейкер-инкубатор Multitron (Infors HT, Швейцария), биореактор BioFlo 320 (Eppendorf, Германия), инвертированный флуоресцентный микроскоп CKX41 (Olympus).

Методы

Получение плазмидных конструкций. Для получения rAAV использовали плазмидную систему AAV-DJ Packaging System, состоящую из плазмид pAAV-DJ Vector, pHelper Vector и pAAV-GFP Control Vector. Плаزمида pAAV-DJ Vector несет в себе гены *гер*, необходимые для репликации, и *сар*, кодирующие белки капсиды. Плазмида pHelper Vector содержит большую часть аденовирусного генома, необходимого для сборки инфекционных rAAV (гены белков E2A, E4 и вирус-ассоциированная РНК).

Рекомбинантное одномономерное антитело, слитое с Fc-фрагментом, специфичное к ботулиническому нейротоксину, было получено, как описано S.A. Godakova с соавт. [10]. Нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, синтезировали в ЗАО «Евроген» (Россия) и клонировали в плазмиду pAAV-EGFP Control Vector, заменяя ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP) по сайтам рестрикции EcoRI и XbaI и получая таким образом плазмиду pAAV-B11-Fc.

Получение плазмидных scДНК в препаративных количествах. Для получения плазмидных scДНК проводили трансформацию компетентных бактерий *E. coli* целевыми плазмидами методом теплового шока [11], отбор клонов-трансформантов на селективной питательной среде (агаризованная среда 2YT с добавлением ампициллина 50 мкг/мл) и культивирование отобранного клона на жидкой среде 2YT в течение 16 ч при 37 °C при скорости перемешивания 210 об/мин в объеме 1 л для каждой плазмиды.

Бактерии лизировали согласно стандартной методике Бирнбойма и Доли [12]. Клетки из бактериальной культуры осаждали центрифугированием (20 мин, 4500 g) при температуре 4 °C. Осажденную бактериальную культуру ресуспендировали в 100 мл буфера (25 mM трис-HCl, 10 mM ЭДТА, 50 mM глюкозы, pH 7,5) в соотношении 10 мл буфера на 1 г осадка. К суспензии добавляли 100 мл лизирующего буфера, аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин (200 mM NaOH, 1% SDS). Далее проводили нейтрализацию лизирующего буфера путем добавления ацетатного буфера (3 M ацетат калия, pH 5,5), аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин. Далее лизат центрифугировали при 10000 g 20 мин и концентрировали в 10 раз при помощи

тангенциальной фильтрации на установке AKTA flux S и картриджа Hollow Fiber Cartridge, 300 kDa (Cytiva Life Sciences, Швеция). Дальнейшее выделение scДНК проводили на приборе AKTA Pure 25 с использованием системы Capto PlasmidSelect Xtra Starter Kit (Cytiva Life Sciences, Швеция), состоящей из трех последовательных стадий хроматографической очистки: гель-фильтрация на сорбенте Sepharose 6 FF, аффинная хроматография на сорбенте Capto PlasmidSelect Xtra и анионообменная хроматография на сорбенте Source 30Q. Все стадии хроматографической очистки проводили согласно инструкции фирмы-производителя. После этого плазмидную scДНК переосаждали добавлением 1/10 объема 3 M ацетата натрия и 2 объемов этанола, затем растворы замораживали (1 ч, –80 °C) и центрифугировали (0,5 ч, 12000 g). Осажденную scДНК растворяли в 200 мкл стерильной очищенной деионизированной воды. Количественное измерение ДНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000C при длине волны 260 нм.

Электрофорез в агарозном геле. Образцы плазмидной scДНК анализировали методом горизонтального электрофореза в TAE буфере (40 mM Трис-HCl, 20 mM уксусная кислота и 1 mM ЭДТА, pH 8,0) в 0,8% агарозном геле с бромидом этидия (0,5 мкг/мл) в качестве окрашивающего вещества при напряжении 120 В.

Культивирование клеток. Адгезионную культуру клеток HEK293 культивировали в среде DMEM с добавлением 5 mM L-глутамина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), используя культуральные флаконы площадью 175 см² (Corning, США) при 37 °C, 80% влажности и 5% CO₂. Суспензионную культуру клеток HEK293 получали путем адаптации клеток к среде CDM4HEK293 с добавлением 2,0 г/л бикарбоната натрия, 5 mM L-глутамина, ежедневно заменяя 30% среды на CDM4HEK в течение 7 суток. Далее клетки перемещали в колбы Эрленмейера с вентилируемой крышкой объемом 1000 мл (Corning, США), и культивировали с помощью шейкер-инкубатора Multitron со скоростью перемешивания 110–130 об/мин при амплитуде 50 мм. Культивирование проводили при 37 °C, 80% влажности и 5% CO₂.

Трансфекция клеток HEK293. Для трансфекции клеток HEK293 использовали полученные плазмидные scДНК pAAV-DJ Vector, pAAV-DJ-Helper и pAAV-B11-Fc в соотношении 1:1:1. В качестве положительного контроля использовали плазмиду pAAV-DJ EGFP, применяя ее вместо pAAV-B11-Fc, в отдельной колбе/флаконе с аналогичным объемом и концентрацией клеток. Для оценки качества трансфекции клеток при культивировании на дисках Fiba-Cel использовали отдельную 150 см² культуральную чашку, содержащую 0,75 г простерилизованных дисков Fiba-Cel и инокулированную клетками (0,5×10⁶ клеток в 12,5 мл среды DMEM). Общая концентрация плазмидной scДНК, используемой для трансфекции, составляла 1 мкг/мл культуральной жидкости. В качестве среды для приготовления трансфекционной смеси использовали Opti-MEM I Reduced Serum Medium в объеме 10% от конечного объема среды. Трансфекцию проводили с использованием раствора трансфицирующего агента полиэтиленимин (PEI) в концентрации 1 мг/мл. Объем PEI брали исходя из количества плазмидной scДНК в соотношении 1:4. Время инкубации агента с scДНК составляло 7 мин.

Продукция rAAV в суспензионных условиях культивирования клеток HEK293. За 7 суток до трансфекции клетки адаптировали к среде BalanCD HEK293 в колбах Эрленмейера объемом 1000 мл. За 2 ч до трансфекции клеток в суспензионных условиях проводили полную замену среды на свежую и рассеивали клетки до концентрации 1×10⁶/мл в объеме 1 л;

трансфицировали, как описано в подразделе «Трансфекция клеток HEK293». Эффективность трансфекции оценивали по уровню экспрессии репортерного гена белка EGFP. Через 48 ч в среду добавляли 4 г/л раствора глюкозы. pH среды регулировали путем добавления 7,5% раствора бикарбоната натрия. Через 72 ч проводили сбор rAAV путем осаждения клеток при 200 g в течение 10 мин и дальнейшего их лизиса путем ресуспендирования осадка в буфере объемом 100 мл (1% твин-20, 20 mM трис-HCl, 50 mM хлорида натрия, 2 mM хлорида магния, бензонуклеаза 20 U/мл) и инкубации в течение 4 ч при периодическом перемешивании.

Производство rAAV в адгезионных условиях культивирования клеток HEK293. За сутки до трансфекции клетки, культивировавшиеся в условиях адгезии, пересевали в 30 культуральных флаконов 175 см² (Corning, США) в объеме 35 мл в концентрации 16×10^6 /флакон (~70% конфлюэнтности) с использованием питательной среды DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 4 mM L-глутамина, 4,5 г/л глюкозы и 3,7 г/л бикарбоната натрия. Клетки во флаконах культивировали при 37 °C, 80% влажности и 5% CO₂. За 2 ч до трансфекции проводили полную замену среды на свежую; трансфицировали, как описано в подразделе «Трансфекция клеток HEK293». Через 24 ч после трансфекции проводили замену 30% среды на свежую для снижения эффекта токсичности трансфицирующего агента. Эффективность трансфекции оценивали по уровню экспрессии репортерного гена белка EGFP. Через 48 ч в среду добавляли 4 г/л раствора глюкозы. pH среды регулировали путем добавления 7,5% раствора бикарбоната натрия. Через 72 ч проводили сбор rAAV путем замены среды на буфер для лизиса в объеме 15 мл для каждого флакона (1% твин-20, 20 mM трис-HCl, 50 mM хлорида натрия, 2 mM хлорида магния, бензонуклеаза 20 U/мл) и инкубировали 4 ч при периодическом перемешивании.

Производство rAAV в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 на дисках Fibracel. Для адгезионного культивирования клеток HEK293 использовали биореактор BioFlo 320 с одноразовым сосудом BioBLU 5p (Eppendorf, Германия) с рабочим объемом 2,5 л, наполненным дисками Fibracel (Eppendorf, Германия). Для культивирования использовали среду DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 4 mM L-глутамина, 4,5 г/л глюкозы и 3,7 г/л бикарбоната натрия. Концентрация клеточного инокулята составляла $0,5 \times 10^6$ /мл. Культивирование проводили при 37 °C, 5% CO₂; скорость перемешивания подбирали для достижения максимальной концентрации растворенного кислорода в пределах 30–80%. Через 24 ч после закрепления клеток на дисках Fibracel проводили трансфекцию, как описано в подразделе «Трансфекция клеток HEK293». Эффективность трансфекции оценивали путем отбора культуральной жидкости через 30 мин после проведения трансфекции и заменяя ей культуральную среду на посеянных заранее клетках в культуральном флаконе площадью 25 см² на среде DMEM. Через 48 ч культивирования в среду добавляли 4 г/л раствора глюкозы. pH среды регулировали подачей CO₂ и путем добавления 7,5% раствора бикарбоната натрия. Через 72 ч проводили сбор rAAV путем удаления среды из сосуда, заменяя ее на буфер для лизиса клеток в объеме 2,5 л (1% твин-20, 20 mM трис-HCl, 50 mM хлорида натрия, 2 mM хлорида магния, бензонуклеаза 20 U/мл). Раствор оставляли на 4 ч при 37 °C при постоянном перемешивании.

Тангенциальная фильтрация и хроматографическая очистка rAAV. Полученные на предыдущих этапах растворы клеточных лизатов фильтровали с помощью стерилизующего картриджа Sartopore 2 0,45/0,22 мкм (Sartorius Stedim, Франция). Лизаты

концентрировали в 10 раз и диалитировали 5 раз с использованием буфера 0,5 M NaCl, 0,02 M Трис-HCl, pH 7,5 с помощью системы тангенциальной фильтрации AKTA flux S (Cytiva Life Sciences, GE, Швеция) и картриджа Hollow Fiber Cartridge, 100 kDa (Cytiva Life Sciences, Швеция). Очистку rAAV из лизата проводили методом аффинной хроматографии с использованием хроматографической колонки XK16/20 (Cytiva Life Sciences, Швеция), упакованной 5 мл сорбента AVB Sepharose, согласно инструкции производителя. Уравновешивание и промывку колонки проводили связывающим буфером (20 mM Трис-HCl, 500 mM хлорид натрия, pH 8,0). Элюцию проводили в изократическом режиме буфером 0,1 M глицин-HCl, 500 mM хлорид натрия, pH 2,5. Полученный препарат rAAV концентрировали с использованием центрифужных концентраторов 50 кДа Amicon Ultra-15 (Merck, США) и стерилизовали, используя мембранный фильтр 0,22 мкм (MF-Millipore, Merck, США).

Концентрацию вирусных частиц в препарате rAAV оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 при длине волны 260 нм. Соотношение пустых и полных капсидов в образцах определяли спектрофотометрически по отношению поглощения при длинах волн 260 нм/280 нм.

Оценка чистоты препарата rAAV методом электрофореза. Чистоту препарата оценивали методом электрофореза в 4–20% полиакриламидном геле (4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, Bio-Rad, США) с использованием красителя для образцов 4x Laemmli Sample Buffer с добавлением 2-меркаптоэтанола для анализа в восстанавливающих условиях.

Оценка подлинности препарата rAAV методом иммуноблоттинга. Образцы препарата rAAV после очистки подвергали разделению в полиакриламидном геле (подраздел «Оценка чистоты препарата rAAV методом электрофореза») с последующим иммуноблоттингом. Перенос белков на мембрану (Amersham Protran Premium 0.45 µm NC, GE Healthcare Life science, Швеция) проводили с использованием прибора Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США). Далее мембрану инкубировали в 5% растворе обезжиренного молока в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% Твин-20 (буфер ПБС-Т), для блокирования неспецифической сорбции. Затем в раствор добавляли первичные поликлональные кроличьи антитела к AAV (adeno-associated virus 2/AAV2 (VP1 + VP2 + VP3) rabbit polyclonal antibody в соотношении 1:1000 и инкубировали в течение 60 мин, после чего проводили трехкратную отмывку мембраны в ПБС-Т. Затем в свежий раствор ПБС-Т добавляли вторичные HRP-конъюгированные антикроличьи антитела (HRP-conjugated anti-rabbit IgG) в соотношении 1:2500 и инкубировали в течение 60 мин, после чего проводили пятикратную отмывку мембраны в ПБС-Т и визуализировали результаты, используя систему ECL Substrate и Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Швеция).

Оценка количества геномных копий в препаратах rAAV. Определение количества геномных копий rAAV в полученных после хроматографической очистки препаратах проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) и флуоресцентного метода с помощью систем AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 и QuickTiter™ AAV Quantitation Kit (Cell Biolabs, США) согласно протоколам фирм-производителей.

Оценка экспрессии трансгена антитела в составе rAAV, трансдуцированного в клетки HEK293. Для оценки трансдуцирующей способности и экспрессии трансгена в составе rAAV проводили трансдукцию клеток HEK293 с использованием очищенного препарата rAAV. Для этого на 96-луночный планшет высевали клетки HEK293 в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл

в среде DMEM (4 мМ глутамина, 10% FBS, бикарбонат натрия 3,8 г/л) в объеме 100 мкл. Спустя 4 ч вносили 10 мкл очищенных образцов препарата rAAV, полученных в различных условиях культивирования (концентрации сравниваемых препаратов rAAV выравнивали по количеству геномных копий до наименьшей из полученных). Спустя 48 ч отбирали культуральную жидкость для дальнейшего анализа.

Культуральную жидкость оценивали с помощью электрофореза (согласно описанию в подразделе «Оценка чистоты препарата rAAV методом электрофореза») и иммуноблоттинга (согласно описанию в подразделе «Оценка подлинности препарата rAAV методом иммуноблоттинга») с использованием антител к IgG человека (Fc-специфических) (anti-human IgG, Fc-specific, peroxidase goat antibody) в соотношении 1:2500.

Результаты и обсуждение

Разработка схемы эксперимента

В настоящее время для получения rAAV методом транзиторной трансфекции возможно применение нескольких подходов с использованием различных систем экспрессии. Нами была выбрана трехплазмидная система экспрессии rAAV, исходя из преимуществ, представленных в таблице 1.

В работе использовали плазмидную систему AAV-DJ, позволяющую осуществлять сборку векторного вируса rAAV, содержащего интересующий трансген, без необходимости использования вируса-помощника (аденовируса), поскольку одна из плазмид (rAAV-DJ-Helper) несет гены аденовируса, необходимые для правильной упаковки AAV. Особенностью системы AAV-DJ является экспрессия гибридного капсида, содержащего белки различных нативных серотипов: AAV-2, AAV-4, AAV-5, AAV-8, AAV-9, птичий AAV, бычий AAV и козий AAV. В результате полученный AAV-DJ является вектором с высокой способностью инфицирования клеток, который может трансдуцировать широкий спектр тканей с высокой скоростью.

Данную работу по сравнению технологических подходов к получению препарата rAAV проводили в соответствии со схемой, представленной на рисунке 1.

Для получения плазмидной scДНК использовали стандартную методику трансформации и наращивания в бактериях *E. coli*. Для очистки плазмидной scДНК использовали систему трехступенчатой хроматографической очистки с использованием Capto PlasmidSelect Xtra Starter Kit, позволяющей получать плазмидную scДНК высокой степени очистки от РНК, открытых кольцевых форм ДНК, а также остаточного количества эндотоксинов, что повышает эффективность трансфекции на следующем этапе [14].

Чистоту полученных плазмидных scДНК оценивали методом электрофоретического анализа в агарозном геле, позволяющим определить наличие РНК и различных изоформ ДНК. После этого плазмидной scДНК трансфицировали клетки HEK293 в условиях суспензионного и адгезионного культивирования, что позволяет сравнить эффективность различных подходов к культивированию.

Очистку rAAV проводили, используя аффинную хроматографию с использованием колонки с AVB сорбентом, позволяющим получать препарат rAAV высокой степени чистоты уже при одной ступени очистки. Далее проводили оценку чистоты и подлинности препарата rAAV, количества геномных копий, а также трансдуцирующей активности rAAV.

Таким образом, на первом этапе работы был разработан дизайн эксперимента, направленного на сравнение различных технологических подходов к получению rAAV в лабораторном масштабе.

Оценка получения плазмидных scДНК в препаративных количествах

Для получения плазмидной конструкции ген однодоменного антитела, слитого с Fc-фрагментом IgG1, специфичного к ботулиническому нейротоксину, был субклонирован в плазмиду в rAAV-EGFP, заменив ген белка EGFP по сайтам рестрикции EcoRI и XbaI, что делает возможным получение rAAV, содержащего трансген антитела, в описанной системе.

После трансформации компетентных бактерий *E. coli* и их лизиса выделение плазмидной scДНК проводили с использованием набора PlasmidSelect Xtra Starter Kit (рис. 2) согласно

Таблица 1. Сравнение используемых систем экспрессии rAAV
Table 1. Comparison of the rAAV expression systems

Критерии сравнения Comparison criteria	Бакуловирусовая система Baculovirus system	Система с вирусом-помощником Helper virus system	Трехплазмидная система Three-plasmid system
Масштабируемость Scalability	+++	+++	++
Эффективность доставки ДНК ^a DNA delivery efficiency ^a	+++	+++	++
Выход rAAV ^a rAAV productivity ^a	++	+	+++
Безопасность Safety	Контаминация бакуловиром Contamination with baculovirus	Контаминация вирусом-помощником Helper virus contamination	Безопасна Safe
Преимущества Advantages	Масштабируемость, относительная безопасность Scalability, relative safety	Масштабируемость Scalability	Быстрота получения rAAV, безопасность Short period of rAAV production, safety
Недостатки Disadvantages	Низкая стабильность Low stability	Получение стабильного продуцента Development of stable producer line	Низкая масштабируемость Lack of scalability

Примечание. «+» — удовлетворительно; «+++» — хорошо; «++++» — отлично.

^a Показатели указаны согласно работе O.W. Merten [13].

Note. + satisfactory; ++ good; +++ excellent.

^a Indicators are given according to O.W. Merten [13].

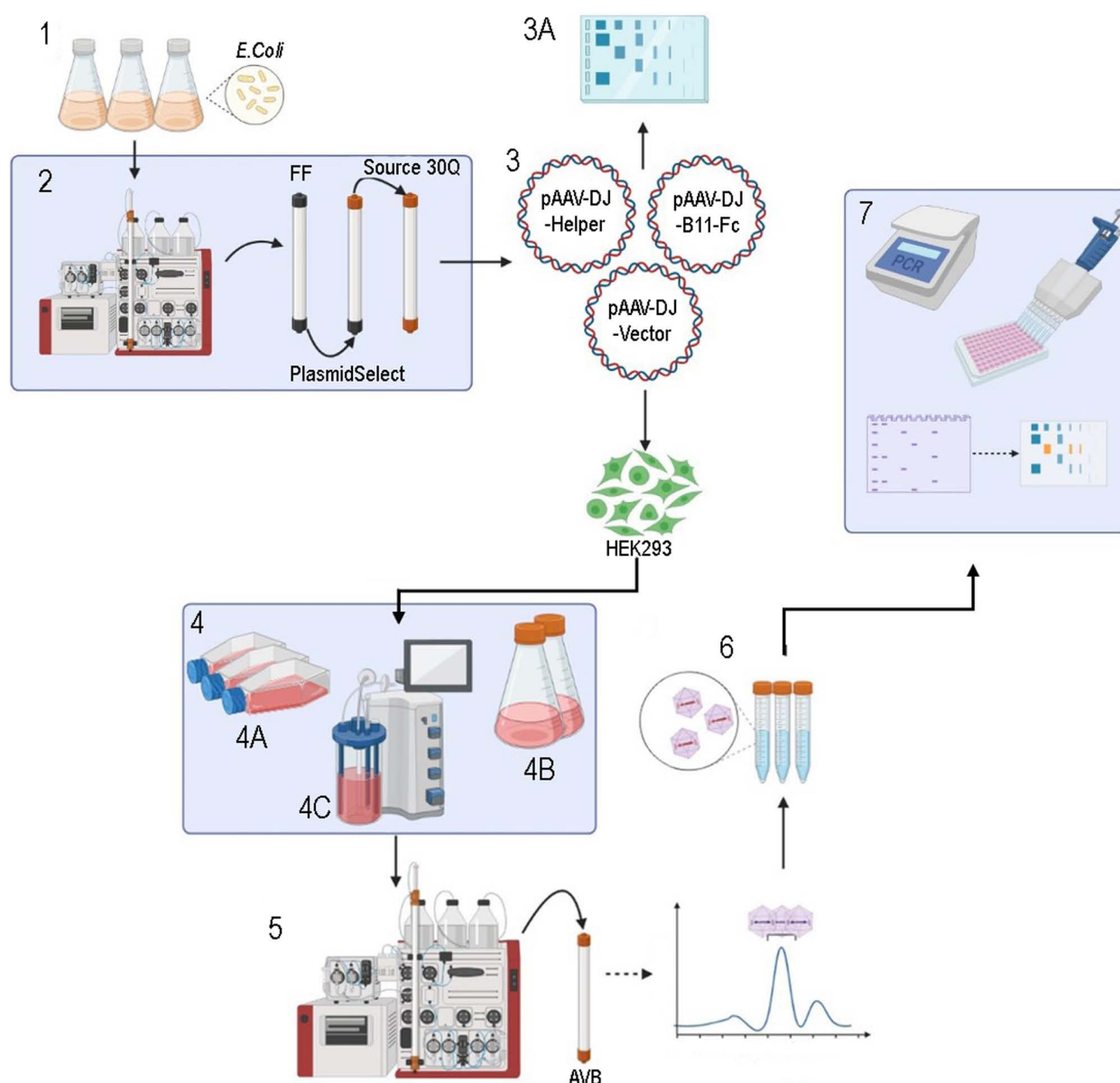


Рис. 1. Схема процесса получения очищенного препарата rAAV. 1 — наращивание плазмидной ДНК в препаративных количествах в *E. coli*. 2 — получение плазмидной scДНК при помощи системы трехступенчатой хроматографической очистки (Capto PlasmidSelect Xtra Starter Kit). 3 — scДНК, полученная с использованием системы AAV-DJ: 3A — анализ полученных плазмидных scДНК при помощи агарозного геля-электрофореза. 4 — трансфекция клеток HEK293 плазмидной scДНК с использованием трансфицирующего агента PEI: 4A — в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 в культуральных флаконах; 4B — в условиях культивирования клеток HEK293 в виде суспензии в колбах Эрленмейера; 4C — в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 в биореакторе BioBLU 5p на дисках Fibra-Cel. 5 — сбор клеточных лизатов и очистка rAAV при помощи аффинной хроматографии (AVB Sepharose). 6 — получение очищенного препарата rAAV. 7 — анализ полученного препарата rAAV при помощи методов электрофореза, иммуноблоттинга и РТ-ПЦР. Для оценки экспрессии трансгена в составе вектора на основе rAAV проводилась трансдукция клеток HEK293 и иммуноблоттинг.

Fig. 1. Scheme of the process for obtaining a purified rAAV preparation. 1—extension of plasmid DNA in preparative quantities in *E. coli*. 2—obtaining plasmid scDNA using a three-step chromatographic purification system (Capto PlasmidSelect Xtra Starter Kit). 3—scDNA obtained using the AAV-DJ system: 3A—analysis of the obtained plasmid DNA using agarose gel electrophoresis. 4—transfection of HEK293 cells with plasmid scDNA using the PEI transfecting agent: 4A—adherent culture of HEK293 cells in T-flasks; 4B—suspension culture of HEK293 cells in Erlenmeyer flasks; 4C—adherent culture of HEK293 cells in a BioBLU 5p bioreactor on Fibra-Cel disks. 5—collection of cell lysates and purification of rAAV by affinity chromatography (AVB Sepharose). 6—obtaining a purified sample of rAAV. 7—analysis of the obtained rAAV sample using electrophoresis, immunoblotting, and RT-PCR methods. Transduction of HEK293 cells and immunoblotting were performed to assess the transgene expression in the vector.

инструкции производителя. Первичную хроматографическую очистку осуществляли с использованием сорбента Sepharose 6 Fast Flow, в результате чего была получена фракция ДНК без примесей РНК. Далее проводили разделение открытой

и scДНК на сорбенте Capto PlasmidSelect Xtra. В ходе хроматографии на данной стадии процесс элюирования останавливали на 5–10 мин после снижения УФ поглощения до 5–10% от высоты пика, после чего продолжали элюирование,

что позволяло собрать более концентрированную фракцию плазмидной scДНК. На последней стадии хроматографической очистки с использованием сорбента Source 30Q проводилась очистка препарата от остаточного количества посторонних примесей и эндотоксинов. После хроматографической очистки плазмидную scДНК пересаживали ацетатом натрия для избавления от ЭДТА и других компонентов буфера, способных ингибировать процесс трансфекции.

Сложность разделения суперскрученной и открытой форм плазмидной ДНК обусловлена их близким сродством к связыванию с сорбентом [15]. Такое сходство делает

затруднительным их разделение методами стандартной анионообменной хроматографии, поэтому в данной работе была применена система Capto PlasmidSelect Xtra Starter Kit, в которой ключевым этапом является использование тииофильно-ароматической адсорбционной хроматографии на сорбенте Capto PlasmidSelect Xtra, несущем на своей матрице лиганды 2-меркаптопиридина, позволяющие за счет комплекса взаимодействий разделить данные формы. С его помощью были получены высокоочищенные фракции суперскрученной формы каждой из плазмидных ДНК, что подтверждалось электрофорезом в агарозном геле (рис. 2).

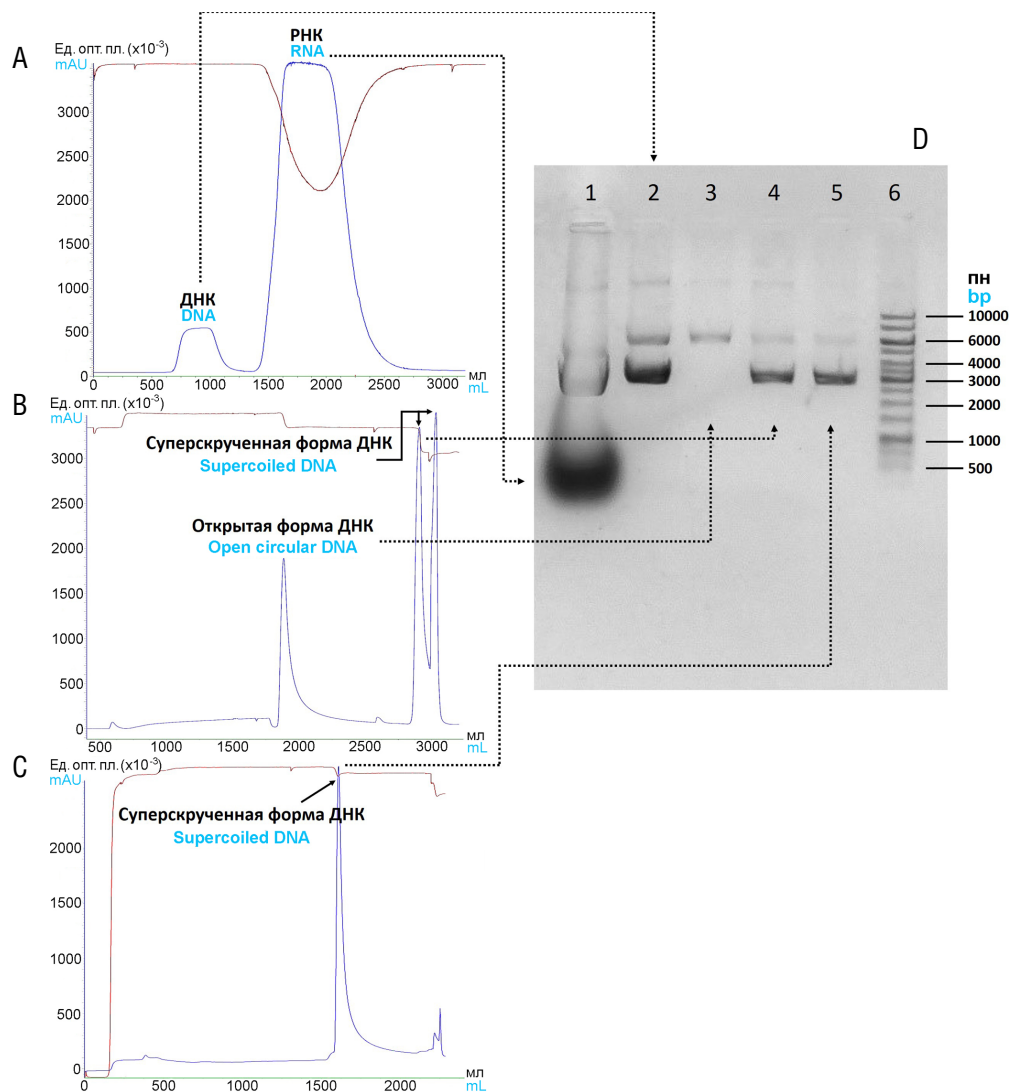


Рис. 2. Хроматограммы (А–С) и электрофореграмма (D) плазмидной ДНК на разных этапах очистки. А — аффинная хроматографическая очистка ДНК с использованием сорбента Sepharose 6 Fast Flow; на электрофореграмме D: дорожка 1 — ДНК в образце лизата трансфицированных бактерий *E. coli*, дорожка 2 — ДНК после очистки от РНК. В — аффинная хроматографическая очистка ДНК с использованием сорбента Capto PlasmidSelect Xtra; на электрофореграмме D: дорожка 3 — промывка на этапе разделения суперскрученной и открытой форм ДНК, дорожка 4 — пик фракции суперскрученной формы плазмидной ДНК. С — аффинная хроматографическая очистка ДНК с использованием сорбента Source 30Q; на электрофореграмме D: дорожка 5 — суперскрученная форма плазмидной ДНК после аффинной хроматографии с использованием сорбента Source 30Q; дорожка 6 — маркер молекулярной массы.

Fig. 2. Chromatograms (A–C) and electrophoretogram (D) of plasmid DNA at different stages of purification. A—affinity chromatography purification of DNA using the Sepharose 6 Fast Flow sorbent; electrophoretogram D: lane 1—DNA in a lysate sample of transfected *E. coli*, lane 2—DNA after purification from RNA. B—affinity chromatography purification of DNA using the Capto PlasmidSelect Xtra sorbent; electrophoretogram D: lane 3—washing at the stage of separation of supercoiled and open forms of DNA, lane 4—fraction peak of supercoiled form of plasmid DNA. C—affinity chromatography purification of DNA using the Source 30Q sorbent; electrophoretogram D: lane 5—supercoiled form of plasmid DNA after affinity chromatography using the Source 30Q sorbent; lane 6—molecular weight marker.

В результате трехстадийной хроматографической очистки были получены препараты плазмидной ссДНК, не содержащие значительных количеств примесей в виде РНК и открытой кольцевой изоформы ДНК, что показывает эффективность данного способа очистки. Возможно масштабирование процесса получения и очистки плазмидных ссДНК за счет увеличения количества трансформированных бактерий и объема используемого сорбента для хроматографии (3,2 мг плазмидной ссДНК из 1 литра ночной культуры).

Использование описанной технологии очистки плазмидной ДНК является необходимым этапом, поскольку для проведения трансфекции клеток HEK293 на следующем этапе, а также клинического применения препарата gAAV необходимым условием является наработка большого количества плазмидной ДНК в более активной — суперскрученной изоформе (более 97% в форме ссДНК), позволяющей более эффективно проводить трансфекцию клеток [16, 17]. Кроме того, в препарате ДНК не должно обнаруживаться белков клетки-хозяина и РНК; уровень геномной ДНК должен быть <2 мкг на 1 мг плазмидной ДНК; уровень содержания эндотоксинов не должен превышать 0,1 ЕЗ/мкг ДНК [15]. Использование трехстадийной хроматографической очистки обеспечивает оптимальные условия получения высокоочищенного препарата ДНК, соответствующего описанным характеристикам, в сравнении с коммерческими наборами для выделения плазмид, использующими технологию одноступенчатой анионообменной хроматографии с помощью одноразовых колонок. Преимуществом одноразовых колонок для одноступенчатой очистки является возможность выделения ДНК сразу из нескольких образцов, однако максимальная емкость таких колонок ограничена, а использование хроматографического сорбента и трехступенчатой очистки делает возможным масштабирование процесса.

Таким образом, на данном этапе работы была отработана методика получения плазмидной ссДНК, необходимая для эффективной трансфекции клеток HEK293 с целью получения препарата gAAV.

Оценка эффективности трансфекции в различных условиях культивирования клеток HEK293

В настоящее время для продукции gAAV преимущественно используют клетки в условиях адгезионного культивирования. Данный вид культивирования клеточных культур с использованием флаконов и чашек трудно масштабировать. Кроме того, при их использовании происходит увеличение времени, требуемого для манипуляций с большим количеством культуральных емкостей. Переход на суспензионные клеточные культуры

в бессывороточных условиях может позволить обеспечить значительные преимущества, заключающиеся в упрощении процесса масштабирования с точки зрения условий культивирования клеток и последующих стадий очистки вирусных векторов.

Помимо этого, можно использовать более эффективные технологии культивирования, основанные на применении адгезионной культуры клеток в биореакторе, заполненном дисками Fibracel. Диски Fibracel — матрица для роста клеток на твердой основе, состоящая из двух слоев нетканого материала — полиэстера и полипропилена, которые в процессе подготовки обрабатывают ультразвуком, разрезают и подвергают электростатической обработке для улучшения закрепления клеток на матрицу в виде дисков⁴. Одноразовые сосуды BioBLU, содержащие диски Fibracel, позволяют уменьшить число манипуляций с большим количеством колб и флаконов. Сосуд BioBLU 5p содержит 150 г дисков Fibracel⁵. Площадь поверхности адгезии одного грамма дисков Fibracel составляет 1200 см². Таким образом, использование одного сосуда BioBLU 5p обеспечивает площадь поверхности адгезии 180000 см², что эквивалентно использованию примерно 1028 флаконов⁶ (табл. 2). Однако следует отметить, что данная технология имеет недостаток, заключающийся в высокой стоимости применяемого оборудования. При всех преимуществах использование биореактора значительно затрудняет проведение подсчета клеток, ограничивая прямое проведение наблюдения за их ростом исключительно косвенными методами — по анализу метаболитов, уровню потребления питательных веществ, а также сатурации кислорода в среде.

При проведении трансфекции клеток HEK293 сравнивали три подхода культивирования клеток HEK293: культивирование клеток в виде суспензии, адгезионное культивирование клеток во флаконах и адгезионное культивирование клеток в биореакторе с дисками Fibracel. Для постановки трансфекции суспензионной культуры клеток HEK293 использовали суммарно 1 л культуральной среды BalanCD, разделенной на 5 колб Эрленмейера емкостью 1000 мл. Для проведения трансфекции адгезионной культуры клеток HEK293 использовали 30 флаконов с площадью поверхности 175 см² с общим объемом культуральной среды 1 л, а также один биореактор BioFlo с рабочим объемом 2,5 л.

Для оценки прохождения трансфекции использовали визуальную идентификацию интенсивности флуоресценции белка EGFP в клетках HEK293 в ультрафиолетовом спектре, что являлось методом косвенной оценки эффективности трансфекции (рис. 3).

Состояние клеточных культур анализировали путем подсчета числа и выживаемости клеток с использованием

Таблица 2. Сравнение площади поверхностей сосудов для адгезионного роста культур клеток⁷

Table 2. Comparison of the surface areas of vessels for adherent culture⁷

Сосуды для культивирования клеток Cell culture vessels	Общая площадь поверхности адгезии (см ²) Total adhesion surface area (cm ²)	Площадь поверхности адгезии, эквивалентная BioBLU 5p (шт) BioBLU 5p equivalent adhesion surface area (pcs)
BioBLU 5p одноразовый сосуд BioBLU 5p single-use vessel	180 000	1
Культуральный флакон T-25 T-25 flask	25	7200
Культуральный флакон T-175 T-175 flask	175	1028
Роллерная бутылка Roller bottle	850	212

⁴ <https://bioprocessintl.com/2011/an-update-on-the-advantages-of-fibra-cel-disks-for-cell-culture-320182/>

⁵ https://www.eppendorf.com/fileadmin/General/Applications/Bioprocess_Landing_Page/Application-Note_359_BioBLU-5p.pdf

⁶ Там же.

⁷ Там же.

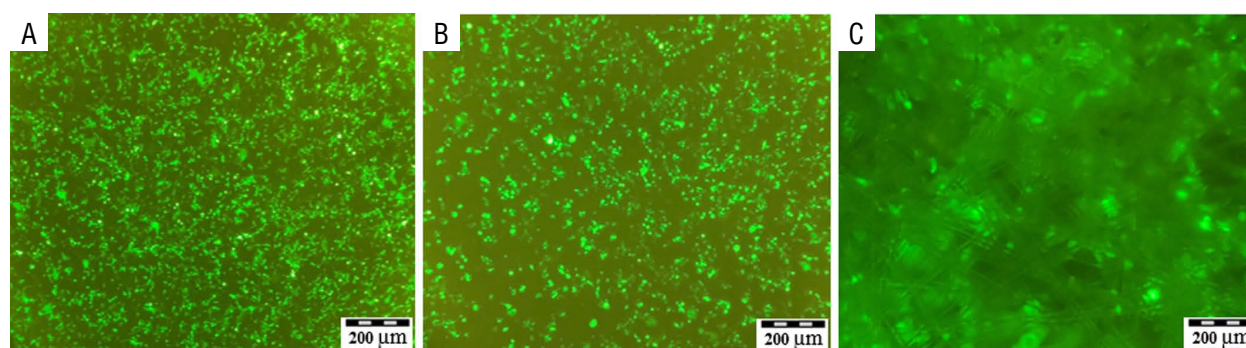


Рис. 3. Оценка эффективности трансфекции клеток HEK293 по наличию экспрессии гена белка EGFP методом флуоресцентной УФ-микроскопии: А — трансфекция клеток HEK293 в условиях адгезионного культивирования во флаконах; В — трансфекция клеток HEK293 в условиях суспензионного культивирования в колбах Эрленмейера; С — трансфекция клеток HEK293 в биореакторе BioBLU 5p. Увеличение $\times 100$.

Fig. 3. Determination of EGFP gene expression by UV fluorescence microscopy to assess HEK293 transfection efficiency: А—transfection of HEK293 cells in adherent culture in T-flasks; В—transfection of HEK293 cells in suspension culture in Erlenmeyer flasks; С—transfection of HEK293 cells in the BioBLU 5p bioreactor. Magnification 100 $\times$.

автоматического счетчика клеток (для суспензионной культуры клеток) и методом микроскопирования (для клеток в условиях адгезионного культивирования во флаконах). В случае клеток, культивировавшихся в условиях биореактора BioBLU 5p, отбирали пробу с целью оценки наличия мертвых клеток в культуральной среде, поскольку живые клетки закреплены на дисках Fibracel адгезивно.

После культивирования в течение 72 ч проводили сбор и лизис клеток в течение 4 ч. Состав лизирующего буфера был подобран для осуществления эффективного процесса лизиса. Основным действующим веществом лизирующего раствора является детергент твин-20, нарушающий межбелковые и белково-липидные взаимодействия, что приводит к денатурации белковых структур. Входящая в состав лизирующего буфера бензонуклеаза гидролизует нуклеиновые кислоты при отсутствии протеолитической активности, что является важным при очистке вирусных структур.

Таким образом, на данном этапе была проведена трансфекция клеток линии HEK293 системой плазмидных конструкций, необходимых для сборки rAAV. По экспрессии гена белка EGFP можно сделать вывод о том, что в адгезионных условиях в культуральных флаконах, в адгезионных условиях в биореакторе BioBLU 5p и в суспензионных условиях в колбах трансфекция прошла с высокой эффективностью, что подтверждено высоким уровнем продукции зеленого флуоресцентного белка.

Получение очищенного препарата rAAV

Полученные образцы клеточных лизатов фильтровали через фильтр 0,22 мкм, концентрировали и диафильтровали, в результате чего получили по 500 мл образцов, отобранных при культивировании в условиях суспензии и адгезии (флаконы), и 1250 мл образца, отобранного из биореактора BioBLU.

Важным условием дальнейшего клинического применения препаратов на основе rAAV является эффективный способ их очистки, позволяющий получить высокий выход чистого продукта. Использование хроматографического сорбента AVB Sepharose позволяет упростить очистку, не используя промежуточный этап разделения в градиенте плотности и дальнейший комплекс очисток. Данный сорбент содержит лиганд, аффинный к rAAV, который представляет собой фрагмент однодоменного антитела, полученного из гипериммунной сыворотки в ответ на введение rAAV. Элюирование буфером с кислым pH позволяет разрушить аффинные взаимодействия и обеспечить выход чистого препарата rAAV.

В результате очистки с использованием тангенциальной фильтрации и аффинной хроматографии получали фракцию (рис. 4, пик элюции rAAV — фракции диапазона 630–640 мл) со средним объемом 10 мл для каждого из трех препаратов rAAV, полученных в различных условиях культивирования, которые были сконцентрированы до 1 мл при помощи центрифужных концентраторов 50 кДа Amicon Ultra-15.

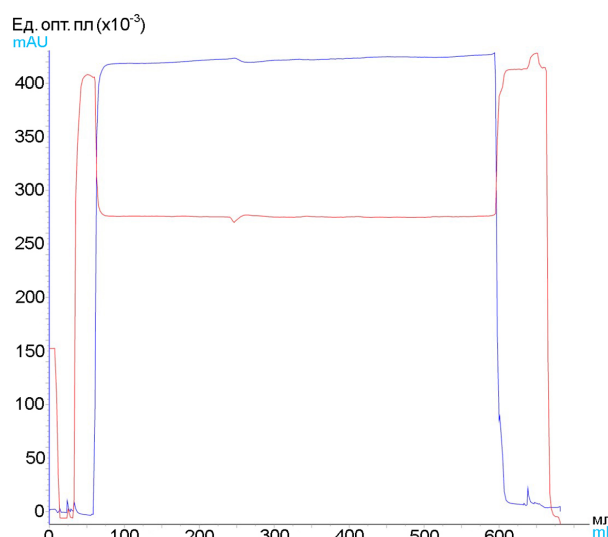


Рис. 4. Хроматограмма аффинной очистки препарата rAAV с использованием сорбента AVB Sepharose (препарат rAAV получен в условиях культивирования клеток HEK293 в виде суспензии). На графике отображены значения электропроводности (кривая красного цвета) и оптической плотности в спектре поглощения 280 нм (кривая синего цвета). Диапазон 0–60 мл — уравнивание колонки связывающим буфером, 60–600 мл — нанесение клеточного лизата на колонку, 600–630 мл — промывка связывающим буфером, 630–640 мл — пик элюции rAAV.

Fig. 4. Chromatogram of affinity purification of the rAAV sample using the AVB Sepharose sorbent (the rAAV sample was obtained from HEK293 suspension culture). The graph shows the values of electrical conductivity (red curve) and optical density at 280 nm (blue curve). The 0–60 mL range—equilibration of the column with binding buffer, 60–600 mL—addition of cell lysate to the column, 600–630 mL—washing with binding buffer, 630–640 mL—rAAV elution peak.

Несмотря на имеющиеся в литературе противоречивые данные о низкой эффективности связывания вирусных частиц AAV серотипа DJ сорбентом AVB Sepharose [18, 19], сложностей с его очисткой не возникало, что подтверждалось повторным нанесением клеточного лизата на колонку после ее регенерации. Однако с целью контроля за эффективностью очистки можно использовать методы измерения количества вирусных частиц в среде до и после очистки методами, описанными в подразделе «Оценка количества геномных копий в препаратах gAAV» раздела «Материалы и методы».

Полученные после аффинной хроматографической очистки образцы gAAV измеряли спектрофотометрически по отношению поглощения при длинах волн 260 нм/280 нм; в результате были получены следующие значения количества вирусных частиц (в относительных единицах в 1 мл (OE/мл)): 0,39 OE/мл — образец, полученный при культивировании клеток HEK293 в адгезионных условиях во флаконах; 0,33 OE/мл — образец, полученный при культивировании в суспензионных условиях в колбах; 0,9 OE/мл — образец, полученный при культивировании в адгезионных условиях на дисках Fibra-Cel; отношение 260 нм/280 нм, показывающее отношение пустых и с упакованным геномом капсидов, составило 1,15, 1,1 и 1,3 соответственно. Наибольшее количество вирусных частиц и наибольший процент капсидов с упакованным геномом были получены при культивировании на дисках Fibra-Cel. Однако данный метод количественной оценки gAAV применим только к высокоочищенным препаратам, для которых отношение 260 нм/280 нм составляет 1,48 для капсидов с упакованным геномом и 0,6 для пустых капсидов [20]. Исходя из этого, полученные препараты gAAV имеют в своем составе некоторое количество капсидов без упакованного генома, что является обычным и закономерным [21] при получении препаратов gAAV.

Таким образом, на данном этапе работы была проведена очистка препарата gAAV, полученного при использовании различных технологических подходов к культивированию клеток.

Количественная и качественная оценка полученных препаратов gAAV

Для характеристики препарата gAAV (AAV-DJ-B11-Fc) использовали различные методы анализа для изучения возможных различий в количестве, чистоте и подлинности препарата gAAV, полученного с применением трех подходов к культивированию клеток. Очищенный препарат gAAV был охарактеризован с использованием электрофореза в восстанавливающих условиях (рис. 5А). На представленной электрофореграмме присутствуют структурные белки капсида — VP1, VP2 и VP3 (1:1:10), соответствующие молекулярной массе VP белков AAV дикого типа. Было установлено, что препарат не содержит каких-либо других белков клеток-хозяина в значительных количествах.

После хроматографической очистки препарат gAAV анализировали методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител к капсидным белкам anti-VP1, anti-VP2 и anti-VP3 (рис. 5Б). Было показано, что капсидные белки VP1, VP2 и VP3 препарата gAAV специфически реагируют с антителами anti-VP1, anti-VP2 и anti-VP3, что подтверждает его подлинность.

Для приблизительного количественного определения вирусов обычно используют измерение оптической плотности. Однако этот метод нельзя назвать точным [22], так как пустые капсиды могут вносить изменения в оптическое поглощение

при 260 нм. Пустые капсиды, которые обычно образуются во время продукции gAAV, очищаются аффинной хроматографической очисткой вместе с gAAV с упакованным геномом, но избыток пустых капсидов затрудняет стандартные методики определения концентрации векторного генома по оптической плотности. Поэтому для определения геномных копий (гк) мы использовали измерение с помощью наборов QuickTiter™ AAV Quantitation Kit и AAVpro® Titration Kit методами флуоресценции и ПТ-ПЦР соответственно (табл. 3).

AAVpro® Titration Kit представляет собой набор для определения геномных копий gAAV с помощью ПЦР в реальном времени. Этот набор позволяет проводить более точную количественную оценку по сравнению с другими методами, основанную на анализе инвертированных концевых повторов (ITR) AAV2. Набор QuickTiter™ AAV Quantitation Kit дает возможность количественного определения содержания вирусных нуклеиновых кислот в препарате быстрее, чем с использованием ПЦР. Однако предел чувствительности набора составляет 1×10^9 геномных копий/мл⁸.

В результате анализа установлено, что наибольшее количество геномных копий gAAV получено в условиях культивирования в биореакторе BioBlu, которое при пересчете на 1 л оказалось сопоставимо с количеством геномных копий при культивировании в условиях адгезии во флаконах. Исходя из полученных данных определения количества геномных копий, можно сделать вывод о наличии в препарате значительного числа пустых капсидов, поскольку метод ПЦР является более точным методом определения инкапсидированной ДНК

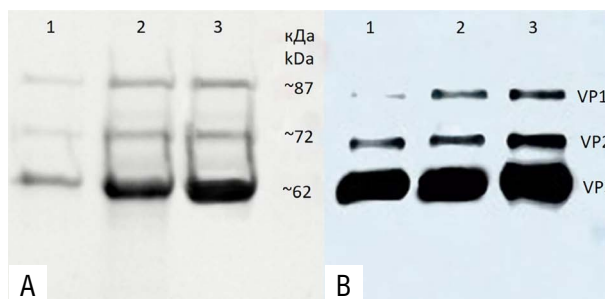


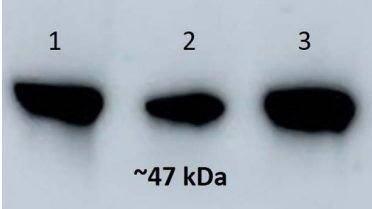
Рис. 5. Анализ чистоты и подлинности препаратов gAAV. А — электрофореграмма препаратов gAAV, полученных методом аффинной хроматографии. На электрофореграмме присутствуют структурные белки капсида gAAV — VP1 (87 кДа), VP2 (72 кДа) и VP3 (62 кДа); В — вестерн-блоттинг препаратов gAAV с использованием специфических антител к капсидным белкам anti-VP1, anti-VP2 и anti-VP3. Дорожки (на А и В): 1 — препарат gAAV, полученный в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 во флаконах; 2 — препарат gAAV, полученный в условиях суспензионного культивирования клеток HEK293 в колбах Эрленмейера; 3 — препарат gAAV, полученный в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 в биореакторе BioBlu на дисках Fibra-Cel.

Fig. 5. Analysis of purity and identity of rAAV preparations. A—electrophoretogram of rAAV samples obtained by affinity chromatography. The electrophoretogram shows the structural proteins of the rAAV capsid—VP1 (87 kDa), VP2 (72 kDa), and VP3 (62 kDa); B—Western blotting with specific antibodies to capsid proteins anti-VP1, anti-VP2, and anti-VP3. Lanes (A and B): 1—rAAV preparation obtained in adherent culture of HEK293 cells in T-flasks; 2—rAAV preparation obtained in suspension culture of HEK293 cells in Erlenmeyer flasks; 3—rAAV preparation obtained in adherent culture of HEK293 cells in the BioBlu bioreactor on Fibra-Cel disks.

⁸ Cellbiolabs: QuickTiter™ AAV Quantitation Kit. Product manual. <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/VPK-145-aav-quantitation-kit.pdf>

Таблица 3. Сравнение количества геномных копий векторного генома, определенных методом РТ-ПЦР и методом флуоресценции, и анализ экспрессии антител в трансдуцированных клетках

Table 3. Comparison of the numbers of genomic copies of the vector genome, determined by RT-PCR and fluorescence, and analysis of antibody expression in the transduced cells

Образец Sample	Количество геномных копий, определяемое с использованием флуоресцентного метода The number of genomic copies determined using the fluorescence method	Количество геномных копий, определяемое с использованием метода РТ-ПЦР The number of genomic copies determined using the RT-PCR method	Анализ наличия экспрессии антител в трансдуцированных клетках Analysis of the presence of antibody expression in the transduced cells
Препарат rAAV, полученный в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 во флаконах (количество геномных копий в пересчете на 1 л среды / на 1 см² площади поверхности адгезии) rAAV preparation obtained by adherent culture of HEK293 cells in T-flasks (the number of genomic copies per 1 liter of medium/per 1 cm² of adhesion surface area)	5,8×10 ¹³ / 1,1×10 ¹⁰	3,63×10 ¹¹ / 6,9×10 ⁷	 1 2 3 ~47 kDa
Препарат rAAV, полученный в условиях суспензионного культивирования клеток HEK293 в колбах Эрленмейера (количество геномных копий в пересчете на 1 л среды) rAAV preparation obtained by suspension culture of HEK293 cells in Erlenmeyer flasks (the number of genomic copies per 1 liter of medium)	3,29×10 ¹³	3,2×10 ¹¹	Вестерн-блоттинг образцов культуральной жидкости, полученных при культивировании клеток, трансдуцированных препаратом rAAV, полученным после очистки: 1 — адгезионной культуры во флаконах, 2 — суспензионной культуры в колбах Эрленмейера, 3 — адгезионной культуры в биореакторе BioBlu на дисках Fibra-Cel Western-blotting of culture medium samples from cells transduced with rAAV obtained after purification of: 1—adherent culture in T-flask, 2—suspension culture in Erlenmeyer flasks, 3—adherent culture in the BioBLU 5p bioreactor on Fibra-Cel Disks
Препарат rAAV, полученный в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 в биореакторе BioBlu на дисках Fibra-Cel (количество геномных копий в пересчете на 1 л среды / на 1 см² площади поверхности адгезии) rAAV preparation obtained by adherent culture of HEK293 cells in the BioBLU 5p bioreactor on Fibra-Cel Disks (the number of genomic copies per 1 liter of medium/per 1 cm² of adhesion surface area)	8,8×10 ¹³ / 1,2×10 ⁹	2,4×10 ¹² / 1,3×10 ⁷	

в сравнении с оценкой методом титрования с интеркалирующим красителем, неспецифично связывающимся с ДНК. Кроме того, результаты, полученные при оценке образцов спектрофотометрическим методом по отношению поглощения при длинах волн 260 нм/280 нм, описанные ранее, подтверждают данный факт. Поэтому при очистке rAAV целесообразно включать стадию дополнительной очистки, позволяющую избавиться от пустых капсидов (например, ультрацентрифугирование в йодиксаноле [23]).

Однако, исходя из данных, полученных с использованием двух методов, количество геномных копий в пересчете на 1 см² (площади поверхности адгезии) в случае культивирования на дисках Fibra-Cel было ниже, чем в случае с использованием культуральных флаконов. Это может быть связано с недостаточной эффективностью использования всей площади поверхности матрицы дисков Fibra-Cel, что требует подбора оптимальной посадочной концентрации и времени проведения трансфекции после закрепления клеток на матрице. Кроме того, на дисках Fibra-Cel невозможно

провести подсчет клеток, чтобы оценить эффективность их пролиферации.

Таким образом, наибольший выход продукта наблюдается при адгезионном культивировании трансфицированных клеток HEK293 — во флаконах и в биореакторе, наименьший — при суспензионном культивировании. Суспензионное культивирование является легко масштабируемым способом, однако выход продукта значительно ниже, чем в случае адгезионного культивирования. Недостатком способа адгезионного культивирования во флаконах является его пригодность только для получения небольших количеств препарата ввиду сложности масштабирования. Несмотря на то что метод культивирования на дисках Fibra-Cel является наиболее затратным из-за себестоимости одноразового сосуда, преимуществом метода является его удобство из-за компактности и удобства манипуляции по сравнению с культивированием в культуральных флаконах.

Для оценки трансдуцирующей способности rAAV и экспрессии трансгена проводили трансдукцию клеток HEK293 полученными в разных условиях препаратами rAAV. Для этого

все препараты выравнивали по концентрации геномных копий до наименьшего значения из полученных ($3,2 \times 10^{11}$ гк/мл по данным РТ-ПЦР с использованием AAVpro® Titration Kit) и вносили по 10 мкл в культуральную среду с клетками HEK293. Методом вестерн-блоттинга образцов культуральной среды анализировали наличие продукции однодоменных антител трансдуцированными клетками HEK293 (табл. 3). В результате проведения анализа установлено, что во всех трансдуцированных препаратом rAAV клетках происходит продукция целевых антител.

Исходя из представленных результатов можно заключить, что полученный в различных условиях препарат rAAV обладает высокой степенью чистоты, хотя и содержит пустые капсиды в небольшом количестве. Для препарата rAAV подтверждена подлинность. Препарат rAAV обладает трансдуцирующей способностью в отношении клеток HEK293, подтвержденной наличием продукции целевых однодоменных антител.

Выводы

В работе проведено сравнение технологических подходов к получению rAAV, основанных на различных методах культивирования клеточной линии HEK293 в лабораторном масштабе. Результаты исследования продемонстрировали возможность применения описанных подходов к очистке сДНК, условий трансфекции клеток, культивирования трансфицированных клеток и очистки rAAV для получения целевого препарата. Были получены следующие результаты.

1. Показана возможность применения трехступенчатой хроматографической очистки плазмидной сДНК для отделения от геномной ДНК, РНК, открытой формы плазмидной ДНК. Полученная плазмидная сДНК применима для эффективной транзientной трансфекции клеток HEK293 с целью получения rAAV.

2. Продемонстрирована возможность применения трех подходов к культивированию трансфицированных клеток HEK293 с целью продукции rAAV: суспензионное культивирование в колбах, адгезионное культивирование во флаконах и в биореакторе BioBLU 5p на дисках Fibracel. В результате анализа методами флуоресценции и РТ-ПЦР установлено, что оптимальным способом продукции rAAV в лабораторном масштабе является использование биореактора, поскольку позволяет получать высокие выходы продукта rAAV и обладает потенциалом к масштабированию, однако является ресурсоемким.

3. Анализ препарата rAAV после хроматографической очистки с использованием аффинной хроматографии подтвердил подлинность и высокую степень чистоты препарата.

4. Продемонстрирована трансдуцирующая способность препарата rAAV в отношении клеток HEK293 с последующей экспрессией трансгена, подтвержденная наличием продукции целевых однодоменных антител.

Вклад авторов. **Е. И. Рябова** — культивирование и трансфекция клеток HEK293, проведение работ, связанных с получением rAAV, интерпретация результатов исследования, сбор, анализ и систематизация информации, изложенной в научной литературе, написание текста; **А. А. Деркаев** — сбор и систематизация данных, формирование концепции статьи, сбор, анализ и систематизация информации, изложенной в научной литературе, проведение этапов количественной и качественной оценки препаратов; **И. Б. Есмагамбетов** — тангенциальная фильтрация, аффинная очистка rAAV, интерпретация полученных результатов на всех этапах работы, идея, концепция, доработка текста, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **Д. В. Шебляков** — дизайн генетической конструкции, экспрессирующей однодоменное антитело, сли-

тое с Fc-фрагментом; **М. А. Довгий** — получение целевой конструкции, несущей ген антитела, наработка плазмидных ДНК для сборки rAAV в препаративных количествах; **Д. В. Бырихина** — аффинная хроматография, анализ полученных хроматограмм, редактирование текста; **В. В. Прокофьев** — проведение работ, связанных с очисткой плазмидных ДНК с помощью трехступенчатой хроматографии; **И. П. Чегоданова** — проведение работ, связанных с анализом полученных плазмидных ДНК.

Authors' contributions. **Ekaterina I. Ryabova**—cultivation and transfection of HEK293 cells, obtaining of rAAV, interpretation of the study results, collection, analysis and systematisation of information presented in scientific literature, writing of the text; **Artem A. Derkaev**—collection and systematisation of data, elaboration of the concept of the paper, collection, analysis and systematisation of information presented in scientific literature, quantitative and qualitative assessment of the preparations; **Ilias B. Esmagambetov**—tangential filtration, affinity purification of rAAV, interpretation of the results obtained at all stages of the study, elaboration of the idea and concept of the paper, revision of the text, approval of the final version of the paper for publication; **Dmitry V. Shcheblyakov**—elaboration of the design of the genetic construction expressing a single domain antibody; **Mikhail A. Dovgij**—obtaining the target plasmid carrying an antibody gene, production of plasmid DNA for obtaining rAAV in preparative quantities; **Daria V. Byrikhina**—affinity chromatography, analysis of the obtained chromatograms, editing of the text; **Vladimir V. Prokofiev**—purification of plasmid DNA using three-stage chromatography; **Irina P. Chemojanova**—analysis of the obtained plasmid DNA.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки. Коллектив авторов выражает благодарность ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Acknowledgements. The study was conducted without sponsorship. The team of authors express their gratitude to the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya.

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. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs*. 2017;31(4):317–34. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>
2. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annu Rev Virol*. 2014;1(1):427–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085355>
3. Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ. Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing. *J Virol*. 2006;80(21):10346–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.00841-06>
4. Mays LE, Wang L, Lin J, Bell P, Crawford A, Wherry EJ, Wilson JM. AAV8 induces tolerance in murine muscle as a result of poor APC transduction, T cell exhaustion, and minimal MHC1 upregulation on target cells. *Mol Ther*. 2014;22(1):28–41. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.134>
5. Ahi YS, Bangari DS, Mittal SK. Adenoviral vector immunity: its implications and circumvention strategies. *Curr Gene Ther*. 2011;11(4):307–20. <https://doi.org/10.2174/156652311796150372>
6. Grieger JC, Soltys SM, Samulski RJ. Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and

- FLT1 clinical vector. *Mol Ther.* 2016;24(2):287–97. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.187>
7. Rajendra Y, Kiseljak D, Baldi L, Wurm FM, Hacker DL. Transcriptional and post-transcriptional limitations of high-yielding, PEI-mediated transient transfection with CHO and HEK-293E cells. *Biotechnol Prog.* 2015;31(2):541–9. <https://doi.org/10.1002/btpr.2064>
8. Wright JF. Transient transfection methods for clinical adeno-associated viral vector production. *Hum Gene Ther.* 2009;20(7):698–706. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.064>
9. Keeler AM, Flotte TR. Recombinant adeno-associated virus gene therapy in light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where are we, and how did we get here? *Annu Rev Virol.* 2019;6(1):601–21. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015530>
10. Godakova SA, Noskov AN, Vinogradova ID, Ugriumova GA, Solovyev AI, Esmagambetov IB, et al. Camelid VHHs fused to human Fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin A in mice. *Toxins (Basel).* 2019;11(8):464. <https://doi.org/10.3390/toxins11080464>
11. Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp.* 2007;6:253. <https://doi.org/10.3791/253>
12. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7(6):1513–23. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
13. Merten OW. AAV vector production: state of the art developments and remaining challenges. *Cell Gene Therapy Insights.* 2016;2(5):521–51.
14. Sousa F, Prazeres DMF, Queiroz JA. Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *J Gene Med.* 2009;11(1):79–88. <https://doi.org/10.1002/jgm.1272>
15. Diogo MM, Queiroz JA, Prazeres DMF. Chromatography of plasmid DNA. *J Chromatogr A.* 2005;1069(1):3–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.050>
16. Stadler J, Lemmens R, Nyhammar T. Plasmid DNA purification. *J Gene Med.* 2004;6(Suppl 1):S54–S66. <https://doi.org/10.1002/jgm.512>
17. Cupillard L, Juillard V, Latour S, Colombet G, Cachet N, Richard S, et al. Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats. *Vaccine.* 2005;23(16):1910–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.10.018>
18. Zhao H, Lee KJ, Daris M, Lin Y, Wolfe T, Sheng J, et al. Creation of a high-yield AAV vector production platform in suspension cells using a design of experiment approach. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020;18:312–20. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.06.004>
19. Nass SA, Mattingly MA, Woodcock DA, Burnham BL, Ardinger JA, Osmond SE, et al. Universal method for the purification of recombinant AAV vectors of differing serotypes. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;9:33–46. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.12.004>
20. Sommer JM, Smith PH, Parthasarathy S, Isaacs J, Vijay S, Kieran J, et al. Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement. *Mol Ther.* 2003;7(1):122–8. [https://doi.org/10.1016/s1525-0016\(02\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s1525-0016(02)00019-9)
21. Benskey MJ, Sandoval IM, Manfredsson FP. Continuous Collection of Adeno-Associated Virus from Producer Cell Medium Significantly Increases Total Viral Yield. *Hum Gene Ther Methods.* 2016;27(1):32–45. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2015.117>
22. Hajba L, Guttman A. Recent Advances in the Analysis Full/Empty Capsid Ratio and Genome Integrity of Adeno-associated Virus (AAV) Gene Delivery Vectors. *Curr Mol Med.* 2020;20(10):806–13. <https://doi.org/10.2174/1566524020999200730181042>
23. Crosson SM, Dib P, Smith KJ, Zolotukhin S. Helper-free production of laboratory grade AAV and purification by iodixanol density gradient centrifugation. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;10:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.05.001>

Об авторах / Authors

Рябова Екатерина Игоревна. Ekaterina I. Ryabova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>

Деркаев Артем Алексеевич. Artem A. Derkaev. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3776-3856>

Есмагамбетов Ильяс Булатович, канд. биол. наук. Ilias B. Esmagambetov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Щебляков Дмитрий Викторович, канд. биол. наук. Dmitry V. Shcheblyakov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

Довгий Михаил Андреевич. Mikhail A. Dovgiy. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0017-7784>

Бырихина Дарья Валерьевна. Daria V. Byrikhina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3971-5823>

Прокофьев Владимир Владимирович. Vladimir V. Prokofiev. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>

Чемоданова Ирина Петровна. Irina P. Chemodanova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4525-0364>

Поступила 06.07.2021

После доработки 05.11.2021

Принята к публикации 10.12.2021

Received 6 July 2021

Revised 5 November 2021

Accepted 10 December 2021

Николай Васильевич Медуницын (к 90-летию со дня рождения)

Nikolay Vasilievich Medunitsyn (on the 90th Anniversary)



Николаю Васильевичу Медуницыну — доктору медицинских наук, профессору, академику РАН, ведущему российскому ученому-иммунологу — 19 октября 2021 г. исполнилось 90 лет.

Николай Васильевич родился в г. Архангельске. В 1955 г. окончил 2-й Московский государственный медицинский институт (в настоящее время — ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России), а в 1958 г. — аспирантуру при кафедре патологической физиологии этого института. В 1960 г. Н.В. Медуницын защитил диссертацию по теме «О фиксирующей и антителообразовательной функции лимфатических узлов» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а в 1970 г. — диссертацию «Замедленная гиперчувствительность к растворимым белкам» на соискание ученой степени доктора медицинских наук. В 1999 г. избран членом-корреспондентом РАМН по специальности «Вакцинология», в 2004 г. — академиком РАМН по той же специальности. С 2013 г. Н.В. Медуницын является академиком РАН.

Научной деятельностью Н.В. Медуницын начал заниматься на третьем курсе института. Работал младшим и старшим научным сотрудником во вновь созданной научно-исследовательской аллергологической лаборатории АМН СССР под руководством академика А.Д. Адо. В 1969 г. Н.В. Медуницын был назначен заместителем директора по научной работе Московского НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, в 1979 г. — заместителем директора по научной работе Института иммунологии АМН СССР.

Начиная с 1988 г. Николай Васильевич в течение 21 года руководил Государственным НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (ГИСК им. Л.А. Тарасевича), на который были возложены функции Национального органа контроля медицинских иммунобиологических препаратов. С 2009 г. Н.В. Медуницын работал главным научным сотрудником этого же института. После реорганизации ГИСК им. Л.А. Тарасевича Н.В. Медуницын работал главным научным сотрудником Центра планирования и координации НИР, а также руководителем научного направления ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Николай Васильевич Медуницын — ведущий специалист в области молекулярной иммунологии, инициатор создания новой медицинской специальности — вакцинологии. В своих научных работах Н.В. Медуницын выдвинул и обосновал основные положения персонализации при вакцинопрофилактике, которые заключаются в анализе специфического приобретенного иммунитета до вакцинации и последующей коррекции развития поствакцинального иммунитета, прежде всего, в группах повышенного риска. Он вы-

двинул и экспериментально обосновал теоретическое положение об антигенах гистосовместимости как универсальных рецепторах антигенов и хранителях антигенной информации, определяющих иммунологическую индивидуальность человека при вакцинации.

Научными исследованиями Николая Васильевича доказана важная роль продуктов генов главного комплекса гистосовместимости класса II в межклеточном взаимодействии, определено их участие в распознавании антигенов, инициации и формировании иммунного ответа, изучена патогенетическая значимость при аутоиммунных и аллергических заболеваниях.

Большой научный вклад Н.В. Медуницын внес в изучение медиаторов иммунного ответа — цитокинов, роли экзогенных цитокинов в развитии адаптивного иммунитета. Под руководством Николая Васильевича выполнены экспериментальные исследования по изучению адъювантного действия цитокинов на иммунную активность вакцин против гепатитов А и В, бешенства и клещевого энцефалита.

Николай Васильевич является автором более 460 научных работ, трех изданий книги «Вакцинология» (1999, 2004, 2010), книги «Теория и практика вакцинологии» (2015), монографий, авторских свидетельств и патентов на изобретения, соавтор ряда методик получения новых препаратов, а также нормативных документов, методических рекомендаций, указаний и санитарных правил по производству и контролю биологических лекарственных препаратов. Под руководством Н.В. Медуницына защищено 22 диссертации, в том числе 6 диссертаций на соискание ученой степени доктора наук.

Академик Н.В. Медуницын в течение многих лет являлся экспертом ВОЗ, длительное время был членом Комитета биологической стандартизации ВОЗ.

Николай Васильевич — основатель и первый главный редактор научно-практического журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Н.В. Медуницын награжден орденом Почета (2007), медалями «За заслуги перед отечественным здравоохранением» (2001), «В память 850-летия Москвы» (1997), дипломами премии РАМН имени В.Д. Тимакова и Академии медико-технических наук имени Е.И. Смирнова. В 1999 г. ему присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации».

Сердечно поздравляем Николая Васильевича с юбилеем! Искренне желаем крепкого здоровья, оптимизма, жизнелюбия, благополучия и счастья.

Благодарности рецензентам (2021 г.)

Thank you to all our reviewers in 2021

Редакция журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» выражает благодарность за вклад в работу над статьями и плодотворное сотрудничество при подготовке выпусков журнала в 2021 году следующим рецензентам:

Е.Г. Абрамовой (Саратов, Россия),
 А.П. Агафонову (Кольцово, Новосибирская обл., Россия),
 Н.В. Алексаниной (Ростов-на-Дону, Россия),
 М.К. Бакулину (Киров, Россия),
 С.В. Борисевичу (Сергиев Посад, Московская обл., Россия),
 Д.В. Боровскому (Киров, Россия),
 Р.А. Волковой (Москва, Россия),
 Л.А. Гайдеровой (Москва, Россия),
 А.С. Глотову (Санкт-Петербург, Россия),
 Л.В. Гмыль (Москва, Россия),
 И.В. Дармову (Киров, Россия),
 Е.М. Зайцеву (Москва, Россия),
 Е.Ю. Захаровой (Москва, Россия),
 О.Е. Ивановой (Москва, Россия),
 Г.М. Игнатьеву (Москва, Россия),
 Т.Н. Ильичевой (Кольцово, Новосибирская обл., Россия),
 А.А. Ильичеву (Кольцово, Новосибирская обл., Россия),
 А.А. Казарову (Вольгинский, Владимирская обл., Россия),
 Г.Г. Каргановой (Москва, Россия),
 А.Н. Коваленко (Санкт-Петербург, Россия),
 Е.Н. Косообоковой (Москва, Россия),
 М.П. Костинову (Москва, Россия),
 А.В. Кузнецовскому (Киров, Россия),
 А.А. Кульминской (Санкт-Петербург, Россия),
 А.А. Куриловой (Ставрополь, Россия),
 К.В. Лепику (Санкт-Петербург, Россия),
 М.А. Лосич (Москва, Россия),
 С.Я. Логиновой (Сергиев Посад, Московская обл., Россия),
 Д.В. Мазурову (Москва, Россия),
 П.И. Макаревичу (Москва, Россия),
 А.Н. Миронову (Москва, Россия),
 А.А. Мовсесянцу (Москва, Россия),
 Е.В. Мельниковой (Москва, Россия),

К.М. Мефеду (Москва, Россия),
 А.К. Никифорову (Саратов, Россия),
 Н.Ф. Никитюк (Москва, Россия),
 С.А. Нимирской (Сергиев Посад, Московская обл., Россия),
 А.С. Оксаничу (Москва, Россия),
 Е.В. Орловой (Пермь, Россия),
 К.И. Павлову (Минск, Россия),
 Ю.И. Пашенко (Сергиев Посад, Московская обл., Россия),
 О.В. Перелыгиной (Москва, Россия),
 Т.М. Плехановой (Сергиев Посад, Московская обл., Россия),
 Д.А. Потеряеву (Вольгинский, Владимирская обл., Россия),
 А.Л. Попцову (Москва, Россия),
 А.М. Пятницкому (Москва, Россия),
 А.А. Ризванову (Казань, Россия),
 И.А. Родину (Москва, Россия),
 Л.В. Саяпиной (Москва, Россия),
 А.С. Семихину (Москва, Россия),
 С.Я. Скачиловой (Старая Купавна, Россия),
 Н.А. Скрябину (Томск, Россия),
 И.О. Стоме (Гомель, Республика Беларусь),
 С.М. Сухановой (Москва, Россия),
 Е.А. Ткаченко (Москва, Россия),
 Н.К. Токаревичу (Санкт-Петербург, Россия),
 И.Ю. Торопыгину (Москва, Россия),
 О.Б. Устинниковой (Москва, Россия),
 Р.А. Хамитову (Вольгинский, Владимирская обл., Россия),
 А.Л. Хмелеву (Сергиев Посад, Московская обл., Россия),
 А.П. Черданцеву (Ульяновск, Россия),
 Н.К. Черниковой (Сергиев Посад, Московская обл., Россия),
 Н.Е. Шарাপовой (Москва, Россия),
 М.М. Шмарову (Москва, Россия),
 А.А. Шмидт (Москва, Россия).



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

Подписной индекс издания:

- с любого номера в региональных агентствах подписки
«Урал-Пресс» (www.ural-press.ru) — 57941
- По объединенному каталогу
«Пресса России» (www.pressa-rf.ru) — Т57941



ISSN 2221-996X



9 772221 996004