

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

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume	№ / No.
22	2
2022	

www.biopreparations.ru

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

**ТОМ 22, № 2,
АПРЕЛЬ – ИЮНЬ 2022**

**VOLUME 22, NO. 2,
APRIL–JUNE 2022**

Научно-практический журнал
Выходит ежеквартально (четыре выпуска в год)
Основан в 2001 году

Research and practice journal
Published quarterly (four issues per year)
Founded in 2001

Учредитель:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Founder:

Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products” of the Ministry of Health of the Russian Federation (Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products)

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 по следующим группам специальностей: биологические науки, профилактическая медицина, медико-биологические науки

The journal is included in the official List of peer-reviewed scientific journals which guarantee acknowledgement of the published research in the following fields: biological sciences, preventive medicine, life sciences by the State Commission that grants Candidate of Science and Doctor of Science degrees

Журнал индексируется в базах данных: Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM каталог, DOAJ, Ulrichsweb и др.

The journal is indexed in the following databases: Russian Science Citation Index (RSCI) including RSCI database, Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM Catalog, DOAJ, Ulrichsweb, etc.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается. Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

There is no fee for publishing an article and reviewing a manuscript. The content is licensed under Creative Commons Attribution International 4.0 CC-BY

Главный редактор

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва, Россия)

Заместители главного редактора

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

Хайтов 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)

В журнале публикуются обзорные, оригинальные, дискуссионные статьи по вопросам разработки регуляторных процедур, стандартизации, контроля качества, производства и применения терапевтических, профилактических и диагностических биологических лекарственных препаратов – иммунобиологических, биотехнологических, генотерапевтических и лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека и животных; а также различных групп иммуномодулирующих лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов.

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., академик РАН, ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Брико Николай Иванович, д-р мед. наук, проф., академик 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., филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)

Дегтярев Сергей Харитонович, д-р биол. наук, проф., НПО «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. Сеченова Минздрава России (Москва, Россия)

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

Игнатъев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., СПбНИИВС ФМБА России (Санкт-Петербург, 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» Роспотребнадзора (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» Минздрава 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 имени Пастера (Санкт-Петербург, 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)

Учредитель и издатель

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Шеф-редактор

Федотова О.Ф.

+7(495)121-06-00 (доб. 63-05)

Fedotovaof@expmed.ru

Научные редакторы

Гуасова Н.В., канд. биол. наук

Лебединская Е.В., канд. биол. наук

Редактор перевода

Балтина Л.А.

Адрес учредителя и редакции

127051, Москва,

Петровский б-р, д. 8, стр. 2

тел.: +7(499)190-18-18

(доб. 63-42, 63-02, 63-35)

biopreparaty@expmed.ru

Исполнитель

ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва,

ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

Типография

ООО «Издательство «Триада»: 170034,

Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514

Тираж

100 экз. Цена свободная

Подписано в печать

29.06.2022

Дата выхода в свет

01.07.2022

Подписной индекс

в каталоге «Пресса России» – 57941,

в каталоге агентства «Урал-Пресс» –

57941

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство ПИ № ФС77-82918 от 14 марта 2022 г.

© Составление. Оформление. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

В.В. Машин, А.Н. Сергеев, Н.Н. Мартынова, Т.В. Антипина,
Е.И. Саканян, В.В. Катаева, Н.В. Загидуллин

Минимизация риска вирусной контаминации гетерологичных иммуноглобулинов в рамках требований Государственной фармакопеи Российской Федерации 112

В.П. Трухин, А.Э. Евтушенко, Е.Л. Салимова, А.Д. Конон,
М.Р. Хаитов, В.А. Меркулов

Анализ серотипового пейзажа пневмококков для определения композиционной модели отечественной пневмококковой конъюгированной вакцины .. 124

Е.Э. Евреинова, Л.М. Хантимирова, В.А. Шевцов, В.А. Меркулов,
В.П. Бондарев

Перспективные направления в совершенствовании вакцин для профилактики полиомиелита 142

А.С. Минеро, О.Б. Рунова, О.Б. Устинникова, А.А. Мовсисянц

Перспективы применения метода ионной хроматографии в оценке качества биологических лекарственных препаратов 154

Оригинальные статьи

В.А. Евсеев, А.С. Гудимо, Н.В. Данильченко, С.В. Святченко,
О.С. Таранов, А.Б. Рыжиков

Разработка и лабораторное получение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов, оценка их адъювантных свойств при иммунизации мышей гриппозными антигенами 170

Д.А. Шаров, А.А. Лещенко, Е.А. Коваленко, Д.В. Боровской,
В.В. Крупин, С.В. Багин, Д.А. Мохов, А.Г. Лазыкин, И.В. Косенков,
А.Н. Мошков

Разработка технологии приготовления сухой питательной среды для производства сибиреязвенной вакцины 187

С.А. Курчева, А.Г. Кошкидько, И.В. Жарникова, Д.В. Русанова,
А.А. Семирчева, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова, М.М. Курносина,
И.С. Тюменцева

Разработка защитной среды высушивания и режима лиофилизации для стабилизации диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового 196

А.А. Воропаев, О.В. Фадейкина, Т.Н. Ермолаева, Д.С. Давыдов
Влияние материала бюксов на воспроизводимость методики определения потери в массе при высушивании 208

Методические материалы

О.Б. Устинникова, Р.А. Волкова, А.А. Мовсисянц, В.А. Меркулов,
В.П. Бондарев

Рекомендации по аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков 218

Ретракция

Ретракция статьи: Лиджиева А.А., Смолярчук Е.А., Ельцова Е.А. Биоаналоги – преимущества и перспективы 226

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Editor-in-Chief

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation (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)

The journal *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* publishes reviews, original articles, and discussion articles on such issues as development of regulatory procedures, standardisation, quality control, production and use of biological products for disease prevention, diagnosis, and treatment immunobiological, biotechnological, gene therapy, human and animal blood plasma products, as well as various groups of immunomodulatory and biomedical cell products.

Editorial Board

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

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

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., Academician 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., Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations (Saint Petersburg, 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)

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)

Founder and publisher

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

Managing Editor

Olga F. Fedotova

+7(495)121-06-00 (63-05)

Fedotovaof@expmed.ru

Science Editor

Nadezhda V. Gukasova, Cand. Sci. (Biol.)

Elena V. Lebedinskaya, Cand. Sci. (Biol.)

Translation Editor

Liubov A. Baltina

Postal address of the founder and editorial office

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

Tel.: +7(499)190-18-18

(63-42, 63-02, 63-35)

biopreparaty@expmed.ru

Contract publisher

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

Printing office

"Triada" publishing house: 9 Tchaikovsky
Ave, office 514, Tver 170034

Print run

100 copies. Free price

Passed for printing

29 June 2022

Date of publication

1 July 2022

Subscription codes

are provided in the catalogues of
Pressa Rossii—57941 and Ural-Press
agency—57941

The journal is registered as mass media
by the Federal Service for Supervision
of Communications, Information
Technologies and Mass Communications.
Certificate PI No. FS77-82918 dated
14 March 2022

© Compilation, design. Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal
Products, 2022

CONTENTS

Reviews

V.V. Mashin, A.N. Sergeev, N.N. Martynova, T.V. Antipina,
E.I. Sakanyan, V.V. Kataeva, N.V. Zagidullin
**Minimisation of the viral contamination risk of heterologous
immunoglobulins in the context of the requirements
of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation** 112

V.P. Trukhin, A.E. Evtushenko, E.L. Salimova, A.D. Konon,
M.R. Khaitov, V.A. Merkulov
**Analysis of pneumococcal serotypes distribution
to determine a model composition for a Russian pneumococcal
conjugate vaccine** 124

E.E. Evreinova, L.M. Khantimirova, V.A. Shevtsov, V.A. Merkulov,
V.P. Bondarev
Promising opportunities to improve polio vaccines 142

A.S. Minero, O.B. Runova, O.B. Ustinnikova, A.A. Movsesyants
**Prospects for ion chromatography in quality assessment
of biologicals** 154

Original Articles

V.A. Evseenko, A.S. Gudymo, N.V. Danilchenko, S.V. Svyatchenko,
O.S. Taranov, A.B. Ryzhikov
**Development and laboratory production of virus-like
immune-stimulating complexes based on saponins
and evaluation of their adjuvant potential
using mice immunisation with influenza antigens** 170

D.A. Sharov, A.A. Leshchenko, E.A. Kovalenko, D.V. Borovskoy,
V.V. Krupin, S.V. Bagin, D.A. Mokhov, A.G. Lazykin, I.V. Kosenkov,
A.N. Moshkov
**Development of a technology for the preparation
of a dry nutrient medium for anthrax vaccine production** 187

S.A. Kurcheva, A.G. Koshkidko, I.V. Zharnikova, D.V. Rusanova,
A.A. Semircheva, O.L. Startseva, E.V. Zhdanova, M.M. Kurnoskina,
I.S. Tyumentseva
**Development of a protective lyophilisation medium
and conditions to stabilise the erythrocyte diagnostic
preparation of tularaemia immunoglobulin** 196

A.A. Voropaev, O.V. Fadeikina, T.N. Ermolaeva, D.S. Davydov
**Influence of the material of weighing bottles
on loss-on-drying reproducibility** 208

Methodical Approaches

O.B. Ustinnikova, R.A. Volkova, A.A. Movsesyants, V.A. Merkulov,
V.P. Bondarev
**Recommendations on the certification
of reference standards for structure identification
of recombinant therapeutic proteins** 218

Retraction

**Retraction of the article: Lidzhiyeva A.A., Smolyarchuk E.A.,
Elitsova E.A. Biosimilars – advantages and prospects** 226



Минимизация риска вирусной контаминации гетерологичных иммуноглобулинов в рамках требований Государственной фармакопеи Российской Федерации

В.В. Машин , А.Н. Сергеев, Н.Н. Мартынова, Т.В. Антипина, Е.И. Саканян, В.В. Катаева, Н.В. Загидуллин

Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», 2-й Волконский переулок, д. 10, Москва, 127473, Российская Федерация

✉ Машин Вадим Владимирович; v.v.mashin@microgen.ru

Резюме

Для обеспечения безопасности применения различных инъекционных лекарственных препаратов (ЛП) на основе специфических иммуноглобулинов животного происхождения и успешной их регистрации необходимо исключить их контаминацию патогенными для человека посторонними агентами. При этом наиболее сложным является вопрос обеспечения вирусной безопасности таких препаратов, так как в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) требования к гетерологичным иммуноглобулинам на этапах их производства по этому показателю представлены не в полном объеме. Цель работы – анализ требований общих фармакопейных статей и фармакопейных статей ГФ РФ XIV изд., монографий Европейской фармакопеи 10 изд., Британской фармакопеи 2019 г., Фармакопеи США (USP 43–NF 38), Японской фармакопеи 17 изд., а также рекомендаций Европейского агентства по лекарственным средствам и Всемирной организации здравоохранения к вирусной безопасности ЛП для медицинского применения на основе гетерологичных специфических иммуноглобулинов. Проведен анализ регуляторных требований по следующим вопросам: требования к антигену для иммунизации животных-продуцентов сыворотки/плазмы крови; требования к животным-продуцентам сыворотки/плазмы крови; требования к карантинизации животных-продуцентов сыворотки/плазмы крови; требования к тестам на вирусную контаминацию пулов иммунной сыворотки/плазмы крови животных; требования к модельным вирусам для проведения валидации процессов инактивации/удаления вирусов на разных стадиях производства ЛП; требования к снижению показателя вирусной нагрузки на каждой из стадий вирусной инактивации/удаления; требования к тестированию материалов на наличие вирусов на критических стадиях производства ЛП. Подготовлены предложения по включению в фармакопейные стандарты качества ГФ РФ разделов, характеризующих мероприятия по минимизации риска вирусной контаминации ЛП на основе гетерологичных иммуноглобулинов для медицинского применения на разных этапах их производства.

Ключевые слова: сыворотка и иммуноглобулин гетерологичные; вирусная контаминация; Государственная фармакопея; Европейская фармакопея; Фармакопея США; Британская фармакопея; Японская фармакопея; Европейское агентство по лекарственным средствам; Всемирная организация здравоохранения

Для цитирования: Машин В.В., Сергеев А.Н., Мартынова Н.Н., Антипина Т.В., Саканян Е.И., Катаева В.В., Загидуллин Н.В. Минимизация риска вирусной контаминации гетерологичных иммуноглобулинов в рамках требований Государственной фармакопеи Российской Федерации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):112–123. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-112-123>

Minimisation of the viral contamination risk of heterologous immunoglobulins in the context of the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation

V.V. Mashin ✉, A.N. Sergeev, N.N. Martynova, T.V. Antipina, E.I. Sakanyan,
V.V. Kataeva, N.V. Zagidullin

Scientific and Production Association for Immunological Preparations "Microgen",
10 2nd Volkonsky Ln., Moscow 127473, Russian Federation

✉ Vadim V. Mashin; v.v.mashin@microgen.ru

Abstract

To ensure the safety and to secure the approval of injectable medicinal products based on antigen-specific immunoglobulins of animal origin, it is necessary to exclude their contamination with adventitious human pathogens. Ensuring the viral safety of heterologous immunoglobulins presents a major challenge, because the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14 edition, lacks production stage-specific viral safety requirements for such medicinal products. The aim of the study was to analyse the requirements set forth in general and individual monographs of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, the European Pharmacopoeia, (10th edition), the British Pharmacopoeia (2019), the United States Pharmacopoeia (USP 43–NF 38), the Japanese Pharmacopoeia (17th edition), as well as the recommendations of the European Medicines Agency and the World Health Organisation concerning the viral safety of medicinal products for human use based on heterologous antigen-specific immunoglobulins. The authors analysed regulatory requirements for the following: serum/plasma-producing animals; immunisation antigens for the animals; quarantine of the animals; viral contamination tests for immune animal serum/plasma pools; model viruses to validate viral inactivation/removal processes at different stages of vaccine production; viral load reduction at each inactivation/removal step; testing of materials obtained at critical production stages. The authors drafted sections for quality standards on production stage-specific measures to minimise the viral contamination risk of medicinal products for human use based on heterologous immunoglobulins, which they proposed for inclusion to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Key words:

heterologous serum; heterologous immunoglobulin; viral contamination; State Pharmacopoeia of the Russian Federation; European Pharmacopoeia; United States Pharmacopoeia; British Pharmacopoeia; Japanese Pharmacopoeia; European Medicines Agency; World Health Organisation

For citation:

Mashin V.V., Sergeev A.N., Martynova N.N., Antipina T.V., Sakanyan E.I., Kataeva V.V., Zagidullin N.V. Minimisation of the viral contamination risk of heterologous immunoglobulins in the context of the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *BIO-preparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):112–123. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-112-123>

Введение

В настоящее время как в Российской Федерации, так и за рубежом разрабатываются и производятся парентеральные лекарственные препараты (ЛП) для медицинского применения на основе специфических иммуноглобулинов животного происхождения [1–3], предназначенные для лечения различных заболеваний. Чаще всего для этой цели используют кровь иммуни-

зированных лошадей, крупного рогатого скота и верблюдов [4–6]. С целью обеспечения безопасности применения таких ЛП необходимо свести к нулю риск их контаминации вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами. Благодаря наличию нормативных требований и соответствующих методов оценки качества ЛП (общая фармакопейная статья – ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность¹; ОФС.1.7.2.0006.15 Испытание

¹ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов²; ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм³) на присутствие/отсутствие последних трех видов микроорганизмов в сыворотке/плазме крови животных и в промежуточных продуктах ЛП вопрос обеспечения надлежащей микробиологической чистоты/стерильности решается путем проведения валидированных стадий стерилизации на различных этапах производства (ОФС.1.1.0016.18 Стерилизация⁴).

Гораздо более трудоемкой является задача проведения контроля сыворотки/плазмы крови животных и промежуточных продуктов ЛП на ее основе на наличие вирусных агентов, что обусловлено следующими факторами.

1. К настоящему времени существует большой и постоянно расширяющийся перечень вирусных инфекций у различных видов животных, сыворотка/плазма крови которых используется в производстве ЛП.
2. Для осуществления контроля контаминации материалов потенциально возможными видами вирусных агентов наработка вируса на чувствительных биосистемах может выполняться от 2 до 90 сут в зависимости от вида вируса, при этом применяются следующие биосистемы, освобожденные от вирусных агентов:
 - аттестованные виды культур клеток;
 - свободные от патогенной микрофлоры куриные эмбрионы (КЭ) разных возрастов;
 - свободные от патогенной микрофлоры различные виды лабораторных животных [7, 8].
3. Для инокуляции используемых биосистем (перед началом наработки потенциально возможных видов вирусных агентов) могут понадобиться разные методы введения исследуемых материалов (для культур клеток – в монослой, в суспензию; для КЭ – на хорионаллантоисную оболочку, в аллантоисную полость, в желточный мешок и др.; на лабораторных животных – интрацеребрально, подкожно, интраназально и др.), что также представляет дополнительные трудности с определением наиболее адекватного метода введения вирусов.
4. Для осуществления стадии детекции потенциально возможных видов вирусных агентов (после проведенной стадии их наработки)

может потребоваться широкий спектр методов их учета, например визуальный просмотр (регистрация внешней симптоматики заболевания лабораторных животных; наличие бляшек и их вид на хорионаллантоисных оболочках КЭ), микроскопический просмотр (регистрация наличия цитопатического эффекта, синцития, специфических включений и выростов на культурах клеток), методы гемагглютинации и гемадсорбции с использованием эритроцитов различного происхождения (петух, морская свинка, человек и т. д.) и др.

Таким образом, при проведении контроля вирусной контаминации необходимо учитывать расширяющийся спектр потенциально опасных вирусных инфекций, длительность наработки вируса и особенности чувствительной биосистемы, особенности инокуляции потенциально содержащего вирус материала в биосистему и широкий спектр способов детекции вирусов.

Для минимизации риска вирусной контаминации сыворотки/плазмы крови животных и промежуточных продуктов ЛП на ее основе их производство и контроль должны осуществляться с учетом требований действующей Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV), так как в I части I тома Фармакопеи Евразийского экономического союза (Фармакопеи ЕАЭС) не представлены соответствующие ОФС. В то же время в ряде случаев в ОФС и фармакопейных статьях (ФС) ГФ РФ XIV соответствующие требования к вирусной безопасности гетерологичных иммуноглобулинов представлены фрагментарно. В связи с тем что в настоящее время активно ведется работа по гармонизации ОФС и ФС ГФ РФ XIV в соответствии с международными стандартами, необходимо проведение анализа требований Европейской фармакопеи 10 изд. (European Pharmacopoeia 10th ed., Ph. Eur. 10), Британской фармакопеи 2019 г. (British Pharmacopoeia 2019, BP 2019), Фармакопеи США (United States Pharmacopoeia – National Formulary, USP 43–NF 38), Японской фармакопеи 17 изд. (Japanese Pharmacopoeia 17th ed., JP 17), а также рекомендаций Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по вопросам обеспечения вирусной безопасности ЛП

² Общая фармакопейная статья 1.7.2.0006.15 Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ Общая фармакопейная статья 1.1.0016.18 Стерилизация. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

для медицинского применения на основе гетерологичных специфических иммуноглобулинов. При сравнительном анализе требований перечисленных нормативных документов необходимо учитывать следующие аспекты:

- приготовление цельного антигена для иммунизации животных;
- подбор животных (доноров крови), получение от них иммунной сыворотки/плазмы крови после иммунизации целевым антигеном;
- проведение очистки и концентрирования антител или их фрагментов из иммунной сыворотки крови (к соответствующему целевому антигену) и производство ЛП.

Цель работы – анализ требований общих фармакопейных статей и фармакопейных статей ГФ РФ XIV изд., монографий Европейской фармакопеи 10 изд., Британской фармакопеи 2019 г., Фармакопеи США (USP 43–NF 38), Японской фармакопеи 17 изд., а также рекомендаций Европейского агентства по лекарственным средствам и Всемирной организации здравоохранения к вирусной безопасности ЛП для медицинского применения на основе гетерологичных специфических иммуноглобулинов.

В задачи исследования входило проведение анализа следующих регуляторных требований: к антигену для иммунизации животных-производителей сыворотки/плазмы крови; к животным-производителям сыворотки/плазмы крови; к карантинизации животных-производителей сыворотки/плазмы крови; к тестам на вирусную контаминацию иммунной сыворотки/плазмы крови животных; к модельным вирусам для проведения валидации процессов инактивации/удаления вирусов на разных стадиях производства ЛП; к снижению показателя вирусной нагрузки на каждой из стадий вирусной инактивации/удаления; к тестированию материалов на наличие вирусов на критических стадиях производства ЛП; а также формирование предложений по включению в фармакопейные статьи ГФ РФ разделов, характеризующих мероприятия по минимизации

риска вирусной контаминации препаратов гетерологичных специфических иммуноглобулинов на разных этапах их производства.

Требования к антигену для иммунизации животных-производителей сыворотки/плазмы крови

Проведенный анализ показал, что в ГФ РФ XIV отсутствуют какие-либо требования к целевому антигену для проведения иммунизации животных (доноров крови). Однако в ОФС, регламентирующей испытания вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов, указано, что испытания на присутствие таких агентов осуществляются с использованием клеточной культуры и лабораторных животных (мыши, морские свинки и куриные эмбрионы)⁵. В то же время согласно Европейской фармакопее 10 изд.⁶ и Британской фармакопее 2019 г.⁷ для антигенов должно быть показано, что они не содержат посторонних инфекционных агентов. В Фармакопее США (USP 43–NF 38) и Японской фармакопее 17 изд. требований к антигену для иммунизации животных не приведено. В рамках рекомендаций ЕМА⁸ антигены должны быть охарактеризованы, а если они были получены на линиях клеток, то должны выполняться требования руководств CPMP/ICH/294/95⁹ и CPMP/ICH/295/95¹⁰ по работе с клеточными линиями. ВОЗ¹¹ рекомендует показывать с помощью адекватных тестов, что антиген свободен от контаминации вирусами.

Требования к животным-производителям сыворотки/плазмы крови

Согласно требованиям ГФ РФ XIV¹² животные, используемые для получения сыворотки/плазмы крови, должны быть абсолютно здоровыми и свободными от гельминтов и инфекционных агентов, перечисленных в утвержденном перечне заболеваний, в том числе от возбудителей заболеваний, специфичных для мест разведения животных. Не допускается использование

⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0006.15 Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁶ Immunosera for human use, animal 04/2021:0084. European Pharmacopoeia 10th ed. Vol. 1.

⁷ Immunosera (incorporating Ph. Eur. Supplement 9.7, effective 01.04.2019). British Pharmacopoeia; 2019.

⁸ Guideline on production and quality control of animal immunoglobulins and immunosera for human use. (EMA/CHMP/BWP/3354/1999 rev.1). EMA; 2016.

⁹ ICH 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), 1995.

¹⁰ ICH Q5A(R1). Note for guidance on quality of biotechnological products: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin (CPMP/ICH/295/95), 1995.

¹¹ Annex 2. Requirements for Immunosera of Animal Origin. WHO Technical Report Series No 413. WHO; 1969.

¹² Общая фармакопейная статья 1.8.1.0004.15 Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

животных из районов, в которых обнаружено заболевание губчатой энцефалопатией. Животные должны быть взяты из хозяйств закрытого типа, благополучных по инфекционным заболеваниям; статус хозяйства должен подтверждаться соответствующими документами. В соответствии с ОФС.1.7.2.0006.15¹³ испытания на присутствие посторонних агентов осуществляются с использованием клеточной культуры и лабораторных животных. Согласно требованиям Европейской фармакопеи 10 изд.¹⁴ и Британской фармакопеи 2019 г.¹⁵ животные (доноры крови) должны быть проверены и признаны свободными от инфекционных агентов, обозначенных в списке характерных для них заболеваний; в некоторых случаях рассматриваются дополнительные специфические агенты в зависимости от географического расположения предприятия, используемого для разведения и производства животных. В Фармакопее США (USP 43–NF 38) требования к животным (донорам крови) отсутствуют. Согласно Японской фармакопее 17 изд.¹⁶ в производстве биологических препаратов должны использоваться только здоровые животные, у которых не наблюдается признаков заболевания; сырье, применяемое в производстве препаратов, должно быть свободным от посторонних вирусов. Следует периодически проводить обследование животных для исключения у них инфекционных заболеваний. Для производства ЛП запрещено использование диких животных; следует использовать животных из питомников, отвечающих принципам, применяемым в отношении животных, свободных от специфических патогенов (specific pathogen free, SPF)¹⁷. Необходимо иметь доказательства того, что животные здоровы, либо с помощью тестов с нуклеиновыми кислотами (nucleic acid

test, NAT), либо серологических исследований. Согласно рекомендациям ЕМА¹⁸ животных (доноров крови) предполагается содержать в закрытом племенном и производственном питомнике; следует указывать линию, происхождение и количество животных; тестирование на вирусы предполагается проводить в лабораториях, имеющих опыт такого тестирования. В соответствии с рекомендациями ВОЗ¹⁹ для получения сыворотки/плазмы крови предполагается использование только здоровых животных; присутствие сапа у лошадей следует исключить путем тестирования, если необходимо, с помощью маллеина.

Требования к карантинизации животных-продуцентов сыворотки/плазмы крови

Согласно требованиям ГФ РФ XIV животные, используемые для приготовления сыворотки/плазмы крови, при поступлении должны пройти карантинизацию, а лошади и крупный рогатый скот дополнительно – иммунизацию столбнячным анатоксином²⁰. В соответствии с требованиями Европейской фармакопеи 10 изд.²¹, Британской фармакопеи 2019 г.²² и рекомендациями ЕМА²³ введение животных в закрытое стадо для использования в производстве осуществляется в соответствии с установленными процедурами, включая определение карантинных мер. При этом в Европейской фармакопее 10 изд. и Британской фармакопее 2019 г. дополнительно требуется нахождение животных на карантине не менее 1 недели перед иммунизацией целевым антигеном. Требования к карантинизации животных в Фармакопее США (USP 43–NF 38) и Японской фармакопее 17 изд. отсутствуют. ВОЗ²⁴ рекомендует, чтобы животные

¹³ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0006.15 Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹⁴ Immunosera for human use, animal 04/2021:0084. European Pharmacopoeia 10th ed. Vol. 1.

¹⁵ Immunosera (incorporating Ph.Eur. Suppl. 9.7, effective 01.04.2019). British Pharmacopoeia; 2019.

¹⁶ Qualification of animals as origin of animal-derived medicinal products provided in the general notices of Japanese Pharmacopoeia and other standards. Japanese Pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

¹⁷ Basic requirements for viral safety of biotechnological/biological products listed in Japanese Pharmacopoeia. Japanese Pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

¹⁸ Guideline on production and quality control of animal immunoglobulins and immunosera for human use. (EMA/CHMP/BWP/3354/1999 rev.1). EMA; 2016.

¹⁹ Annex 2. Requirements for Immunoserum of Animal Origin. WHO Technical Report Series No 413; 1969.

²⁰ Общая фармакопейная статья 1.8.1.0004.15 Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

²¹ Immunosera for human use, animal 04/2021:0084. European Pharmacopoeia 10th ed. Vol. 1.

²² Immunosera (incorporating Ph. Eur. Suppl. 9.7, effective 01.04.2019). British Pharmacopoeia; 2019.

²³ Guideline on production and quality control of animal immunoglobulins and immunosera for human use. (EMA/CHMP/BWP/3354/1999 rev.1). EMA; 2016.

²⁴ Annex 2. Requirements for Immunoserum of Animal Origin. WHO Technical Report Series No 413; 1969.

перед иммунизацией находились под наблюдением на карантине не менее 7 суток.

Требования к тестам на вирусную безопасность пулов иммунной сыворотки/плазмы крови животных

В ГФ РФ XIV требования к тестированию сыворотки/плазмы крови животных-доноров на вирусную безопасность отсутствуют. В соответствии с ОФС.1.7.2.0006.15 испытания на присутствие посторонних агентов в вирусных вакцинах осуществляются с использованием клеточной культуры и лабораторных животных²⁵. В рамках Европейской фармакопеи 10 изд.²⁶ и Британской фармакопеи 2019 г.²⁷ необходимо проверять каждый пул сыворотки/плазмы крови животных-доноров на наличие вирусов соответствующими тестами *in vitro*, а также тестировать на вирусы путем инокуляции чувствительных культур клеток для выявления спектра вирусов, присутствие которых возможно в конкретном ЛП. По требованиям Фармакопеи США (USP 43–NF 38) рутинное тестирование необходимо проводить на стадии получения пулов сыворотки/плазмы крови²⁸. Для доказательства отсутствия вирусных агентов требуется тестирование на линиях клеток. По требованиям Японской фармакопеи 17 изд. для пулов сывороток необходимо иметь доказательство того, что они свободны от возбудителей инфекционных заболеваний после соответствующей обработки сырья животного происхождения²⁹. Необходимо доказать, что пул сыворотки не заражен вирусами, опасными для человека и животных, что должно подтверждаться в серологических тестах и в исследованиях с помощью NAT³⁰. Согласно рекомендациям ЕМА пулы сыворотки/плазмы крови животных-доноров следует тестировать на отсутствие специфических и случайных вирусов с помощью соответствующих тестов *in vitro* и при необходимости *in vivo*; программа

тестирования зависит от индивидуального производственного процесса³¹. В случае обнаружения в пуле вирусного загрязнения необходимо представить доказательства того, что это вирусное загрязнение будет устранено или инактивировано в процессе производства. Рекомендации ВОЗ по вопросу тестирования на контаминацию вирусами пулов сыворотки/плазмы крови животных-доноров отсутствуют.

Требования к модельным вирусам для проведения валидации процессов инактивации/удаления вирусов на разных стадиях производства лекарственных препаратов

Согласно проанализированным ОФС и ФС ГФ РФ XIV, требования к модельным вирусам для проведения валидационных исследований инактивации/элиминации вирусов в материалах животного происхождения на стадиях производства ЛП не приведены. Европейская фармакопея 10 изд.³² и Британская фармакопея 2019 г.³³ по вопросу модельных вирусов для валидации ссылаются на рекомендации ЕМА, в которых указано, что в большинстве валидационных исследований применяются штаммы вирусов, которые легко получить и количественно определить³⁴. Таким образом, любой вирус, использованный для этих целей, является фактически модельным, однако выбор видов вирусов предлагается обосновать в соответствии с целями валидационных исследований.

Основные модельные вирусы, используемые для оценки эффективности стадий вирусной инактивации, относятся к трем группам: мелкие безоболочечные вирусы (SV40, полиовирус и парвовирус животных), крупные оболочечные вирусы (вирус парагриппа или мышинный ретровирус) и крупные ДНК-вирусы (герпесвирус). Приводится также следующий список модельных вирусов: SV40, вирус полиомиелита 1 типа

²⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0006.15 Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

²⁶ Immunosera for human use, animal 04/2021:0084. European Pharmacopoeia. 10th ed. Vol. 1.

²⁷ Immunosera (incorporating Ph. Eur. Suppl. 9.7, effective 01.04.2019). British Pharmacopoeia; 2019.

²⁸ USP 43–NF 38 <1237> Virology test methods.

²⁹ Basic requirements for viral safety of biotechnological/biological products listed in Japanese Pharmacopoeia. Japanese Pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

³⁰ Qualification of animals as origin of animal-derived medicinal products provided in the general notices of Japanese pharmacopoeia and other standards. Japanese pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

³¹ Guideline on production and quality control of animal immunoglobulins and immunosera for human use (EMA/CHMP/BWP/3354/1999 rev.1). EMA; 2016.

³² Viral safety 1/2008:50107 5.1.7. European Pharmacopoeia 10th ed. Vol. 1.

³³ Appendix XXII A. Viral safety (incorporating Ph.Eur. Suppl. 9.7, effective 01.04.2019). British Pharmacopoeia; 2019.

³⁴ Virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95), 1996.

(штамм Сэбина), парвовирус животных или некоторые другие некрупные безоболочечные вирусы; вирусы гриппа и парагриппа, вирус Синдбис или другие оболочечные РНК-вирусы от средних до крупных размеров; вирусы герпеса (например, ВПГ-1 или вирус псевдобешенства) или некоторые другие ДНК-вирусы от средних до крупных размеров. При этом отмечается, что вышеперечисленные вирусы являются рекомендуемыми примерами, их использование не обязательно. Список модельных вирусов, приведенный в требованиях Фармакопеи США (USP 43–NF 38)³⁵, практически идентичен рекомендуемому ЕМА. В Японской фармакопее 17 изд. требования к модельным вирусам отсутствуют. Рекомендации ВОЗ по данному вопросу не представлены.

Требования по снижению показателя вирусной нагрузки на каждой из стадий вирусной инактивации/удаления

Анализ требований ОФС и ФС ГФ РФ XIV показал, что информация о снижении уровня вирусной нагрузки на каждой из стадий вирусной инактивации в процессе производства ЛП не приведена. Однако рекомендовано, чтобы любой из используемых методов обработки был валидирован и обеспечивал значительное снижение риска вирусной контаминации ЛП, а процесс производства, как правило, должен включать один или несколько эффективных этапов инактивации и (или) элиминации вирусов. Согласно Европейской фармакопее 10 изд.³⁶ и Британской фармакопее 2019 г.³⁷ требуется применение при необходимости одной или нескольких проверенных процедур удаления или инактивации вирусов. При этом производство должно включать этап или этапы, на которых удаляют или инактивируют известные возбудители инфекций. В требованиях Фармакопеи США (USP 43–NF 38)³⁸ указано, что наиболее предпочтительным является использование более одного процесса вирусной

инактивации/элиминации, при этом не описано, насколько должна снижаться вирусная нагрузка на каждом этапе. Согласно Японской фармакопее 17 изд.³⁹ в процесс производства биологических препаратов должно быть включено не менее двух стадий вирусной инактивации/элиминации. Должно быть показано, что производственный процесс позволяет эффективно удалять инфекционные или патогенные вирусы. В рекомендациях ЕМА⁴⁰ указано, что снижение активности вируса на 4 lg или более свидетельствует о явном эффекте инактивации/элиминации для конкретного модельного вируса. По рекомендациям ВОЗ⁴¹ эффективный и надежный этап вирусной деконтаминации материалов позволяет снизить активность вируса обычно на 4 lg или более. При этом в производственный процесс предлагается включать два этапа по удалению или инактивации оболочечных вирусов, особенно если на этих этапах задействованы разные механизмы их инактивации/элиминации.

Требования к тестированию материалов на наличие вирусов на критических стадиях производства лекарственных препаратов

Метод и объем тестирования на вирусную контаминацию на критических стадиях производства ЛП согласно требованиям ГФ РФ XIV⁴² зависят от различных факторов, которые необходимо учитывать в индивидуальном порядке. Для выявления вирусной контаминации используют методы молекулярной генетики. Однако конкретные методы выявления контаминации вирусами сырья, полуфабриката или готового препарата в указанной ОФС не приведены. В ОФС.1.7.2.0006.15 описаны возможные методы выявления вирусной контаминации⁴³. Согласно этой статье подобные испытания осуществляются с использованием клеточной культуры и животных. При этом указано, что аналогичные

³⁵ USP 43–NF 38 <1050> Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin.

³⁶ Immunosera for human use, animal 04/2021:0084. European Pharmacopoeia 10th ed. Vol. 1. Viral safety 1/2008:50107 5.1.7. European Pharmacopoeia 10th ed. Vol. 1.

³⁷ Immunosera (incorporating Ph.Eur. Suppl. 9.7, effective 01.04.2019). British Pharmacopoeia; 2019.

³⁸ USP 43–NF 38 <1050> Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin.

³⁹ Basic requirements for viral safety of biotechnological/biological products listed in Japanese pharmacopoeia. Japanese pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

⁴⁰ Virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95), 1996.

⁴¹ Annex 4. Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. WHO Technical Report Series No 924; 2004.

⁴² Общая фармакопейная статья 1.2.4.0015.18 Вирусная безопасность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁴³ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0006.15 Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

подходы справедливы и в отношении испытания ЛП. В Европейской фармакопее 10 изд.⁴⁴ и Британской фармакопее 2019 г.⁴⁵ отмечено, что любой реагент биологического происхождения, используемый для производства иммунных препаратов, не должен содержать бактерий, грибов и вирусов. Причем оговаривается, что анализ рисков вирусной контаминации может проводиться в целом по стадиям «строгой» инактивации (например, стерилизация паром), если они входят в технологию производства препарата. По требованиям Фармакопеи США (USP 43–NF 38)⁴⁶ в процесс производства должны быть включены соответствующие режимы тестирования, которые отслеживают возможное введение случайных агентов и/или вирусов. В связи с этим чувствительные методы обнаружения вирусов необходимы не только для тестирования биологических ЛП на стадии выпуска, но и на промежуточных этапах производства. Согласно Японской фармакопее 17 изд.⁴⁷ необходимо проводить тщательный анализ и скрининг образца, выбранного в качестве субстрата животного происхождения для производства ЛП, для определения любой контаминации вирусом, а также его вида и происхождения. В соответствии с требованиями Японской фармакопеи⁴⁸ для предотвращения случайного заражения вирусом необходимо провести NAT на ЛП, сосредоточив внимание на наиболее опасном вирусе среди тех, которые могут присутствовать в сырье. В ЕМА приведены рекомендации⁴⁹, обязывающие производителей проводить испытание исходных материалов, что является обязательным условием минимизации вирусной контаминации; такие требования предъявляются и к ЛП. В другом документе ЕМА⁵⁰, касающемся ЛП, производимых на основе плазмы крови, тестирование образцов исходного и нерасфасованного материала на конкретные вирусные маркеры должно проводиться в соответствии с современными валидированными методами.

По рекомендациям ВОЗ⁵¹, касающимся оценки препаратов из плазмы крови человека, тестирование на вирусные маркеры, как правило, мало способствует вирусной безопасности: коммерчески доступные серологические тесты обычно не предназначены и не валидированы для использования с очищенными фракциями плазмы крови; тестирование с помощью иммуоферментного анализа обычно дает очень высокий уровень ложноположительных результатов; тестирование с помощью NAT не рекомендуется.

Согласно требованиям фармакопей разных стран и рекомендациям ВОЗ и ЕМА существует три основных группы методов для доказательства отсутствия/наличия вирусной контаминации в материалах животного происхождения:

- 1) группа молекулярно-генетических методов идентификации вирусов, нацеленная на выявление их генетических последовательностей (NAT): полимеразная цепная реакция различных видов, метагеномный анализ и др.;
- 2) группа иммунологических методов идентификации вирусов, нацеленная на выявление их антигенов: иммуоферментный анализ (ИФА) различных модификаций, иммунохроматографический и др.;
- 3) группа вирусологических методов детекции вирусов, нацеленная на выявление живых вирусов путем культивирования на чувствительных клеточных линиях (*in vitro*) и/или модельных животных (*in vivo*), включая КЭ.

С целью выбора наиболее оптимального подхода для выявления вирусных агентов в материалах животного происхождения была проведена сравнительная оценка вышеперечисленных групп методов (табл. 1).

Анализ данных (табл. 1) позволяет сделать заключение о том, что наиболее перспективной с точки зрения доступности и дешевизны выявления живых вирусов в материалах животного происхождения является группа вирусологических методов тестирования *in vitro* (на перевиваемых

⁴⁴ Immunosera for human use, animal 04/2021:0084. European Pharmacopoeia 10th ed. Vol. 1. Viral safety 1/2008:50107 5.1.7. European Pharmacopoeia 10th ed. Vol. 1.

⁴⁵ Immunosera (incorporating Ph.Eur. Suppl. 9.7, effective 01.04.2019). British Pharmacopoeia; 2019. Appendix XXII A. Viral safety (incorporating Ph.Eur. Suppl. 9.7, effective 01.04.2019). British Pharmacopoeia; 2019.

⁴⁶ USP 43–NF 38 <1237> Virology test methods.

⁴⁷ Qualification of animals as origin of animal-derived medicinal products provided in the general notices of Japanese Pharmacopoeia and other standards. Japanese Pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

⁴⁸ Basic requirements for viral safety of biotechnological/biological products listed in Japanese Pharmacopoeia. Japanese Pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

⁴⁹ Virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (CPMP/BWP/268/95), 1996.

⁵⁰ Note for guidance on plasma derived medicinal products (CPMP/BWP/269/95 rev. 3). EMEA; 2001.

⁵¹ Annex 4. Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. WHO Technical Report Series No 924; 2004.

Таблица 1. Сравнительные данные по оценке различных групп методов выявления вирусных агентов в материалах животного происхождения

Table 1. Comparative data on the assessment of various groups of methods for viral agent detection in materials of animal origin

№ п/п <i>Item No.</i>	Исследуемый параметр <i>Test parameter</i>	Группа биологических методов детекции вируса: <i>Biological group of virus detection methods:</i>		Группа молекулярно- генетических мето- дов идентификации вирусов <i>Molecular genetic group of virus identification methods</i>	Группа иммуноло- гических методов идентификации вирусов <i>Immunological group of virus identification methods</i>
		<i>in vitro</i> (на культу- рах клеток) <i>in vitro (in cell cultures)</i>	<i>in vivo</i> (на животных и куриных эмбри- онах) <i>in vivo (in animals and chicken embryos)</i>		
1	Возможность выявления только живого вируса <i>Ability to detect only live viruses</i>	Есть <i>Yes</i>	Есть <i>Yes</i>	Нет (только генетический материал) <i>No (only genetic material)</i>	Нет (только антигены) <i>No (only antigens)</i>
2	Возможность тестирования различных материалов животного происхождения <i>Possibility to test various animal materials</i>	Есть <i>Yes</i>	Есть <i>Yes</i>	Нет (только те материалы, которые указаны в инструкции по применению) <i>No (only the materials indicated in the instructions for use)</i>	
3	Необходимость регулярной закупки су- ществующих тест-систем на вирусы <i>Need for regular procurement of commercial test kits</i>	Нет <i>No</i>	Есть (закупка животных) <i>Yes (purchase of animals)</i>	Есть <i>Yes</i>	
4	Необходимость разработки новых тест-систем на вирусы <i>Need for new test systems development</i>	Нет <i>No</i>	Нет <i>No</i>	Есть, включая валидацию методов (отсутствуют тест-системы на многие виды вирусов разных видов животных) <i>Yes, including method validation (there are no test systems for many virus types of different animal species)</i>	
5	Чувствительность методов <i>Sensitivity of methods</i>	Высокая (с учетом трех «слепых» пассажей) <i>High (with 3 blind passages)</i>		Высокая <i>High</i>	Низкая <i>Low</i>
6	Длительность тестирования <i>Test duration</i>	Около 1 мес. (с учетом трех «слепых» пассажей) <i>About 1 month (with 3 blind passages)</i>		Несколько часов <i>Several hours</i>	Менее 1 ч <i>Less than 1 hour</i>

культурах клеток, чувствительных к патогенным для человека вирусам, вызывающим заболевания у соответствующих видов животных, материалы которых используются в производстве).

Предложения по включению в фармакопейные статьи Государственной фармакопеи Российской Федерации разделов, характеризующих мероприятия по минимизации риска вирусной контаминации препаратов гетерологичных специфических иммуноглобулинов

По результатам проведенного сравнительного анализа фармакопейных требований, а также

рекомендаций ЕМА и ВОЗ к вирусной безопасности ЛП для медицинского применения представляется целесообразным рассмотреть вопрос о включении в фармакопейные статьи ГФ РФ следующей информации:

- 1) в ОФС.1.8.1.0004.15 Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные⁵² в рамках дополнительно создаваемого подраздела «Требования к антигену для иммунизации животных-производителей сыворотки/плазмы крови» в разделе «Производство» предлагается внести следующую информацию: осуществлять наработку целевого антигена для иммунизации животных-производителей сыворотки/плазмы крови на биосистемах, свободных от вирусных контаминантов,

⁵² Общая фармакопейная статья 1.8.1.0004.15 Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

- проверяя все материалы животного происхождения, используемые для этого, на наличие/отсутствие живых вирусных агентов согласно ОФС.1.7.2.0006.15 Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов⁵³:
- в экспериментах *in vitro*: на одном (или более) виде перевиваемых культур клеток, чувствительных к патогенным для человека вирусам, вызывающим заболевания у соответствующих видов животных, материалы которых задействованы в производстве;
 - факультативно в экспериментах *in vivo*: на мышах, морских свинках и куриных эмбрионах, чувствительных к патогенным для человека вирусам, вызывающим заболевания у соответствующих видов животных, материалы которых задействованы в производстве;
- 2) в ОФС.1.8.1.0004.15 Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные⁵⁴ в рамках подраздела «Требования к животным-продуцентам плазмы/сыворотки крови» в разделе «Производство» предлагается внести следующую информацию: приобретение животных-продуцентов сыворотки/плазмы крови должно осуществляться из хозяйств закрытого типа, благополучных по инфекционным заболеваниям, включая заболевание губчатой энцефалопатией; статус хозяйства должен подтверждаться соответствующими документами; животные должны быть проверены на наличие/отсутствие живых вирусных агентов так, как описано в п. 1, а лошади дополнительно тестированы на наличие/отсутствие сапа;
- 3) в ОФС.1.8.1.0004.15 Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные⁵⁵ в подразделе «Требования к животным-продуцентам» в разделе «Производство» предлагается внести следующую информацию: проводить карантинизацию животных-продуцентов сыворотки/плазмы крови в течение не менее 1 недели перед началом вакцинации целевым антигеном;
- 4) в ОФС.1.8.1.0004.15 Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные⁵⁶ в рамках подраздела «Сбор плазмы/сыворотки крови» в разделе «Производство» предлагается внести следующую информацию: взятая от иммунизированных целевым антигеном животных сыворотка/плазма крови должна быть проверена на наличие/отсутствие живых вирусных агентов так, как описано в п. 1; в случае обнаружения таковых необходимо представить доказательства того, что это вирусное загрязнение будет устранено или инактивировано в процессе производства;
- 5) в ОФС.1.2.4.0015.18 Вирусная безопасность⁵⁷ в рамках раздела «Валидация процессов вирусной инаktivации или элиминации» предлагается внести следующую информацию: для проведения валидационных исследований инаktivации/элиминации вирусов должны быть использованы любые удобные для этого виды вирусов, относящиеся к 3 группам: безоболочечные, оболочечные ДНК-содержащие и оболочечные РНК-содержащие;
- 6) в ОФС.1.2.4.0015.18 Вирусная безопасность⁵⁸ в рамках раздела «Процессы вирусной инаktivации или элиминации» предлагается внести следующую информацию: в процессе производства ЛП должны быть использованы не менее двух технологических стадий с разными механизмами инаktivации/элиминации вирусов, каждая из которых обеспечивает снижение вирусной нагрузки в промежуточных продуктах ЛП не менее чем на 4 lg (>10000 раз);
- 7) в ОФС.1.8.1.0004.15 Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные⁵⁹ в рамках подраздела «Получение иммуноглобулинов или их фрагментов» в разделе «Производство» предлагается внести следующую информацию: проводить тестирование промежуточных продуктов ЛП на наличие/отсутствие живых вирусных агентов так, как описано в п. 1.

⁵³ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0006.15 Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁵⁴ Общая фармакопейная статья 1.8.1.0004.15 Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁵⁵ Там же.

⁵⁶ Там же.

⁵⁷ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0015.18 Вирусная безопасность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁵⁸ Там же.

⁵⁹ Общая фармакопейная статья 1.8.1.0004.15 Иммуноглобулины и сыворотки (антитела) гетерологичные. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Заключение

Проведен сравнительный анализ фармакопейных требований, а также рекомендаций ЕМА и ВОЗ к вирусной безопасности ЛП для медицинского применения, который показал, что некоторые требования, связанные с минимизацией рисков вирусной контаминации препаратов на основе гетерологичных специфических иммуноглобулинов на различных этапах производственного цикла, в ГФ РФ отражены не в полном объеме.

Подготовлены предложения по включению в фармакопейные статьи ГФ РФ разделов, ха-

рактеризующих мероприятия по минимизации риска вирусной контаминации ЛП на основе гетерологичных иммуноглобулинов для медицинского применения на разных этапах их производства.

Следует отметить, что представленные предложения о включении соответствующих пунктов в состав фармакопейных статей ГФ РФ XIV являются теоретическими и могут быть реализованы только после осуществления испытаний соответствующих методов детекции вирусов (как описано в п. 1) и проведения валидации наиболее пригодных методов на производстве.

Литература/References

1. Zylberman V, Sanguinetti S, Pontoriero AV, Higa SV, Cerutti ML, Morrone Seijo SM, et al. Development of a hyperimmune equine serum therapy for COVID-19 in Argentina. *Medicina (B Aires)*. 2020;80(Suppl 3):1–6.
2. Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Мовсисянц АА, Жулидов ИМ. Бешенство и антирабические иммунобиологические препараты: от прививки Пастера к современным биотехнологиям. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;(5):83–94. [Abramova EG, Nikiforov A., Movsesyants AA, Zhulidov IM. Rabies and rabies immunobiological preparations: vaccinations Pasteur to the contemporary biotechnology. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;(5):83–94 (In Russ.)] <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-83-94>
3. Al-Shekhadat RI, Lopushanskaya KS, Segura Á, Gutiérrez JM, Calvete JJ, Pla D. *Vipera berus berus* venom from Russia: venomics, bioactivities and preclinical assessment of Microgen antivenom. *Toxins*. 2019;11(2):90. <https://doi.org/10.3390/toxins11020090>
4. Pan X, Zhou P, Fan T, Wu Y, Zhang J, Shi X, et al. Immunoglobulin fragment F(ab')₂ against RBD potentially neutralizes SARS-CoV-2 *in vitro*. *Antiviral Res*. 2020;182:104868. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104868>
5. Ulfman LH, Leusen JHW, Savelkoul HFJ, Warner JO, Joost van Neerven RJ. Effects of bovine immunoglobulins on immune function, allergy, and infection. *Front Nutr*. 2018;5:52. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00052>
6. Lafaye P, Li T. Use of camel single-domain antibodies for the diagnosis and treatment of zoonotic diseases. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2018;60:17–22. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.09.009>
7. Ильичева ТН, Нетесов СВ, Гуреев ВН. *Вирусы гриппа. Методы*. Новосибирск: ИПЦ НГУ; 2019. [Ilyicheva TN, Netesov SV, Gureev VN. *Influenza viruses. Methods*. Novosibirsk: PPC NSU; 2019 (In Russ.)] https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_2099699#1
8. Lennartz F, Bayer K, Czerwonka N, Lu Y, Kehr K, Hirz M, et al. Surface glycoprotein of Borna disease virus mediates virus spread from cell to cell. *Cell Microbiol*. 2016;18(3):340–54. <https://doi.org/10.1111/cmi.12515>

Вклад авторов. В.В. Машин – систематизация данных, написание текста и оформление рукописи; А.Н. Сергеев – концепция и дизайн исследования, доработка текста рукописи; Н.Н. Мартынова – сбор данных, редактирование текста рукописи; Т.В. Антипина – сбор данных, оформление таблицы; Е.И. Саканян – критический пересмотр содержания рукописи; консультирование по вопросам регуляторных требований; В.В. Катаева – идея исследования, интерпретация результатов исследования; Н.В. Загидуллин – обобщение результатов исследования, формулировка заключения.

Благодарности. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

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

Authors' contributions. V.V. Mashin—data systematisation, drafting and formatting of the manuscript; A.N. Sergeev—elaboration of the research concept and design, revision of the manuscript; N.N. Martynova—data collection, editing of the manuscript; T.V. Antipina—data collection, preparation of the table; E.I. Sakanyan—critical revision of the manuscript, consultations on regulatory requirements; V.V. Kataeva—development of the research idea, interpretation of the research results; N.V. Zagidullin—consolidation of the research results, formulation of the conclusions.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out without sponsorship.

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

Об авторах / Authors

Машин Вадим Владимирович. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7032-5028>
v.v.mashin@microgen.ru

Сергеев Александр Николаевич, д-р мед. наук, проф. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5984-8776>
a.n.sergeev@microgen.ru

Мартынова Надежда Николаевна. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2957-8140>
n.n.martynova@microgen.ru

Антипина Татьяна Валерьевна. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7363-0033>
t.v.antipina@microgen.ru

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1693-2422>
e.i.sakanjan@microgen.ru

Катаева Валентина Васильевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6316-9397>
v.v.kataeva@microgen.ru

Загидуллин Наиль Виленович, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2849-1724>
n.v.zagidullin@microgen.ru

Vadim V. Mashin. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7032-5028>
v.v.mashin@microgen.ru

Alexander N. Sergeev, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5984-8776>
a.n.sergeev@microgen.ru

Nadezhda N. Martynova. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2957-8140>
n.n.martynova@microgen.ru

Tatiana V. Antipina. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7363-0033>
t.v.antipina@microgen.ru

Elena I. Sakanyan, Dr. Sci. (Pharm.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1693-2422>
e.i.sakanjan@microgen.ru

Valentina V. Kataeva. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6316-9397>
v.v.kataeva@microgen.ru

Nail V. Zagidullin, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2849-1724>
n.v.zagidullin@microgen.ru

Поступила 08.11.2021

После доработки 20.05.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Received 8 November 2021

Revised 20 May 2022

Accepted 10 June 2022



Анализ серотипового пейзажа пневмококков для определения композиционной модели отечественной пневмококковой конъюгированной вакцины

В.П. Трухин¹, А.Э. Евтушенко¹, Е.Л. Салимова¹, А.Д. Конон^{1,✉}, М.Р. Хаитов², В.А. Меркулов^{3,4}

¹ Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства, ул. Свободы, д. 52, г. Красное Село, Санкт-Петербург, 198320, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Каширское шоссе, д. 24, Москва, 115478, Российская Федерация

³ 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

⁴ 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

✉ Конон Анастасия Дмитриевна; a.d.konon@spbniivs.ru

Резюме

Заболевания, вызываемые *Streptococcus pneumoniae*, а также возникновение антибиотико-резистентных серотипов пневмококков являются ведущей причиной смертности детского населения во всем мире. С целью предотвращения пневмококковой инфекции применяют вакцинацию с использованием конъюгированных вакцин, содержащих различное количество полисахаридов определенных серотипов. В Российской Федерации зарегистрированы вакцины, активные фармацевтические субстанции для которых производятся за рубежом, а на территории Российской Федерации локализируются только финишные стадии производства вакцин данной группы, поэтому разработка отечественной вакцины полного цикла является жизненно значимой. Учитывая явление «смены серотипов» при длительном широком использовании пневмококковых конъюгированных вакцин, необходимо тщательно подбирать серотиповой состав новой вакцины. Цель работы — анализ серотипового пейзажа пневмококков на территории Российской Федерации и других стран с целью выбора модельной композиции оптимального серотипового состава российской вакцины для применения у людей с учетом схем вакцинации для каждой возрастной группы. В обзоре представлены результаты анализа распространения серотипов пневмококков в Российской Федерации в довакцинальную эру, а также после внедрения вакцинации в рутинную педиатрическую практику. Кроме того, представлены данные по серотиповому пейзажу в государствах — членах Евразийского экономического союза. Предложен модельный состав вакцины, содержащей не менее шестнадцати серотипов пневмококка. Выбранная модель позволит увеличить эффективность иммунной защиты населения, обеспечив более полный охват серотипов, учитывая их распространенность на территории Российской Федерации. На основе проведенного анализа предложен уникальный серотиповой состав шестнадцативалентной пневмококковой конъюгированной вакцины

для дальнейшего производства и проведения доклинических и клинических испытаний. Появление новой отечественной пневмококковой конъюгированной вакцины позволит обеспечить вакцинацию всех групп населения в рамках национального календаря профилактических прививок Российской Федерации.

Ключевые слова: пневмококковая конъюгированная вакцина; серотиповой пейзаж; *Streptococcus pneumoniae*; серотиповой состав; пневмококковая инфекция; заболеваемость; смертность

Для цитирования: Трухин В.П., Евтушенко А.Э., Салимова Е.Л., Конон А.Д., Хаитов М.Р., Меркулов В.А. Анализ серотипового пейзажа пневмококков для определения композиционной модели отечественной пневмококковой конъюгированной вакцины. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):124–141. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-124-141>

Analysis of pneumococcal serotypes distribution to determine a model composition for a Russian pneumococcal conjugate vaccine

V.P. Trukhin¹, A.E. Evtushenko¹, E.L. Salimova¹, A.D. Konon^{1✉}, M.R. Khaitov², V.A. Merkulov^{3,4}

¹ The Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations of Federal Medical and Biologic Agency, 52 Svobody St., Krasnoe Selo 198320, Saint Petersburg, Russian Federation

² Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, 24 Kashirskoe Hwy, Moscow 115478, Russian Federation

³ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Anastasiia D. Konon; a.d.konon@spbniiys.ru

Abstract

Diseases caused by *Streptococcus pneumoniae*, as well as antibiotic resistance of its serotypes, are the leading cause of death amongst children worldwide. To prevent pneumococcal infection, the population is immunised with conjugate vaccines containing different amounts of polysaccharides of certain serotypes. Development of a full-cycle Russian vaccine is vital because the active pharmaceutical ingredients for the vaccines registered in the Russian Federation are produced abroad, and only the final stages of production of vaccines of this group are performed in the territory of the Russian Federation. Considering the phenomenon of serotype replacement associated with the long-term widespread use of pneumococcal conjugate vaccines, it is necessary to carefully select the serotype composition for the new vaccine. The aim of this work was to analyse the serotype distribution of pneumococci in the Russian Federation and other countries in order to select optimal serotypes for the Russian vaccine for human use, taking into account vaccination schedules for each age group. This review presents an analysis of the pneumococcal serotype distribution in the Russian Federation in the pre-vaccination era, as well as after the introduction of routine vaccination. In addition, the review includes data on the serotype distribution in the Eurasian Economic Union countries. The authors described a model composition containing at least sixteen serotypes. It will increase effectiveness of immune protection of the population, providing a more complete coverage of serotypes, considering their prevalence in the Russian Federation. Based on the analysis, the serotype composition for the sixteen-valent pneumococcal conjugate vaccine is proposed for further production and preclinical and clinical trials. A new Russian pneumococcal conjugate vaccine will ensure

vaccination of all population groups within the National Immunisation Schedule of the Russian Federation.

Key words: pneumococcal conjugate vaccine; serotype distribution; *Streptococcus pneumoniae*; serotype composition; pneumococcal infection; case rate; death rate

For citation: Trukhin V.P., Evtushenko A.E., Salimova E.L., Konon A.D., Khaitov M.R., Merkulov V.A. Analysis of pneumococcal serotypes distribution to determine a model composition for a Russian pneumococcal conjugate vaccine. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):124–141. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-124-141>

Введение

Пневмококковая инфекция может вызывать такие тяжелые инвазивные заболевания, как менингит, септицемия и пневмония, а также менее тяжелые, но более распространенные, как синусит и средний отит¹. Пневмококковая инфекция является причиной высокой смертности среди детей в возрасте до 5 лет, а также пожилых людей². Наиболее подвержены заражению пневмококковой инфекцией дети младше 2 лет, люди с сопутствующими заболеваниями, взрослые старше 65 лет и курильщики.

Возбудителем данной инфекции является *Streptococcus pneumoniae*, некоторые серотипы которого и вызывают пневмококковую инфекцию. Возбудитель является грамположительным диплококком, каталазо- и оксидазоотрицательным. Известно более 90 серотипов пневмококков, при этом до начала использования вакцинации всего от шести до одиннадцати серотипов являлись причиной инвазивной формы пневмококковой инфекции³. К инвазивным формам пневмококковой инфекции относят бактериемию без видимого очага инфекции, менингит, пневмонию, сепсис, перикардит, артрит [1]. Полисахаридная капсула бактерии является существенным фактором вирулентности, и серотипы пневмококка определяются на основе различий в ее составе. Капсула на поверхности защищает бактерии от фагоцитоза при проникновении *S. pneumoniae* в организм человека [2], а также способна ограничивать аутолиз и снижать активность антибиотиков [1].

Важной проблемой в борьбе с пневмококковой инфекцией является возникновение антибиотикорезистентных пневмококков, что значительно осложняет лечение таких пациентов, увеличивая затраты на лечение. Фактором, влияющим на развитие антибиотикостойчивости пневмококка, является нерациональный прием антибактериальных препаратов. Проблема антибиотикостойчивости штаммов *S. pneumoniae* имеет глобальный характер и остается актуальной как для Российской Федерации, так и для мирового сообщества в целом, о чем свидетельствуют материалы исследований, опубликованные за последние 5 лет [3–6]. Выявляются пневмококки, устойчивые к макролидам, клиндамицину, тетрациклину, метронидазолу, а также снижается их устойчивость к пенициллину. В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) включила *S. pneumoniae* в список бактерий, для борьбы с которыми требуется срочный поиск новых антибиотиков (приоритетность 3 – средняя)⁴.

Иммунитет, выработанный при вакцинации или естественном заражении, специфичен в отношении серотипа, однако при этом может наблюдаться и перекрестная защита, например для серотипов 6A/6B, 6A/6C и 19A/19F. По данным ВОЗ, серотипы 1, 5, 6A, 6B, 14, 19F и 23F обычно вызывают инвазивные формы пневмококковой инфекции среди детей в возрасте до 5 лет⁵. Некоторые серотипы, такие как 6B, 9V, 14, 19A и 23F, вероятно более, чем другие, ассо-

¹ Pneumococcal conjugate vaccines for infants and children under 5 years of age: WHO position paper – February 2019. *Wkly Epidemiol Rec.* 2019;94(8):85–104.

² Pneumococcal Vaccination. <https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/pneumo/>

³ Pneumococcal conjugate vaccines for infants and children under 5 years of age: WHO position paper – February 2019. *Wkly Epidemiol Rec.* 2019;94(8):85–104.

⁴ WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

⁵ Pneumococcal conjugate vaccines for infants and children under 5 years of age: WHO position paper – February 2019. *Wkly Epidemiol Rec.* 2019;94(8):85–104.

цируются с резистентностью к противомикробным препаратам⁶.

Цель работы — анализ серотипового пейзажа пневмококков на территории Российской Федерации и других стран с целью выбора модельной композиции оптимального серотипового состава российской вакцины для применения у людей с учетом схем вакцинации для каждой возрастной группы.

Иммунопрофилактика пневмококковой инфекции в мире и Российской Федерации

Бремя пневмококковой инфекции в мире достаточно серьезное. В 2017 г. от пневмонии в мире умерли 2,56 млн человек, треть из которых дети в возрасте до 5 лет. В целом в данной возрастной когорте пневмония является основной причиной смертности. За период наблюдений с 1990 г. количество смертей среди

детей сократилось в 3 раза, тогда как среди пожилых людей показатели остаются неизменными. Смертность от пневмонии наиболее высока в странах Африки к югу от Сахары⁷. Данные по количеству случаев смерти от пневмонии во всем мире за 2019 г. представлены на рисунке 1. В исследовании С. Chen с соавт. [7] показано, что пневмококковые вакцины могут ежегодно спасать жизни почти 400000 детей в мире (рис. 2)⁸.

Как в Российской Федерации, так и в мире в целом наблюдаются схожие закономерности по смертности от пневмонии среди различных возрастных групп. За период 1990–2019 гг. смертность среди детей в возрасте первых 5 лет уменьшалась, тогда как среди взрослого и пожилого населения она оставалась практически неизменной (рис. 3)⁹.

В Российской Федерации, по данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты

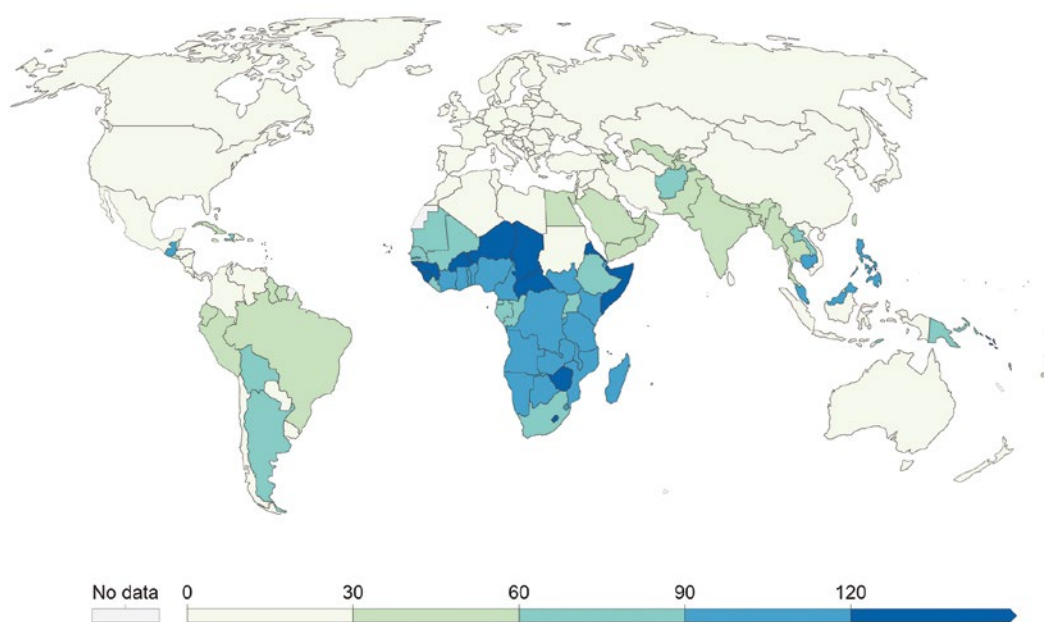


Рис. 1. Смертность от пневмонии в мире в пересчете на 100000 человек за 2019 г.¹⁰

Fig. 1. Pneumonia deaths per 100000 people in 2019 in the world¹⁰.

⁶ Pneumococcal conjugate vaccines for infants and children under 5 years of age: WHO position paper — February 2019. Wkly Epidemiol Rec. 2019;94(8):85–104.

⁷ Dadonaite B, Roser M. Pneumonia. Our World in Data. 2018. <https://ourworldindata.org/pneumonia>

⁸ Там же.

⁹ Там же.

¹⁰ Там же.

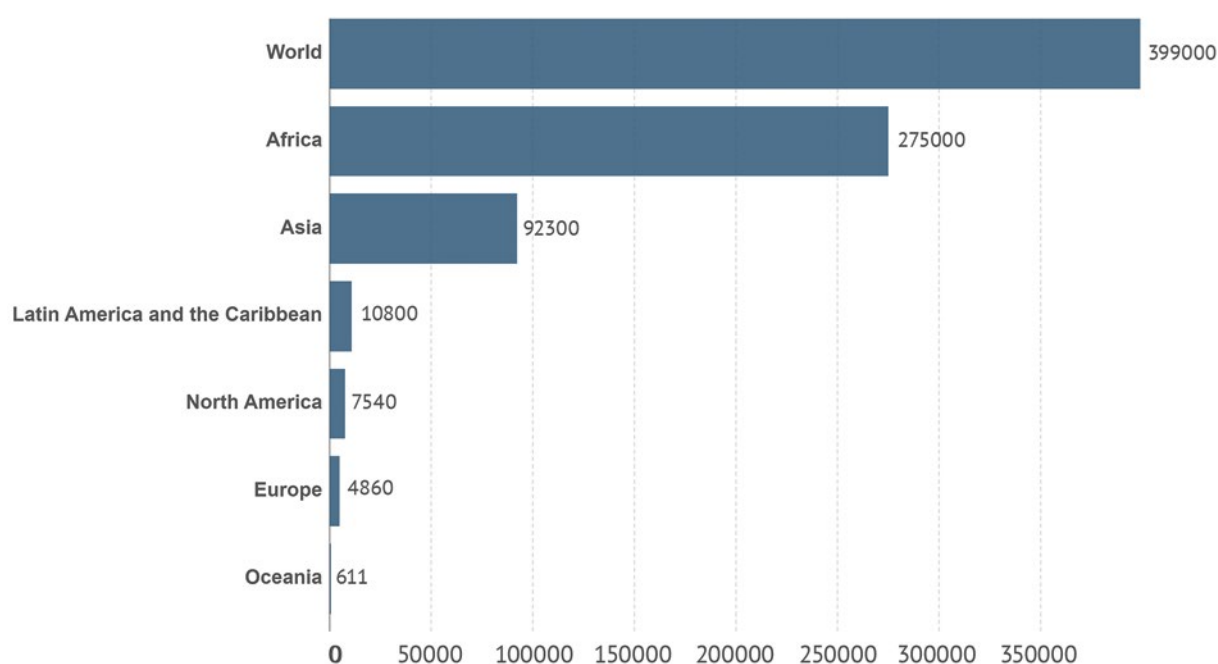


Рис. 2. Данные по количеству смертей, которые могут быть предотвращены вакцинацией против пневмококковой инфекции¹¹.

Fig. 2. Data on the number of deaths that can be prevented by pneumococcal vaccination¹¹.

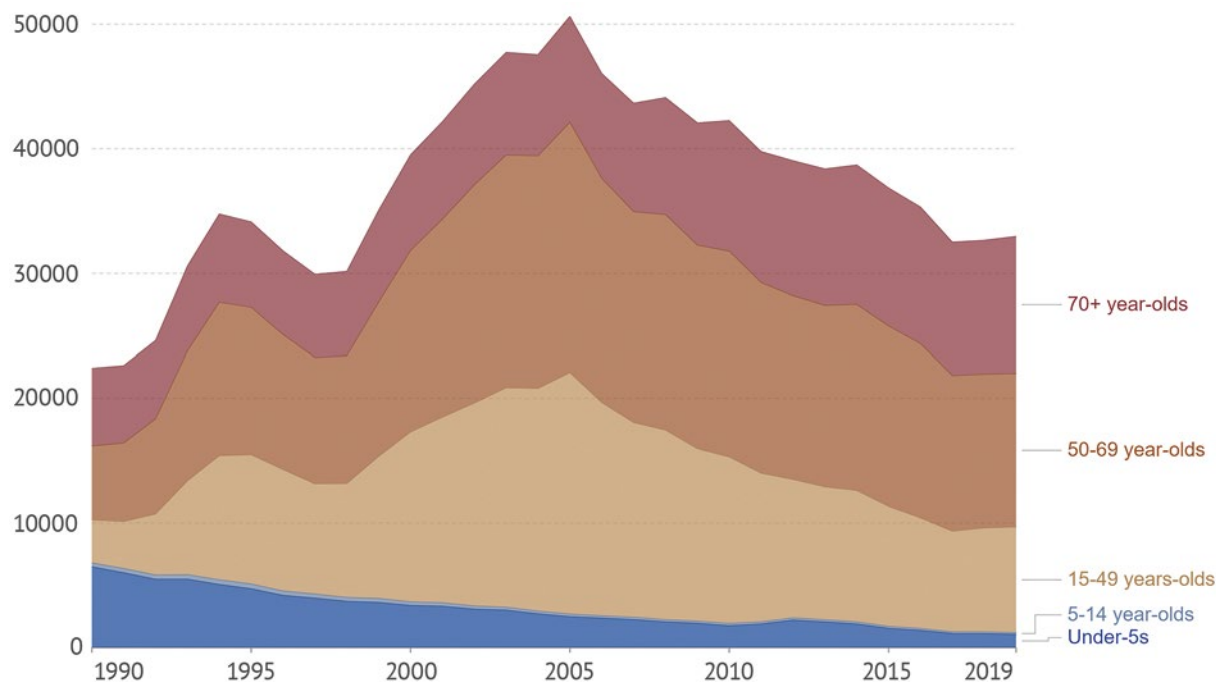


Рис. 3. Смертность от пневмонии в России в зависимости от возраста за период 1990–2019 гг.¹²

Fig. 3. Deaths from pneumonia in the Russian Federation by age for the period of 1990–2019¹².

¹¹ Там же.

¹² Там же.

прав потребителей и благополучия человека, регистрируется увеличение количества внебольничных пневмоний на 19%: за 2017 г. — 412 чел. на 100000 населения, за 2018 г. — 492 чел. на 100000 населения (данные за период до пандемии COVID-19)¹³.

Согласно данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году»¹⁴, установлена особенность внебольничных пневмоний у пациентов с лабораторно подтвержденным COVID-19 — высокая частота микст-инфекций вирусной и бактериальной этиологии, преобладающим этиологическим агентом которых является *Streptococcus* spp. Представленные данные свидетельствуют о целесообразности снижения рисков развития пневмококковой инфекции за счет вакцинации.

18 сентября 2020 г. Правительством Российской Федерации была утверждена Стратегия развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 года (далее — Стратегия)¹⁵. Стратегия является основой для организации деятельности и взаимодействия органов государственной власти Российской Федерации, органов государственной власти субъектов Российской Федерации, органов местного самоуправления, государственных и иных организаций, принимающих участие в реализации мер, направленных на предупреждение, ограничение распространения и ликвидацию инфекционных и иных болезней, управляемых средствами иммунопрофилактики.

Стратегия включает развитие российских производственных предприятий по выпуску иммунобиологических препаратов, создаваемых на основе современных технологий полного цикла производства, и требует формирования перечня целевых разработок иммунобиологических препаратов, прежде всего планируемых к включению в национальный календарь профилактических прививок (НКПП)¹⁶, в том числе

комбинированных вакцин и вакцин с широким спектром покрытия циркулирующих на территории страны серотипов возбудителей, в частности полисахаридных конъюгированных вакцин, таких как вакцина для профилактики пневмококковой инфекции и вакцина для профилактики менингококковой инфекции (четырёхвалентная вакцина — против серогрупп A, C, W, Y).

На основании Стратегии был разработан План мероприятий по ее реализации (далее — План)¹⁷. План включает такие мероприятия, как расширение перечня инфекционных болезней, против которых проводится вакцинация на территории Российской Федерации в рамках НКПП, определение категории граждан, подлежащих вакцинации; схем иммунизации; внесение изменений в Федеральный закон «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней», в Приказ «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям» (2024–2025 гг.).

Согласно Плану, до ноября 2025 г. намечена подготовка обоснованных предложений по вакцинации взрослых против пневмококковой инфекции в рамках НКПП, а также по расширению контингента, подлежащего вакцинации против пневмококковой инфекции в рамках календаря профилактических прививок по эпидемиологическим показателям.

Важной составляющей Плана является мониторинг распространенности возбудителей инфекционных болезней и их серотипов при инфекциях, управляемых средствами специфической профилактики, в том числе с оценкой актуальности циркулирующих штаммов для конструирования вакцин. Кроме того, План направлен на стимулирование научных разработок в области создания иммунобиологических лекарственных препаратов.

С 2009 г. на мировом рынке доступны две полисахаридные пневмококковые конъюгированные

¹³ Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях за январь–декабрь 2018. https://www.rosпотреbnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=11277

¹⁴ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2021.

¹⁵ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 18.09.2020 № 2390-р «Об утверждении Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 года». <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/74591684/>

¹⁶ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.12.2021 № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок».

¹⁷ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 29.03.2021 № 774-р «Об утверждении плана мероприятий по реализации Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 г.» <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/400425985/>

вакцины (pneumococcal conjugate vaccine, PCV): 10-валентная (PCV10) и 13-валентная (PCV13), а в 2021 г. были лицензированы еще две пневмококковые конъюгированные вакцины: 15-валентная (PCV15) и 20-валентная (PCV20). Кроме того, доступна 23-валентная полисахаридная вакцина, которая содержит только полисахариды отдельных серотипов пневмококка. Согласно позиции ВОЗ, пневмококковые полисахаридные вакцины характеризуются слабой иммуногенностью или ее отсутствием у детей в возрасте младше 2 лет, необходимой для индуцирования иммунной памяти в ответ на ревакцинацию, а также целым рядом других недостатков¹⁸. В связи с этим в статье основной акцент сделан на конъюгированные вакцины.

В соответствии с данными ВОЗ, к середине 2021 г. пневмококковая конъюгированная вакцина была внедрена в 151 государстве, а охват третьей дозой оценивался в 49%¹⁹. Данные по охвату вакцинацией по некоторым странам в сравнении с мировой тенденцией представлены на рисунке 4. В Российской Федерации

наблюдался значительный рост количества вакцинированных с момента введения вакцины в НКПП. Охват пневмококковой вакциной детского населения достаточно высокий (87%)²⁰.

Впервые в Российской Федерации 7-валентная конъюгированная вакцина для профилактики пневмококковой инфекции (PCV7) стала доступна для населения в 2009 г., однако массовая вакцинация этой вакциной не предусматривалась. В 2011 г. была зарегистрирована 13-валентная вакцина Превенар® 13 (Пфайзер), в 2012 г. – 10-валентная вакцина Синфлорикс (ГлаксоСмитКляйн Байолоджиалз), а в 2014 г. вакцинация против пневмококковой инфекции для младенцев была включена в НКПП [8]. В 2021 г. прошла регистрацию еще одна 13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина производства Эскей Биосайенс Ко., Лтд. Характеристика зарегистрированных в Российской Федерации вакцин согласно Государственному реестру лекарственных средств Российской Федерации по состоянию на сентябрь 2021 г. представлена в таблице 1²¹.

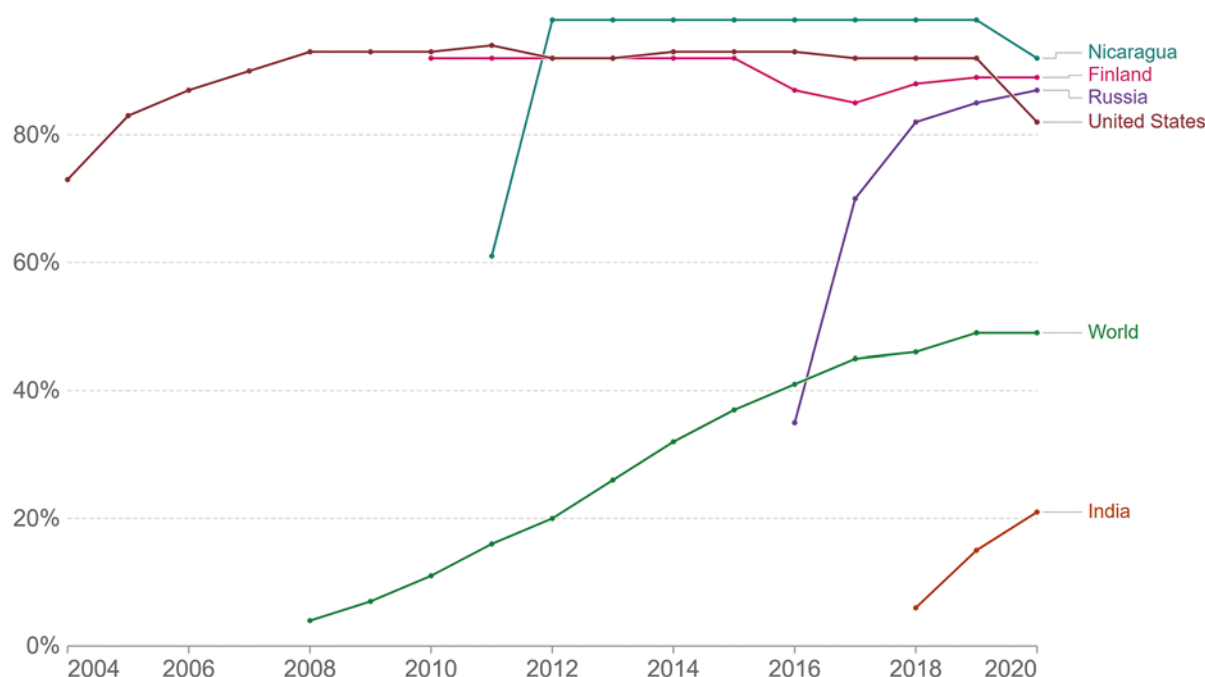


Рис. 4. Количество вакцинированных пневмококковой вакциной детей в некоторых странах за период 2004–2020 гг.²²

Fig. 4. Share of children immunised with pneumococcal vaccines in several countries in 2004–2020²².

¹⁸ Pneumococcal vaccines WHO position paper – 2012. Wkly Epidemiol Rec. 2012;87(14):129–144.

¹⁹ Immunisation coverage. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>

²⁰ Dadonaite B, Roser M. Pneumonia. Our World in Data. 2018. <https://ourworldindata.org/pneumonia>

²¹ <https://grls.rosminzdrav.ru/>

²² Dadonaite B, Roser M. Pneumonia. Our World in Data. 2018. <https://ourworldindata.org/pneumonia>

Таблица 1. Пневмококковые конъюгированные вакцины, зарегистрированные в Российской Федерации
Table 1. Pneumococcal conjugate vaccines licenced in the Russian Federation

Наименование вакцины Name	Дата регистрации в России Date of licensing in the Russian Federation	Действующие вещества вакцины Active pharmaceutical ingredients (APIs) of the vaccine	Производитель фармацевтической субстанции (полисахариды) Manufacturer of the APIs (polysaccharides)	Производитель готовой лекарственной формы Manufacturer of the finished formulation	Упаковщик/фасовщик (вторичная/третичная упаковка) Packager (secondary/ tertiary packaging)
Синфлорикс (вакцина 10-валентная пневмококковая полисахаридная, конъюгированная с D-протеином нетипизируемой <i>Haemophilus influenzae</i> , столбнячным и дифтерийным анатоксинами, адсорбированная) <i>Synflorix (10-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (non-typeable Haemophilus influenzae protein D, diphtheria or tetanus toxoid conjugates), adsorbed)</i>	11.01.2012	Полисахарид серотипа 1, 5, 6B, 7F, 14, 23F, конъюгированный с PD – 1 мкг <i>Polysaccharide serotype 1, 5, 6B, 7F, 14, 23F conjugated to PD: 1 µg</i> Полисахарид серотипа 4, 18C, 19F, конъюгированный с PD – 3 мкг <i>Polysaccharide serotype 4, 18C, 19F conjugated to PD: 3 µg</i>	ГлаксосмитКляйн Байолд- лоджикалз (Сингапур) или ГлаксосмитКляйн Байолд- жикалз с.а. (Бельгия) <i>GlaxoSmithKline Biologicals (Singapore) or GlaxoSmithKline Biologicals s.a. (Belgium)</i>	ГлаксосмитКляйн Байолдджикалз (Франция) <i>GlaxoSmithKline Biologicals (France)</i>	ГлаксосмитКляйн Бай- олоджикалз (Франция); Общество с ограниче- ной ответственностью «СмитКляйн Бичем-Био- мед» (ООО «СмитКляйн Бичем-Биомед») <i>GlaxoSmithKline Biologicals (France); SmithKline Beecham-Biomed (Russia)</i>
Превенар® 13 (вакцина пневмокок- ковая полисахаридная конъюгиро- ванная адсорбированная, тринад- цативалентная) <i>Prevenar® 13 (13-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine, adsorbed)</i>	03.10.2011	Полисахарид серотипа 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F конъюгирован- ный с CRM197 – 2,2 мкг <i>Polysaccharide serotype 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F conjugated to CRM197: 2.2 µg</i> Полисахарид серотипа 6B, конъюгиро- ванный с CRM197 – 4,4 мкг <i>Polysaccharide serotype 6B conjugated to CRM197: 4.4 µg</i>	Вайет Фармасьютикалз Дивижн оф Вайет Холдингз ЭлСи (США) или Пфайзер Айрлэнд Фармасьютикалз (Ирландия) <i>Wyeth Pharmaceuticals Division of Wyeth Holdings LLC (USA) or Pfizer Ireland Pharmaceuticals (Ireland)</i>	ООО «НПО Петровакс Фарм» (Россия) или Пфайзер Айрлэнд Фармасьютикалз (Ирландия) <i>NPO Petrovax Pharm LLC (Russia) or Pfizer Manufacturing Belgium N.V. (Belgium)</i>	ООО «НПО Петровакс Фарм» (Россия) или Пфайзер МФГ. Бельгия Н.В. (Бельгия) <i>NPO Petrovax Pharm LLC (Russia) or Pfizer Manufacturing Belgium N.V. (Belgium)</i>
Вакцина пневмококковая полисахаридная конъюгированная адсорби- рованная тринадцативалентная <i>13-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine, adsorbed</i>	22.07.2021	Полисахарид серотипа 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, конъюгирован- ный с CRM197 – 2,2 мкг <i>Polysaccharide serotype 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, conjugated to CRM197: 2.2 µg</i> Полисахарид серотипа 6B, конъюгиро- ванный с CRM197 – 4,4 мкг <i>Polysaccharide serotype 6B conjugated to CRM197: 4.4 µg</i>	Эскей Биосайенс Ко., Лтд (Корея) <i>SK bioscience Co., Ltd (Republic of Korea)</i>	Эскей Биосайенс Ко., Лтд (Корея) <i>SK bioscience Co., Ltd (Republic of Korea)</i>	Эскей Биосайенс Ко., Лтд (Корея) <i>SK bioscience Co., Ltd (Republic of Korea)</i>

Примечание. PD – D-протеин нетипизируемой *Haemophilus influenzae*; TT – столбнячный анатоксин; DT – дифтерийный анатоксин; CRM197 – нетоксичное производное дифтерийного токсина.

Note. PD – non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D; TT – tetanus toxoid; DT – diphtheria toxoid; CRM197 – non-toxic derivative of diphtheria toxin.

Определение оптимального набора серотипов в пневмококковой конъюгированной вакцине

Учитывая мировые тенденции, путь к инновационному развитию в Российской Федерации лежит в реализации стратегии импортозамещения, в том числе в фармацевтической отрасли, включая иммунобиотехнологическое производство. Как видно из данных, представленных в таблице 1, в Российской Федерации используются вакцины, производство субстанций для которых размещено за рубежом. В связи с этим актуальной является локализация полного цикла производства пневмококковых конъюгированных вакцин на территории Российской Федерации. Кроме того, обращает на себя внимание высокая стоимость дозы пневмококковой конъюгированной вакцины. Производственная база на территории Российской Федерации позволит не только снизить стоимость вакцины, но и производить вакцину с типичным и наиболее оптимальным для Российской Федерации набором серотипов возбудителя.

До 2010 г. в мире использовали 7-валентную пневмококковую конъюгированную вакцину, при этом через некоторое время после начала ее использования стали наблюдать рост инфицирования серотипами, не входящими в состав применяемой вакцины. Данный феномен получил название «смена серотипов». Такое явление регистрируется в странах, использующих в универсальных программах иммунизации младенцев пневмококковые конъюгированные вакцины PCV7 (позднее была заменена на вакцины с большим числом серотипов), PCV10 и PCV13 [9]. По этой причине необходим постоянный мониторинг за серотиповым пейзажем пневмококков после внедрения вакцин для исключения бесконтрольного распространения серотипов, не входящих в состав существующих вакцин. В случае сохранения в популяции серотипов возбудителя, входящих в состав используемых вакцин, рекомендуется обратить внимание на подбор новой схемы иммунизации. Кроме того, снижение затрат на вакцинацию необходимо проводить не за счет уменьшения валентности вакцин или перехода на схему вакцинации с меньшим числом доз [9].

При определении оптимального серотипового состава пневмококковой конъюгированной вакцины для Российской Федерации и стран Евразийского экономического союза (ЕАЭС) необходимо учитывать опыт других стран в части тенденций по распространению пневмококковой инфекции, смене серотипов в ходе широкого использования пневмококко-

вых вакцин, эффективности программ рутинной вакцинации.

По мнению авторов, при разработке вакцин для профилактики пневмококковой инфекции необходимо, в первую очередь, проводить многолетний эпидемиологический анализ циркулирующих на территории страны серотипов пневмококка, а также устойчивых к антибиотикам серотипов, которые уже входят в состав вакцин. Также важно определить баланс между количеством и перечнем серотипов в вакцине, учитывая оптимальную нагрузку на иммунитет при введении в организм человека одновременно большого количества антигенов, что позволит увеличить ее эффективность. Кроме того, важно учитывать, что добавление каждого дополнительного серотипа удлиняет производственный цикл вакцины на 2–3 месяца, что отражается на себестоимости препарата.

Принимая во внимание все вышеуказанные факторы, а также учитывая, что уже имеются импортные зарегистрированные вакцины PCV13, PCV15 и PCV20, авторы данной статьи считают, что оптимальной для Российской Федерации будет композиция пневмококковой конъюгированной вакцины, содержащей не менее 16 актуальных для Российской Федерации серотипов. Уровень покрытия такой вакциной циркулирующих серотипов возбудителей выше, чем для используемой PCV13, а соответственно, выше и ее эффективность. Добавление как минимум трех серотипов позволит избежать значительного удорожания дозы вакцины за счет того, что затраты на производство будут ниже, чем, например, для PCV20.

Встречаемость серотипов пневмококка в Российской Федерации и государствах — членах ЕАЭС

Для того чтобы выбрать композиционную модель PCV, необходимо рассмотреть распространение серотипов пневмококков в Российской Федерации в довакцинальную эру, а также после введения вакцины в НКПП. В Российской Федерации проводятся исследования серотипового пейзажа пневмококков на территории как всей страны, так и отдельных регионов, однако данные исследования не носят систематического характера [10–13]. Рассмотрим распространение серотипов в стране в период до внедрения массовой вакцинации (до 2014 г.) и после.

В довакцинальную эру на территории Российской Федерации преимущественно выявлялись серотипы, входящие в состав 13-валентной вакцины. Так, в работе Г.В. Белошицкого с соавт. [14] показано, что в структуре серотипового пей-

зажа в 2010–2014 гг. доминировали (в порядке уменьшения значимости) серогруппы/серотипы пневмококка 3, 6, 19, 4, 23, 18, 14, 15, 7, 11 и 9, на долю которых приходилось 88% выявленных серогрупп/серотипов. Дифференцировка на серотипы показала, что серотипы пневмококка 19F и 23F, часто ассоциированные с лекарственной устойчивостью, имеют более широкое, по сравнению с другими серотипами данных серогрупп, распространение на территории России. При летальных исходах среди детей до 5 лет доминирование распространенных серогрупп/серотипов (19F, 18, 14, 6 и 7F) сохранялось.

В работе Н.А. Маянского с соавт. [15] показано, что в 2011–2012 гг. при инвазивных инфекциях в Российской Федерации доминировали серотипы 19F (25%) и 14 (19%), а также серотип 3 (до 10%). В период до внедрения вакцины в Российской Федерации, как и в других странах, наблюдался типичный набор серотипов, устойчивых к антибиотикам. Более 80% составляли пневмококки серогрупп 6, 14, 19 и 23.

Наиболее часто встречаемыми серотипами *S. pneumoniae* в Российской Федерации в 2003–2007 гг., выделенными от пациентов с инфекциями верхних и нижних дыхательных путей (отит, синусит, тонзиллофарингит, обострение хронического бронхита и пневмония), были 23F (37,2%) и 19F (13,9%) [16]. К серотипам (серогруппам) с низкой встречаемостью относились 14 (4,9%), 3 (3,6%), 18 (3,6%), 19A (2,2%). Уровень покрытия 7-валентной конъюгированной пневмококковой

вакциной циркулирующих серотипов возбудителей составил 66,8%, 10-валентной – 67,3%, 13-валентной – 82,1%.

Аналогичные закономерности по выявлению серотипов, входящих в состав PCV13, до внедрения вакцинации наблюдали в государствах – членах ЕЭАС и странах СНГ. В работе А.Н. Оганесян с соавт. [17] проанализированы изоляты возбудителей из образцов спинномозговой жидкости пациентов с подозрением на менингит, собранные в период 2007–2016 гг. в трех регионах: Европейском (Украина, Беларусь), Закавказском (Азербайджан, Армения, Грузия) и Азиатском (Узбекистан, Кыргызстан, Казахстан) с целью идентификации серотипов пневмококка. Установлено, что преобладающими оказались следующие серотипы: 6A/B (21%), 14 (15%), 19F (10%), 23F (7%), 18 (A/B/C) (4%), 9V/9A (3%) и 4 (3%). Уровень покрытия пневмококковыми конъюгированными вакцинами выявленных серотипов составил 67% для PCV10 и 71% для PCV13 во всех трех регионах.

На рисунке 5 представлены данные по серотиповому пейзажу в государствах – членах ЕАЭС (без учета Российской Федерации) для тех серотипов, встречаемость которых 7% и более [18–21]. Серотипы 9V/9A, 15B/15C, 28A, 22F/22A, 3, 31, 23F, 12F, 7F/7A встречаются в среднем с частотой 4,0–6,8%. Распространенность серотипов 11A/D, 12F/12A/12B/44/46, 21, 7C/7B/40, 13, 2, 20, 23A, 1, 5, 24A/B/F, 6C/6B, 18ABC и 4 составляет 1,8–3,5%.

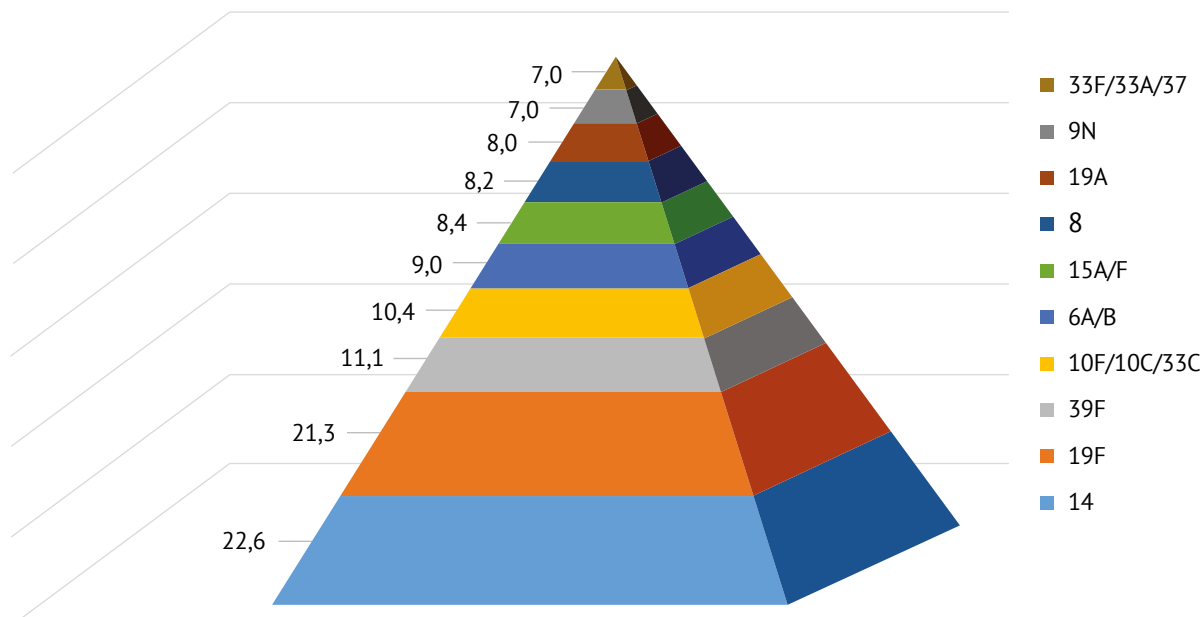


Рис. 5. Встречаемость (%) серотипов пневмококка в государствах – членах Евразийского экономического союза. В легенде указаны серотипы пневмококка.

Fig. 5. Prevalence (%) of pneumococcal serotypes in the Eurasian Economic Union countries. The legend shows pneumococcal serotypes.

Пять серотипов, наиболее распространенных в государствах — членах ЕАЭС, входят в состав PCV13 (рис. 5). Обращает на себя внимание, что среди других серотипов, не представленных в составе вакцины, достаточно часто не удается точно идентифицировать серотипы пневмококка (10F/10C/33; 15A/15F и 33F/33A/37) ввиду сложности их дифференциальной диагностики, что затрудняет определение доли каждого серотипа среди выявляемых.

В работе S. Sidorenko с соавт. [22] представлен анализ распространенности серотипов пневмококка среди детского населения крупных российских городов после внедрения вакцинации. Для определения серотипового состава *S. pneumoniae* выделены изоляты из носоглотки здоровых детей в возрасте до 6 лет в Санкт-Петербурге, Смоленске, Перми, Красноярске, Ханты-Мансийске и Хабаровске в период с 2016 по 2018 г. Установлено, что уровень покрытия вакцинами PCV7 и PCV13 выявленных серотипов составил 49,4 и 59,2% соответственно. Среди них наиболее часто выявлялись пневмококки серогрупп 6 и серотипы 4 и 19F: 12,0, 12,2 и 12,7% соответственно.

Конструирование отечественной шестнадцативалентной пневмококковой конъюгированной вакцины

В результате проведенного авторами данной статьи анализа и обобщения данных по распространению различных серотипов пневмококков на территории Российской Федерации до и после внедрения вакцинации детского населения (рис. 6) показано, что после внедрения вакцинации детского населения произошло снижение распространенности большинства серотипов, которые выявлялись в довакцинальный период. На рисунке 6 также отмечены серотипы, которые входят в состав зарегистрированных вакцин в мире — PCV13, PCV15 и PCV20, и в качестве примера приведена модельная композиция ФГУП СПбНИИВС ФМБА России — PCV16, включающая дополнительно к серотипам PCV13 — 15A, 12F и 22F. Встречаемость данных штаммов только у детского населения в поствакцинальный период составляет около 3, 1,8 и 0,8% соответственно. Данные штаммы отличаются антибиотикоустойчивостью, а также высокой инвазивностью для различных возрастных групп населения [3–7].

Кроме того, в модельный состав вакцины могут быть включены и другие серотипы/серогруппы, не входящие в состав вакцины, которые выявляются с частотой более 0,5%, например 11AD (8,5%), 33F (1,4%), 23A (2,9%), 15BC (1,5%). Одна-

ко необходимо отметить, что данные серотипы были выявлены у здоровых детей в возрасте до 6 лет и не отличались высоким потенциалом инвазивности.

Разработчики, оценивая принципиальную возможность реализации получения капсульных полисахаридных антигенов данных групп серотипов и их конъюгации с белком-носителем, а также иммуногенность полученных конъюгатов, могут определить комбинацию состава вакцины: изменить существующую или предложить новую. Необходимо отметить, что не все полисахариды серотипов и конъюгаты можно получить в лабораторных и промышленных условиях ввиду низкой продуктивности микроорганизмов и физико-химических свойств целевых продуктов, поэтому к выбору вакцинных серотипов необходимо подходить исходя не только из эпидемиологической ситуации, но и производственных возможностей.

Характеристика серотипов пневмококка, планируемых к включению в состав PCV16 ФГУП СПбНИИВС ФМБА России

Серогруппа 15. Серотипы пневмококка серогруппы 15 выявлялись в Российской Федерации как до включения пневмококковой вакцины в НКПП, так и выявляются в настоящее время, при этом частота их встречаемости изменилась незначительно.

В работе Г.В. Белошицкого и И.С. Королевой [23] сравнивался серотиповый пейзаж возбудителей, выделенных от пациентов с пневмококковым менингитом (возраст пациентов варьировал от 1 мес. до 79 лет), изолированных в 1980–1999 гг., со штаммами 2000–2012 гг., изолированными в Москве. Кроме серотипов, охватываемых вакциной, в состав лидирующих серотипов пневмококка 2000–2012 гг. вошли серотипы 15A/B, при этом до 2000 г. серотип 15A/B не выявлялся. В другой возрастной группе среди выделенных изолятов пятнадцать принадлежали к серотипам, не входящим в состав вакцины, среди которых наиболее часто встречался серотип 15A/B (три изолята).

Достаточно часто серотип 15A относится к пневмококкам с множественной лекарственной устойчивостью и имеет высокую резистентность к антибактериальным препаратам [24, 25]. Некоторыми авторами отмечается, что в последние годы серогруппа 15 стала одной из наиболее распространенных серогрупп, не входящих в состав вакцины, среди пневмококков, вызывающих инвазивные пневмококковые инфекции, а также выделенных от носителей [26, 27]. В работе российских ученых Т. Savinova с соавт. [28]

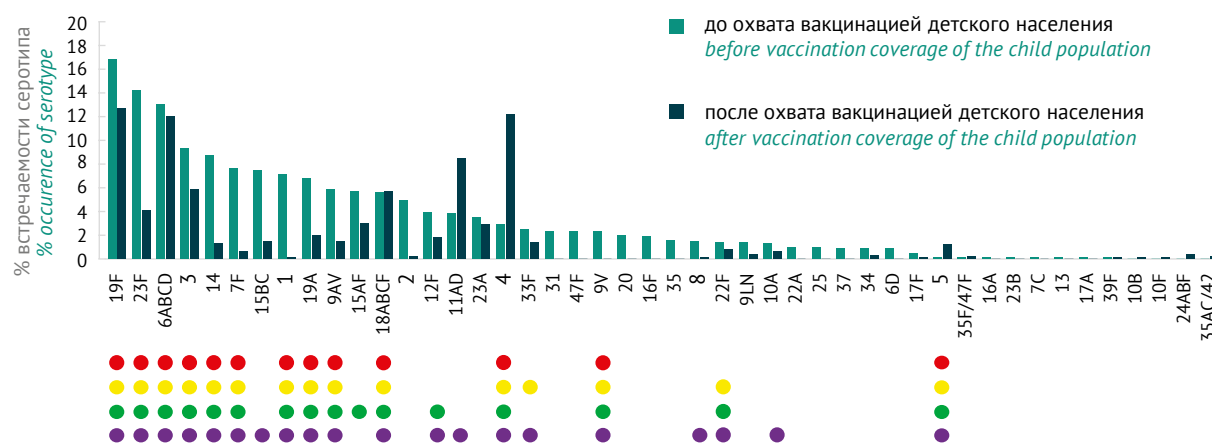


Рис. 6. Распределение встречаемости серотипов пневмококка (%) до и после включения пневмококковой конъюгированной вакцины в график вакцинации детского населения в рамках национального календаря профилактических прививок. Под осью абсцисс указаны типы пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV): ● PCV13, ● PCV15, ● PCV16, ● PCV20.

Fig. 6. Distribution of pneumococcal serotypes (%) before and after the inclusion of pneumococcal conjugate vaccines into the paediatric immunisation schedule. Under the X-axis are types of pneumococcal conjugate vaccine (PCV): ● PCV13, ● PCV15, ● PCV16, ● PCV20.

указано, что серотип 15A является одним из ведущих серотипов *S. pneumoniae*, не входящих в состав вакцины. С помощью полногеномного секвенирования ученые обнаружили пневмококк серотипа 15A с множественной лекарственной устойчивостью, возникший в результате явления «переключения капсулы» (capsule switching) с серотипа 19A/ST276. Похожие результаты были опубликованы для серотипа 15A с широкой лекарственной устойчивостью, выделенного от пациента с бактериальным менингитом в Южной Корее [29]. Изолят был практически идентичен серотипу 11A за исключением локуса капсульного полисахарида (cps) и другой небольшой области. «Переключение капсулы» между серотипами 11A и 15A могло происходить посредством рекомбинации локуса cps возбудителя. Возникновение таких штаммов вызывает озабоченность. Явление приобретения устойчивости к антибиотикам путем рекомбинации между серотипами было описано ранее. В работе V. Divvuri с соавт. [30] было проведено полногеномное секвенирование 25 изолятов серотипа 22F, семи изолятов 15A и 10 изолятов серотипа 8 для изучения структуры популяции и устойчивости к антибиотикам. Обнаружено, что все семь изолятов серотипа 15A обладали множественной лекарственной устойчивостью. На основе анализа генома авторы наблюдали рекомбинацию среди популяций серотипов 22F, 15A и 8.

Таким образом, серотип 15A требует особого внимания ввиду возникновения устойчивых форм, а также его способности вызывать инва-

зивные пневмококковые инфекции. Отметим, что серотип 15A не включен ни в одну пневмококковую вакцину как конъюгированную, так и полисахаридную.

Серогруппа 12. Серотип 12F может вызывать инвазивные формы пневмококковой инфекции, а также приводить к летальному исходу. Так, в исследовании А.А. Голубковой и А.В. Сомовой [31] показано, что серотип 12F чаще выделяли от детей с наиболее тяжелыми формами пневмонии. Пневмококки серогрупп 12FAB/44/46 и 12A/B/C/F выделяли от здоровых военнослужащих, а у вакцинированных пневмококковой вакциной пациентов с внутрибольничной пневмонией выявлялась серогруппа 12FAB/44/46 [32]. В работе К.Д. Жоголева с соавт. [32] высказано предположение, что заболевание было обусловлено пневмококками серогрупп, не вошедших в состав вакцин.

В исследовании Л.Т. Баязитовой с соавт. [33] изучен серотиповый состав пневмококков, циркулирующих в носоглотке детей дошкольного возраста в г. Казани. Среди идентифицированных серотипов выявлялся в том числе и серотип 12F.

В базе данных молекулярного типирования и разнообразия микробного генома PubMLST, которая объединяет данные популяционных последовательностей с информацией о происхождении и фенотипе для более чем 100 различных видов и родов микроорганизмов, зарегистрировано 9 изолятов серотипа 12F, выделенных в Российской Федерации²³. В основном серотипы 12F, зарегистрированные в базе данных, выделялись

²³ PubMLST. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. PubMLST.org. https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_spneumoniae_isolates&page=query&prov_field1=f_country&prov_value1=Russia&submit=1

от взрослых с диагнозами пневмония и менингит, что свидетельствует о высокой инвазивности циркулирующего серотипа. Данный серотип выделялся как до внедрения универсальной программы вакцинации, так и после.

При выборе серотипа в состав модельной вакцины необходимо учитывать опыт других стран, в которых уже давно используются пневмококковые конъюгированные вакцины. Отмечается, что в странах, в которых внедрены PCV10, PCV13, доминирующая роль переходит к серотипам 12F, 22F [34]. На примере Израиля показано, что в течение 7 лет после введения вакцины частота инвазивной пневмококковой инфекции, вызванной пневмококком серотипа 12F, увеличилась у детей в возрасте до 5 лет с 1,44 в 2009–2010 гг. до >3,9 в 2011–2012 гг. случаев на 100 000 населения, после чего последовал рост во всех возрастных группах. В 2011–2016 гг. пневмококк серотипа 12F был наиболее распространенным серотипом, вызывающим инвазивную пневмококковую инфекцию. Изоляты 12F в основном были нечувствительны к пенициллину [35]. В Японии в 2016–2018 гг. изучили распространение серотипов, вызывающих инвазивные пневмококковые инфекции [36]. Среди проанализированных штаммов наиболее часто выявляемым серотипом был 12F (31%).

Seromun 22F. Серотип 22F пневмококка выявлялся в Российской Федерации как до включения пневмококковой вакцины в НКПП, так и после, а также способен вызывать инвазивные заболевания. В частности, в базу данных PubMLST внесена информация по семи изолятам 22F, среди которых пять вызывали инвазивные заболевания, при этом штаммы были выделены как от взрослых, так и от детей²⁴. Так, в 2009 г. был выделен штамм серотипа 22F от больного менингитом взрослого (37 лет) в Москве, в 2016 г. — от больных менингитом детей (2 года) в г. Ярославле, в 2020 г. — от больных пневмонией взрослых (38 лет и 24 года) из г. Набережные Челны и г. Северска соответственно.

Данный серотип также выявлялся в некоторых странах СНГ и государствах — членах ЕАЭС. Так, в работе А.Н. Оганесян с соавт. [17] проанализированы образцы спинномозговой жидкости пациентов с подозрением на менингит и выявлено, что среди серотипов был идентифицирован пневмококк серотипа 22F. Кроме того, данный серотип возбудителя был выделен у детей с острым бактериальным риносинуситом в Республике Беларусь [37]. Серотип 22F, наряду с серотипом 15A, достаточно часто выявлялся

в г. Алматы у здоровых детей (носителей) в возрасте до 2 лет: 8,3 и 11,1% соответственно [21].

Серотип 22F кроме свойства вызывать инвазивные формы пневмококковой инфекции также обладает лекарственной устойчивостью. Например, в Канаде с 2011 по 2018 г. было выделено 11 044 изолята *S. pneumoniae* инвазивных форм, из них 9,3% составляли 22F [38]. Изоляты серотипа 22F были чувствительны к большинству протестированных противомикробных препаратов, за исключением кларитромицина, чувствительность к которому со временем значительно снизилась (2011 г. — 80,4%; 2018 г. — 52,9%, $p < 0,0001$), при этом 1,6% изолятов серотипа 22F обладали множественной лекарственной устойчивостью.

Аналогичные результаты по выявлению и серотипа 22F, и его способности вызывать инвазивную пневмококковую инфекцию были продемонстрированы в Англии [39].

Учитывая Стратегию развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 г. и План мероприятий по реализации Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 г., а также имеющийся опыт в разработке и внедрении конъюгированных полисахаридных вакцин, например вакцины для профилактики гемофильной инфекции типа b [40–45], ФГУП СПбНИИВС ФМБА России приступило к разработке отечественной пневмококковой конъюгированной вакцины.

По мнению авторов данной статьи, оптимальной для разработки является пневмококковая конъюгированная вакцина, содержащая не менее 16 актуальных для Российской Федерации и государств — членов ЕАЭС серотипов, а также современный белок-носитель. Такое количество серотипов позволит получить более эффективную вакцину, чем существующие PCV13 или PCV15, при этом продолжительность производственного цикла и затраты на производство, а следовательно, и себестоимость будут меньше, чем для вакцин с большей валентностью, как, например, для 20-валентных и выше.

Кроме того, в состав разрабатываемой вакцины входит рекомбинантный белок-носитель CRM197, который является нетоксичным производным дифтерийного токсина и характеризуется одной мутацией, а именно заменой глицина на глутаминовую кислоту в положении 52 [46]. Отсутствие токсичности CRM197 связано с потерей ферментативной активности фрагмента А, который у видов дикого типа катализирует

²⁴ Там же.

химическую модификацию фактора элонгации 2 (транслоказы), необходимого для синтеза белка в инфицированных клетках. Данный белок хорошо изучен и используется в составе некоторых конъюгированных вакцин [47]. Использование данного белка-носителя позволит улучшить иммуногенность вакцины, а также снизить ее себестоимость ввиду увеличения выхода целевого продукта и оптимальной технологии.

Заключение

Аналитическое исследование по выбору модельного состава пневмококковой конъюгированной вакцины выполнено ФГУП СПбНИИВС ФМБА России в рамках продолжения прикладных научных исследований применения зарегистрированных вакцин и необходимости разработки новых вакцин для профилактики пневмококковой инфекции совместно с ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, а также в рамках подготовки предложений по вакцинации разрабатываемым отечественным вакцинным препаратом против пневмококковой инфекции ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

В состав модели пневмококковой конъюгированной вакцины PCV16, разрабатываемой ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, будут включены серо-

типы с широкой распространенностью в Российской Федерации и государствах — членах ЕАЭС и серотипы с высокой инвазивностью, устойчивостью к антибиотикам, при этом предусмотрена разработка оптимальной технологии получения полисахаридов и конъюгатов.

В дальнейшем планируется производство образцов вакцины в ФГУП СПбНИИВС ФМБА России и проведение доклинических и клинических исследований новой шестнадцативалентной пневмококковой конъюгированной вакцины с оптимально подобранным серотиповым составом: серотипы 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F. После завершения процедуры регистрации вакцины в Российской Федерации декретированным группам населения будет доступна отечественная пневмококковая конъюгированная вакцина полного цикла, произведенная в соответствии со стандартами качества.

Данный анализ эпидемиологической ситуации и выбор композиционной модели носит рекомендательный характер и не влечет за собой каких-либо обязательств перед производственными компаниями. Каждый разработчик иммунобиологических лекарственных препаратов самостоятельно определяет валентность пневмококковой вакцины и входящие в нее серотипы.

Литература/References

1. Баранов АА, Намазова-Баранова ЛС, Брико НИ, Лобзин ЮВ, Козлов РС, Костинов МП и др. Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции у детей. *Педиатрическая фармакология*. 2018;15(3):200–11. [Baranov AA, Namazova-Baranova LS, Briko NI, Lobzin YuV, Kozlov RS, Kostinov MP, et al. Vaccine prevention of pneumococcal infection in children. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric pharmacology*. 2018;15(3):200–11 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15690/pf.v15i3.1899>
2. Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(7):a010215. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010215>
3. Мартынова АВ, Павлова ОС, Чулакова ОА. Молекулярно-эпидемиологические особенности формирования антибиотикоустойчивости штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у лиц пожилого возраста. *Успехи геронтологии*. 2020;33(3):471–8. [Martynova AV, Pavlova OS, Chulakova OA. Molecular epidemiology peculiarities in forming of antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains, isolated in elderly patients. *Uspekhi gerontologii = Advances in Gerontology*. 2020;33(3):471–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.34922/AE.2020.33.3.007>
4. Махкамова ГТ, Шамансурова ЭА. Чувствительность пневмококков к антибиотикам у детей с пневмониями на фоне антибактериальной терапии. *Медицина: теория и практика*. 2019;4(S):357. [Makhkamova GT, Shamansurova EA. Susceptibility of pneumococci to antibiotics in children with pneumonia during antibiotic therapy. *Medsina: teoriya i praktika = Medicine: Theory and Practice*. 2019;4(S):357 (In Russ.)]
5. von Specht M, Gabarrot GG, Mollerach M, Bonofiglio L, Galletti P, Kaufman S, et al. Resistance to β -lactams in *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Argent Microbiol*. 2021;53(3):266–71. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.02.007>
6. Brandileone MC, Almeida SCG, Bokermann S, Minamisava R, Berezin EN, Harrison LH, et al. Dynamics of antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* following PCV10 introduction in Brazil: Nationwide surveillance from 2007 to 2019. *Vaccine*. 2021;39(23):3207–15. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.02.063>
7. Chen C, Liceras FC, Flasche S, Sidharta S, Yoong J, Sundaram N, et al. Effect and cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccination: a global modelling analysis. *The Lancet Global Health*. 2019;7(1):e58–e67. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30422-4](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30422-4)
8. Vorobieva S, Jensen V, Furberg AS, Slotved HC, Bazhukova T, Haldorsen B, Caugant DA, et al. Epidemiological and molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* carriage strains in pre-school children in Arkhangelsk, northern European Russia, prior to the introduction of

- conjugate pneumococcal vaccines. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):279. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-04998-5>
9. Phillips MT, Warren JL, Givon-Lavi N, Tothpal A, Regev-Yochay G, Dagan R, Weinberger DM. Evaluating post-vaccine expansion patterns of pneumococcal serotypes. *Vaccine.* 2020;38(49):7756–63. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.10.045>
 10. Королева ИС, Белошицкий ГВ, Миронов КО. Серотиповая характеристика пневмококков, выделенных от больных пневмококковым менингитом. *Вопросы современной педиатрии.* 2012;11(4):122–7. [Koroleva IS, Beloshitsky GV, Mironov KO. Serotype characteristics of pneumococci isolated from patients with pneumococcal meningitis. *Voprosy sovremennoi pediatrii = Current Pediatrics.* 2012;11(4):122–7 (In Russ.)]
 11. Маянский НА, Алябьева НМ, Пономаренко ОА, Куличенко ТВ, Артемова ИВ, Лазарева АВ и др. Динамика распространенности серотипов и антибиотикорезистентности носоглоточных пневмококков, выделенных у детей в 2010–2016 гг.: результаты ретроспективного когортного исследования. *Вопросы современной педиатрии.* 2017;16(5):413–23. [Mayanskiy NA, Alyabieva NM, Ponomarenko OA, Kulichenko TV, Artemova IV, Lazareva AV, et al. Serotypes and antimicrobial susceptibility of nasopharyngeal pneumococci isolated from children in 2010–2016: a retrospective cohort study. *Voprosy sovremennoi pediatrii = Current Pediatrics.* 2017;16(5): 413–23 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15690/vsp.v16i5.1806>
 12. Голубкова АА, Сомова АВ. Роль *Streptococcus pneumoniae* в этиологии внебольничных пневмоний в крупном промышленном регионе Российской Федерации. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2018;3:29–33. [Golubkova AA, Somova AV. Role of *Streptococcus pneumoniae* in the etiology of community-acquired pneumonia in a large industrial region of the Russian Federation. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal = Pacific Medical Journal.* 2018;3:29–33 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2018.3.29-33>
 13. Протасова ИН, Мартынова ГП, Ильенкова НА, Кутищева ИА, Домрачева СВ, Овчинникова ОП, Соколовская Е.С. Этиологическая роль и молекулярно-генетические особенности *Streptococcus pneumoniae* при инфекционных заболеваниях у детей. *Детские инфекции.* 2020;19(1):7–12. [Protasova IN, Martynova GP, Ilyenkova NA, Kutischeva IA, Domracheva SV, Ovchinnikova OP, Sokolovskaya E.S. Etiological role and molecular-genetic features of *Streptococcus pneumoniae* in children's infectious diseases. *Detskie infektsii = Children Infections.* 2020;19(1):7–12 (In Russ.)] <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2020-19-1-7-12>
 14. Белошицкий ГВ, Королева ИС, Королева МА. Серотиповой пейзаж пневмококков, выделенных при пневмококковом менингите, в Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2015;14(2):19–25. [Beloshitsky GV, Koroleva IS, Koroleva MA. Landscape of serotypes pneumococcus isolate with pneumococcal meningitis in the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2015;14(2):19–25 (In Russ.)]
 15. Маянский НА, Алябьева НМ, Лазарева АВ, Катосова ЛК. Серотиповое разнообразие и резистентность пневмококков. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2014;69(7–8):38–45. [Mayanskii NA, Alyab'eva NM, Lazareva AV, Katosova LK. Serotype diversity and resistance of pneumococci. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2014;69(7–8):38–45 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1108>
 16. Сидоренко СВ, Савинова ТА, Ильина ЕН, Сырочкина МА. Популяционная структура пневмококков со сниженной чувствительностью к пенициллину и перспективы антипневмококковой вакцинации для сдерживания распространения антибактериальной резистентности. *Антибиотики и химиотерапия.* 2011;56(5–6):11–8. [Sidorenko SV, Savinova TA, Ilyina EN, Syrochkina MA. Population pattern of pneumococci with lower susceptibility to penicillin and prospects of antipneumococcal vaccination to control antibiotic resistance distribution. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy.* 2011;56(5–6):11–8 (In Russ.)]
 17. Оганесян АН, Воробаева ЕА, Мельникова АА, Урбан ЮН, Егорова ЕА, Алёшкин ВА. Серотиповая характеристика пневмококков, выявленных у больных менингитом в ряде стран европейского и азиатского регионов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2017;16(3):39–49. [Oganesyan AN, Voropaeva EA, Mel'nikova AA, Urban YuN, Egorova EA, Aleshkin VA. Serotype characterization of streptococcus pneumoniae identified in meningitis cases in several Asian and European countries. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2017;16(3):39–49 (In Russ.)]
 18. Кожанова ИН. Пневмококковые заболевания у детей в Республике Беларусь. Эпидемиологическая характеристика. *Медицинские новости.* 2021;2(317):71–6. [Kozhanova IN. Pneumococcal diseases in children in the Republic of Belarus: epidemiological characteristics. *Meditsinskie novosti = Medical News.* 2021;2(317):71–6 (In Russ.)]
 19. Давыдов АВ, Титов ЛП, Ключико НЛ, Гуринович ВВ. Серотиповая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных у детей с острыми средними отитами и синуситами. *Здравоохранение (Минск).* 2016;3:12–20. [Davydov AV, Titov LP, Klyuiko NL, Gurinovich VV. Serotypic characteristic of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from children with acute otitis media and sinusitis. *Zdravookhranenie (Minsk) = Healthcare (Minsk).* 2016;3:12–20 (In Russ.)]
 20. Тарашкевич НВ, Шило РВ. Серопейзаж штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от больных пневмококковой инфекцией в г. Минске. *Молодой ученый.* 2014;18:162–4. [Tarashkevich NV, Shilo RV. Serolandscape of *S. pneumoniae* strains isolated

- from patients with pneumococcal infection in Minsk. *Molodoi uchenyi = Young Scientist*. 2014;18:162–4 (In Russ.))
21. Рамазанова БА, Ералиева ЛТ, Мустафина КК, Колоскова ЕА. Мультицентровое исследование распространенности фарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* на отдельных территориях Республики Казахстан до и после начала противопневмококковой вакцинации. *Антибиотики и Химиотерапия*. 2017;62(5–6):35–42. [Ramazanova BA, Eralieva LT, Mustafina KK, Koloskova EA. A multicenter study of the prevalence of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in selected areas of the Republic of Kazakhstan before and after the onset of antipneumococcal vaccination. *Antibiotiki i Khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2017;62(5–6):35–42 (In Russ.))
 22. Sidorenko S, Rennert W, Lobzin Yu, Briko N, Kozlov R, Namazova-Baranova L, et al. Multicenter study of serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal isolates from healthy children in the Russian Federation after introduction of PCV13 into the National Vaccination Calendar. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;96(1):114914. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114914>
 23. Белошицкий ГВ, Королева ИС. Серотиповая характеристика штаммов *S. pneumoniae* в Москве. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014;(1):90–7. [Beloshitsky GV, Koroleva IS. Serotype characteristics of *S. pneumoniae* in Moscow. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014;(1):90–7 (In Russ.))
 24. Corcoran M, Vickers I, Mereckiene J, Murchan S, Cotter S, Fitzgerald M, et al. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in older adults in the post-PCV era. Has there been a herd effect? *Epidemiol Infect*. 2017;145(11):2390–9. <https://doi.org/10.1017/S0950268817001194>
 25. Kim SH, Chung DR, Song JH, Baek JY, Thamlikitkul V, Wang H, et al. Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP). Changes in serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from adult patients in Asia: emergence of drug-resistant non-vaccine serotypes. *Vaccine*. 2020;38(38):6065–73. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.065>
 26. Mayanskiy N, Kulichenko T, Alyabieva N, Brzhozovskaya E, Ponomarenko O, Savinova T, Lazareva A. Changing serotype distribution and resistance patterns among pediatric nasopharyngeal pneumococci collected in Moscow, 2010–2017. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;94(4):385–90. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.02.010>
 27. Nakano S, Fujisawa T, Ito Y, Chang B, Matsumura Y, Yamamoto M, Suga S, et al. Nationwide surveillance of paediatric invasive and non-invasive pneumococcal disease in Japan after the introduction of the 13-valent conjugated vaccine, 2015–2017. *Vaccine*. 2020;38(7):1818–24. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.12.022>
 28. Savinova T, Brzhozovskaya E, Shagin D, Mikhaylova Y, Shelenkov A, Yanushevich Y, Mayanskiy N. A multiple drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* of serotype 15A occurring from serotype 19A by capsular switching. *Vaccine*. 2020;38(33):5114–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.05.075>
 29. Yang Baek J, Kim SH, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH, et al. Emergence of an extensively drug-resistant (XDR) *Streptococcus pneumoniae* serotype 15A by capsular switching. *Int J Med Microbiol*. 2018;308(8):986–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.08.004>
 30. Duvvuri VR, Deng X, Teatero S, Memari N, Athey T, Fittipaldi N, Gubbay J.B. Population structure and drug resistance patterns of emerging non-PCV-13 *Streptococcus pneumoniae* serotypes 22F, 15A, and 8 isolated from adults in Ontario, Canada. *Infect Genet Evol*. 2016;42:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.007>
 31. Голубкова АА, Сомова АВ. Роль пневмококков в этиологии внебольничных пневмоний с учетом их серотипового многообразия. В кн.: Покровский ВИ, ред. Инфекционные болезни в современном мире: эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика. Сборник трудов XII Ежегодного Всероссийского интернет-конгресса по инфекционным болезням с международным участием. М.; 2020. С. 60. [Golubkova AA, Somova AV. The role of pneumococci in the etiology of community-acquired pneumonia, taking into account their serotype diversity. In: Pokrovsky VI, ed. *Infectious Diseases in the Modern World: Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Prevention. Proceedings of the 12 Annual All-Russian Internet Congress on Infectious Diseases with International Participation*. Moscow; 2020. P. 60 (In Russ.))
 32. Жоголев КД, Жоголев СД, Куликов ПВ, Гумилевский БЮ, Сбойчаков ВБ, Клецко ЛИ и др. Серотиповой состав пневмококков, циркулирующих в коллективах военнослужащих, на фоне применения пневмококковых вакцин. *Известия Российской Военно-медицинской академии*. 2020;39(S3-2):74–6. [Zhogolev KD, Zhogolev SD, Kulikov PV, Gumilevsky BYu, Sboychakov VB, Kletsko LI, et al. Serotype composition of pneumococci circulating in collectives of military services on the background of application of pneumococcal vaccines. *Izvestiya Rossiiskoi Voenno-meditsinskoi akademii = Russian Military Medical Academy Reports*. 2020;39(S3-2):74–6 (In Russ.))
 33. Баязитова ЛТ, Тюпкина ОФ, Тюрин ЮА, Шамсутдинов АФ, Кадкина ВА, Решетникова ИД и др. Свойства пневмококков, колонизирующих носоглотку детей в г. Казани. *Инфекция и иммунитет*. 2016;6(3):5. [Bayazitova LT, Tyupkina OF, Tyurin YuA, Shamsutdinov AF, Kadkina VA, Reshetnikova ID, et al. Properties of pneumococci colonizing the nasopharynx of children in Kazan. *Infektsiya i immunitet = Infection and Immunity*. 2016;6(3):5 (In Russ.))
 34. Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw MH. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*.

- 2017;12(5):e0177113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177113>
35. Rokney A, Ben-Shimol S, Korenman Z, Porat N, Gorodnitzky Z, Givon-Lavi N, et al. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 12F after sequential introduction of 7- and 13-valent vaccines, Israel. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(3):453–61. <https://doi.org/10.3201/eid2403.170769>
 36. Nakanishi N, Yonezawa T, Tanaka S, Shirouzu Y, Naito Y, Ozaki A, et al. Assessment of the local clonal spread of *Streptococcus pneumoniae* serotype 12F caused invasive pneumococcal diseases among children and adults. *J Infect Public Health.* 2019;12(6):867–72. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.05.019>
 37. Давыдов АВ, Титов ЛП, Ключко НЛ, Гуринович ВВ, Лазарев АВ. Чувствительность к антибиотикам и связь с серотипами штаммов *Streptococcus pneumoniae* у детей с острым средним отитом и острым синуситом в Беларуси. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2018;20(3):206–15. [Davydov AV, Titov LP, Klyuko NL, Gurinovich VV, Lazarev AV. Antibiotic susceptibility and association with serotypes of *Streptococcus pneumoniae* strains in children with acute otitis media and acute sinusitis in Belarus. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2018;20(3):206–15 (In Russ.)] <https://doi.org/10.36488/cmhc.2018.3.206-215>
 38. Golden AR, Fear T, Baxter M, Adam HJ, Martin I, Demczuk W, et al. Invasive pneumococcal disease caused by serotypes 22F and 33F in Canada: the SAVE study 2011–2018. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021;101(2):115447. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115447>
 39. Amin-Chowdhury Z, Groves N, Sheppard CL, Litt D, Fry NK, Andrews N, Ladhani SN. Invasive pneumococcal disease due to 22F and 33F in England: a tail of two serotypes. *Vaccine.* 2021;39(14):1997–2004. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.02.026>
 40. Конон АД, Салимова ЕЛ, Красильников ИВ. Особенности технологического этапа конъюгации при производстве вакцин для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* тип b. *Биофармацевтический журнал.* 2020;12(4):7–21. [Konon AD, Salimova EL, Krasilnikov IV. Features of the technological stage of conjugation in the production of vaccines for the prevention of infections caused by *Haemophilus influenzae* type b. *Biofarmatsevticheskii zhurnal* = *Russian Journal of Biopharmaceuticals.* 2020;12(4):7–21 (In Russ.)]
 41. Иванова АА, Конон АД, Салимова ЕЛ, Трухин ВП. Верификация методики испытания вакцины гемофильной тип b конъюгированной по показателю «Капсульный полисахарид». *Фармация.* 2020;69(2):23–8. [Ivanova AA, Konon AD, Salimova EL, Trukhin VP. Verification of the test procedure for a *Haemophilus* type b conjugate vaccine by determination of capsular polysaccharide. *Farmatsiya* = *Pharmacy.* 2020;69(2):23–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-02-04>
 42. Салимова ЕЛ, Конон АД, Трухин ВП, Красильников ИВ. Мировые тенденции в изоляции, идентификации и характеристике *Haemophilus influenzae* тип b — возбудителя гемофильной инфекции. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.* 2019;1:87–95. [Salimova EL, Konon AD, Trukhin VP, Krasilnikov IV. World trends in isolation, identification and characteristics of *Haemophilus influenzae* type b — the agent of haemophilic infection. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya* = *Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.* 2019;1:87–95 (In Russ.)]
 43. Салимова ЕЛ, Конон АД, Трухин ВП, Красильников ИВ. Технология получения полирибозилрибитолфосфата в качестве активной фармацевтической субстанции для производства полисахаридных вакцин. *Фармация и фармакология.* 2018;6(1):47–62. [Salimova EL, Konon AD, Trukhin VP, Krasilnikov IV. Technology of obtaining polyribosylribitol phosphate as an active pharmaceutical ingredient for the production of polysaccharide vaccines. *Farmatsiya i farmakologiya* = *Pharmacy & Pharmacology.* 2018;6(1):47–62 (In Russ.)] <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2018-6-1-47-62>
 44. Салимова ЕЛ, Конон АД, Петровский СВ, Трухин ВП, Красильников ИВ. Особенности культивирования штаммов *Haemophilus influenzae* тип b — продуцентов полирибозилрибитолфосфата — основного компонента полисахаридных вакцин. *Фармация и фармакология.* 2017;5(5):422–41. [Salimova EL, Konon AD, Petrovskii SV, Trukhin VP, Krasilnikov IV. Peculiarities of cultivation of *haemophilus influenzae* type b strains — producers of polyribosylribitol phosphate — the main component of polysaccharide vaccines. *Farmatsiya i farmakologiya* = *Pharmacy & Pharmacology.* 2017;5(5):422–41 (In Russ.)] <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2017-5-5-422-441>
 45. Салимова ЕЛ, Конон АД, Трухин ВП, Петровский СВ, Красильников ИВ. Гемофильная инфекция: современные представления о вакцинопрофилактике. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2017;20(10):7–12. [Salimova EL, Konon AD, Trukhin VP, Petrovskii SV, Krasilnikov IV. The infection caused by *Haemophilus influenzae* type b: the modern vision of vaccine prevention. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii* = *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry.* 2017;20(10):7–12 (In Russ.)]
 46. Giannini G, Rappuoli R, Ratti G. The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(10):4063–9. <https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4063>
 47. Bröker M, Berti F, Schneider J, Vojtek I. Polysaccharide conjugate vaccine protein carriers as a “neglected valency” — Potential and limitations. *Vaccine.* 2017;35(25):3286–94. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.078>

Вклад авторов. В.П. Трухин — идея исследования и концепция работы, критический пересмотр содержания текста рукописи, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; А.Э. Евтушенко — обобщение материала, доработка текста рукописи; Е.Л. Салимова — сбор и анализ данных, интерпретация изученного материала, написание текста рукописи; А.Д. Конон — сбор и систематизация данных, оформление графического материала, написание текста рукописи; М.Р. Хаитов — консультативная помощь в интерпретации результатов исследования и оценка состояния проблемы; В.А. Меркулов — консультативная помощь при обобщении перспективных направлений разработки пневмококковых конъюгированных вакцин, критический пересмотр содержания текста рукописи.

Благодарности. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. В.А. Меркулов является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». М.Р. Хаитов является заместителем главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contribution. V.P. Trukhin—the idea and concept of the study, critical revision of the content of the text, and approval of the final version of the article for publication; A.E. Evtushenko—consolidation of the material, revision of the text of the manuscript; E.L. Salimova—data collection and analysis, interpretation of the studied material, writing of the text; A.D. Konon—data collection, systematisation and visualisation, writing of the text; M.R. Khaitov—advisory assistance in analysing of the results, an assessment of the state of the issue; V.A. Merkulov—advisory assistance in the analysis of perspective areas for the development of pneumococcal conjugate vaccines, critical revision of the content of the text.

Acknowledgements. The work was carried out without sponsorship.

Conflict of interest. V.A. Merkulov is the Editor-in-Chief of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. M.R. Khaitov is the Deputy Editor-in-Chief of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Трухин Виктор Павлович, канд. юрид. наук. ORCID:

<https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

v.p.trukhin@niivs.ru

Евтушенко Анатолий Эдуардович. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1189-579X>

<https://orcid.org/0000-0002-1189-579X>

a.e.evtushenko@niivs.ru

Салимова Елена Леонидовна, канд. фарм. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9883-2619>

e.l.salimova@niivs.ru

Конон Анастасия Дмитриевна, канд. техн. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3311-4771>

a.d.konon@niivs.ru

Хаитов Муса Рахимович, д-р мед. наук, проф., член-

корр. РАН. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-9640>

<https://orcid.org/0000-0003-4961-9640>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

merkulov@expmed.ru

Victor P. Trukhin, Cand. Sci. (Law). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

<https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

v.p.trukhin@niivs.ru

Anatoliy E. Evtushenko. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1189-579X>

<https://orcid.org/0000-0002-1189-579X>

a.e.evtushenko@niivs.ru

Elena L. Salimova, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9883-2619>

<https://orcid.org/0000-0002-9883-2619>

e.l.salimova@niivs.ru

Anastasiya D. Konon, Cand. Sci. (Tech.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3311-4771>

<https://orcid.org/0000-0002-3311-4771>

a.d.konon@niivs.ru

Musa R. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corr. Member

of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-9640>

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID:

<https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

merkulov@expmed.ru

Статья поступила 03.02.2022

После доработки 21.04.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Received 3 February 2022

Revised 21 April 2022

Accepted 10 June 2022



Перспективные направления в совершенствовании вакцин для профилактики полиомиелита

Е.Э. Евреинова¹, Л.М. Хантимирова^{1,✉}, В.А. Шевцов¹, 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

✉ Хантимирова Лейсан Маратовна; Khanximirova@expmed.ru

Резюме

Полиовирусы, принадлежащие к энтеровирусам группы С, являются причиной тяжелых поражений нервной системы. В эпоху после ликвидации полиомиелита Всемирная организация здравоохранения рекомендует для длительной эффективной защиты населения инактивированные вакцины против полиомиелита. Для обеспечения потребностей глобального здравоохранения предполагается увеличить применение традиционных и оптимизированных инактивированных вакцин против полиомиелита, а также внедрить вакцины нового типа, которые разрабатываются на основе современных представлений о РНК-содержащих вирусах. Цель работы — анализ аспектов усовершенствования вакцинных препаратов и обзор перспективных направлений развития иммунопрофилактики полиомиелита. Рассмотрены инновационные разработки на всех этапах технологического процесса, выполненные с целью получения оптимизированных вакцин, а также системы доставки вакцин. Представлена информация о новых вакцинных штаммах и клеточных линиях для производства вакцины. Обобщены результаты клинических исследований инактивированных вакцин, новых вакцин на основе генетически стабильных вакцинных штаммов вируса полиомиелита и вакцин, содержащих вирусоподобные частицы. Наиболее вероятно внедрение вакцин на основе вирусоподобных частиц генетически модифицированных штаммов вируса полиомиелита. В настоящее время многие вопросы, касающиеся актуальных направлений совершенствования иммунопрофилактики полиомиелита, являются дискуссионными и требуют решения в ближайшем будущем.

Ключевые слова: вирус полиомиелита; ликвидация полиомиелита; иммунизация; инактивированная вакцина против полиомиелита

Для цитирования: Евреинова Е.Э., Хантимирова Л.М., Шевцов В.А., Меркулов В.А., Бондарев В.П. Перспективные направления в совершенствовании вакцин для профилактики полиомиелита. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):142–153. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-336>

Promising opportunities to improve polio vaccines

E.E. Evreinova¹, L.M. Khantimirova^{1,✉}, V.A. Shevtsov¹, 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

✉ Leysan M. Khantimirova; Khantimirova@expmed.ru

Abstract

Polioviruses belong to Enterovirus C species and cause severe lesions of the nervous system. In the post-polio eradication era, the World Health Organisation recommends inactivated polio vaccines for effective long-term protection of the population. In order to meet the needs of global health, it is planned to increase the use of traditional and optimised inactivated polio vaccines and introduce new types of vaccines that are being developed based on the current understanding of RNA-containing viruses. The aim of the study was to analyse ways of improving vaccine preparations and to review promising areas for polio immunoprophylaxis development. The authors considered innovations across all stages of the technological process, aimed at obtaining optimised vaccines, as well as vaccine delivery systems. The article presents information on new vaccine strains and cell lines for vaccine production. The authors summarised the results of clinical studies of inactivated vaccines, new vaccines based on genetically stable vaccine strains of poliovirus, and vaccines containing virus-like particles. The most likely candidates for introduction are the vaccines based on virus-like particles obtained from genetically modified strains of poliovirus. At the moment, many issues related to current trends in improving the immunoprophylaxis of poliomyelitis are debatable and need to be addressed in the near future.

Key words: poliovirus; eradication of poliomyelitis; immunisation; inactivated polio vaccine

For citation: Evreinova E.E., Khantimirova L.M., Shevtsov V.A., Merkulov V.A., Bondarev V.P. Promising opportunities to improve polio vaccines. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):142–153. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-336>

Введение

Для долгосрочной защиты населения после сертификации ликвидации полиомиелита с целью предотвращения возможного повторного появления полиовирусов в мировом масштабе Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) рекомендовано применять только инактивированную вакцину против полиомиелита. Вопрос о возможности насыщения мирового рынка необходимым количеством такой вакцины был поставлен более двадцати лет назад. До настоящего времени выпуск требуемого для глобального потребления объема инактивированной вакцины не налажен. В большом количестве публикаций рассматриваются вопросы возможности интенсификации процесса производства инактивированной вакцины на основе аттенуированных штаммов А. Сэбина вирусов полиомиелита 1, 2,

3 типа для получения дешевой, доступной, производимой в достаточном объеме вакцины. Для иммунопрофилактики полиомиелита предложены вакцины нового типа, разрабатываемые на основе современных представлений об особенностях репликации РНК-содержащих вирусов. Наиболее вероятно дальнейшее внедрение вакцин на основе вирусоподобных частиц, полученных из генетически модифицированных штаммов вируса полиомиелита.

Цель работы — анализ аспектов усовершенствования вакцинных препаратов и обзор перспективных направлений развития иммунопрофилактики полиомиелита.

Полиомиелит

Полиомиелит — это острое инфекционное заболевание, которое встречается только у людей.

Инфекция может протекать бессимптомно, проявляться в виде респираторных или кишечных заболеваний. Возможны неврологические формы заболевания, асептический менингит и параличи, приводящие к летальному исходу¹. Передача инфекции происходит от человека к человеку фекально-оральным путем или орально-оральным путем. Возможна передача вируса с водой, пищевыми продуктами, насекомыми (мухи) [1, 2]. Заболевание носит двухфазный характер с инкубационным периодом до появления первых симптомов от 3 до 6 дней. Выделение вируса со слюной и фекалиями начинается на 6–7-й день. Продолжительность выделения полиовирусов с фекалиями составляет около 30 дней, но может продолжаться значительно дольше. Развитие неврологических симптомов длится от 3 до 35 дней, с 7 до 21 дня. Возбудителями инфекции являются отличающиеся серологически полиовирусы 1, 2, 3 типов (ПВ1, ПВ2, ПВ3), относящиеся к энтеровирусам вида С семейства *Picornaviridae* [3]. Это безоболочечные вирусы, содержащие инфекционную одноцепочечную РНК из приблизительно 7500 нуклеотидов². В соответствии с современными представлениями РНК-содержащие вирусы существуют в виде «генетического облака» и образуют квазивиды [4–7]. Антигенная структура, строение вириона и генома полиовирусов нейровирулентных и аттенуированных вакцинных штаммов охарактеризованы, изучены механизмы аттенуации и стабилизации геномов, особенности репликации вирусов. В исследованиях на культурах клеток, инфицированных вирусами полиомиелита, было установлено, что вирус вызывает лизис, апоптоз клеток, а также показано высвобождение вирусов в составе везикул и экзосом [7–9]. Вирусы также способны высвобождаться нелимитическим путем в составе аутофагосом по механизму секреторной аутофагии, облегчающему их передачу из клетки в клетку [10, 11]. В силу особенностей строения генома и биологии полиовирусов требуется непрерывное наблюдение

за мутациями и рекомбинациями РНК вирусов производственных штаммов вакцин [12, 13].

При координации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 1988 г. создана Глобальная инициатива по ликвидации полиомиелита (ГИЛП), в рамках которой, в соответствии с международными программами и стратегиями, а также в рамках выполнения Национальных программ по иммунизации осуществляется ликвидация полиомиелита³. ВОЗ подтверждена глобальная ликвидация дикого ПВ2 в 2015 г., ПВ3 – в 2019 г.⁴ По сравнению с предыдущим годом в 2021 г. произошло значительное сокращение случаев обнаружения дикого ПВ1 у здоровых детей, контактных лиц, в образцах окружающей среды и в других источниках⁵. В Российской Федерации обеспечено сохранение статуса территории, свободной от полиомиелита.

Вакцины против полиомиелита

Полиомиелит является контролируемой инфекцией. В соответствии с рекомендациями ВОЗ иммунизацию против полиомиелита проводят с использованием двух различных типов вакцин: инактивированной вакцины против полиомиелита (ИПВ) и живой ослабленной пероральной вакцины против полиомиелита (ОПВ)⁶.

Последовательное применение ИПВ и бивалентной оральной полиомиелитной вакцины (БОПВ) в схемах иммунизации позволяет уменьшить количество случаев вакциноассоциированного паралитического полиомиелита и создает популяционный иммунитет, препятствующий распространению циркулирующих полиовирусов вакцинного происхождения (цПВВП) 1, 2, 3 типов, а также вакцинородственных полиовирусов (ВРП) с повышенной способностью к циркуляции, в том числе циркулирующих ВРП (цВРП); ВРП, выделяемых лицами с иммунодефицитом, и ВРП невыясненного происхождения [14–16]. Число случаев заболевания в мире в 2021 г., вызванного цПВВП 2 типа, составило около 600 случаев, а цПВВП 1 типа – 16⁷.

¹ https://www.who.int/health-topics/poliomyelitis#tab=tab_1

² <https://ictv.global/report/picornaviridae/enterovirus/>

³ Polio eradication strategy 2022–2026: delivering on a promise. WHO; 2021. <https://polioeradication.org/gpei-strategy-2022-2026/>

⁴ <https://www.who.int/ru/news-room/feature-stories/detail/two-out-of-three-wild-poliovirus-strains-eradicated>

⁵ Global wild poliovirus 2016–2021. WHO; 2021. <https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2021/12/weekly-polio-analyses-WPV-20211228.pdf>

⁶ Polio vaccines: WHO position paper – March, 2016. Weekly Epidemiological Record, 2016;91(12):145–68. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254399>

Meeting of Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, October 2021: conclusions and recommendations. Weekly Epidemiological Record, 2021;96(50):613–32. <https://www.who.int/publications/i/item/meeting-of-strategic-advisory-group-of-experts-on-immunization-october-2021-conclusions-and-recommendations>

⁷ Global Circulating Vaccine-derived Poliovirus (cVDPV) 1, 2, 3. WHO; 2022. <https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2022/03/weekly-polio-analyses-cVDPV-20220308.pdf>

При этом в Афганистане и Пакистане выявлена одновременная циркуляция дикого ПВ1 и цПВВП 2 типа. В Китае зарегистрирована циркуляция цПВВП3 в образцах окружающей среды⁸.

В настоящее время одна доза ИПВ присутствует в схемах иммунизации против полиомиелита национальных календарей прививок всех стран – членов ВОЗ. К концу 2021 г. 60% стран – членов ВОЗ перешли на схемы, содержащие по крайней мере две дозы ИПВ, а 40% (78 из 194 стран) перешли на схемы с введением по крайней мере одной дозы ИПВ. В Российской Федерации в соответствии с национальным календарем профилактических прививок первая, вторая, третья вакцинации и первая ревакцинация против полиомиелита детям проводятся ИПВ, а вторая и третья ревакцинации – ОПВ⁹.

В рамках ГИЛП были внесены коррективы в «Стратегический план по ликвидации полиомиелита на заключительном этапе» на основании опыта, полученного в ходе борьбы со вспышками цПВВП 2 типа. Были учтены стратегии дополнительной иммунизации; потенциальная доступность новых, генетически более стабильных вариантов вакцины; создание и поддержание соответствующих глобальных запасов пероральной вакцины против полиомиелита; интервалы времени между сертификацией ликвидации полиомиелита и прекращением использования пероральной вакцины против полиомиелита. Стратегия ГИЛП 2022–2026 гг. предусматривает внедрение новой моновалентной оральной полиомиелитной вакцины (НОПВ) 2 типа на основе модифицированного генетически стабильного штамма А. Сэбина одновременно с применением комплекса организационных мероприятий¹⁰. Основными этапами плана прерывания передачи цПВВП в странах, где возникают вспышки, и в странах, подверженных риску появления полиомиелита, являются прекращение с помощью НОПВ 2 типа циркуляции цПВВП 2 типа к концу 2023 г., внедрение НОПВ 1 и 3 типа и новой трехвалентной ОПВ, чтобы остановить передачу всех цПВВП к 2028 г., и последующий переход на массовую иммунизацию только ИПВ¹¹.

После прекращения выявления полиовирусов на заключительных этапах в соответствии со стратегией ГИЛП с 2029 г. предполагается полная отмена применения оральных живых вакцин. Вместе с тем, единое мнение научной общественности о необходимости применения при будущей иммунопрофилактике полиомиелита вакцин на основе генетически модифицированных штаммов А. Сэбина или вакцин на основе вирусоподобных частиц, не содержащих генетический материал полиовирусов, полностью не сформировано. Обсуждается возможность полной отмены ОПВ и готовность к переходу на ИПВ в глобальном масштабе [17, 18]. Угроза паралитического полиомиелита может быть устранена только путем поддержания высокого уровня популяционного иммунитета [19, 20].

Способы усовершенствования традиционной ИПВ

ИПВ является одной из наиболее безопасных и эффективных среди используемых вакцин¹². В схемах иммунизации в странах, использующих «только ИПВ», применяют 3 или 4 дозы, так как две дозы обеспечивают 90% иммунитет, а три или более доз – 99% иммунитет ко всем трем типам полиовирусов. Введение второй дозы ИПВ в национальные календари прививок стран, использующих БОПВ, осложнено недостаточным количеством поставляемой на мировой рынок вакцины и значительной стоимостью одной дозы¹³. Стоимость ИПВ определена высокой концентрацией антигенов типов ПВ1, ПВ2, ПВ3 в дозе вакцины, относительно небольшим объемом выпускаемой вакцины и необходимостью обеспечения биобезопасности, сложностью условий хранения и транспортирования на местах применения, стоимостью труда медицинского персонала при парентеральном пути введения вакцины. Технологические сложности производственного процесса (низкий выход вирусных сборов, необходимость длительной инактивации формалином больших объемов нейровирулентных полупродуктов), размещение производства на территории стран, в которых высокая степень популяционного

⁸ <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Communicable-disease-threats-report-04-june-2021-public.pdf>

⁹ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.12.2021 № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок».

¹⁰ Polio eradication strategy 2022–2026: delivering on a promise. WHO; 2021. <https://polioeradication.org/gpei-strategy-2022-2026/>

¹¹ Там же.

¹² <https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/poliomyelitis/>

¹³ <https://www.gavi.org/types-support/vaccine-support/inactivated-polio-vaccine>

иммунитета населения может сдерживать распространение вируса при внезапном попадании вирусов в окружающую среду, не позволяя его интенсифицировать. Для уменьшения расхода антигена и для снижения стоимости ИПВ¹⁴ были предприняты следующие подходы [21].

1. Оптимизированы готовая лекарственная форма ИПВ, упаковка, срок годности, пути введения и схемы иммунизации.

2. Изучены формуляция (состав) и лекарственные формы ИПВ: лиофилизаты, капсулы, патчи, возможность применения адъювантов и средств доставки, возможность использования в составе комбинированных вакцин.

3. Определены средства интенсификации технологического процесса производства ИПВ.

3.1. Клеточный субстрат при производстве вакцин: адаптация культуры клеток к большим объемам биореакторов, выращивание суспензионных культур клеток, разработка дешевых питательных сред с химически определенными составами.

3.2. Снижение потерь при инаktivации вируса.

3.3. Применение альтернативных посевных вирусов: штаммов А. Сэбина и генетически модифицированных вакцинных штаммов.

4. Перенос производства (трансфер технологии) вакцины в страны-потребители¹⁵.

ВОЗ предлагает меры по уменьшению числа отходов, в том числе возможность производить вакцину в многодозовых упаковках и увеличить срок хранения многодозовых флаконов после открытия до 28 суток при соответствующих условиях хранения¹⁶.

С целью уменьшения расхода антигена ИПВ был предложен интрадермальный путь введения вакцины, позволяющий получить иммунный ответ на меньшее количество антигена (0,1 мл, или 1/5 дозы ИПВ – фракционная доза ИПВ, ФИПВ) чем в дозе для внутримышечной инъекции [22, 23]. Схема вакцинации двумя дозами ФИПВ (на 6 и 14 неделе от рождения) взамен одной дозы ИПВ (на 14 неделе от рождения) была одобрена национальными органами здравоохранения и применяется при массовой иммунизации в странах Юго-Восточной Азии (Бангладеш, Непал, Шри-Ланка, Индия). Региональная

техническая консультативная группа для регионов Северной и Южной Америки рекомендовала странам, в которых ежегодно вводят >100000 доз ИПВ и имеется возможность обучать и контролировать работников здравоохранения по применению внутримышечных инъекций, перейти на схему иммунизации с двумя дозами ФИПВ¹⁷.

С целью уменьшения количества антигена в дозе вакцины изучена возможность усиления иммунного ответа при совместном введении ИПВ и гидроксида алюминия в качестве адъюванта. В доклинических и клинических исследованиях уровень иммунного ответа в группах, получавших внутримышечно классическую ИПВ, и в группах, получавших внутримышечно ИПВ с адъювантом и различным уровнем фракционирования антигена, не отличался. В клинических исследованиях фазы 3 использовали суспензию для инъекций, содержащую 1/10 дозы антигена в ИПВ и 0,5 мг гидроксида алюминия. Уровни сероконверсии после первичного внутримышечного применения и количество случаев выявления нежелательных явлений в обеих группах существенно не отличались, что свидетельствовало о сходной эффективности классической ИПВ и ИПВ с адъювантом, содержащей в 10 раз меньшее количество антигенов, и безопасности ИПВ с адъювантом [24, 25]. ВОЗ была проведена преквалификация ИПВ с адъювантом (IPV-AI AJV, торговое наименование Picovax®) производства AJ Vaccines A/S, Дания¹⁸.

При разработке новых формуляций вакцины для получения термостабильного препарата с длительным сроком хранения было показано, что применение для лиофилизации буфера на основе хлорида магния позволяет обеспечить стабильность лиофилизата ИПВ в течение 10 лет и позволяет восстанавливать антигены ПВ без потерь [26]. Предложен состав лиофилизированной формы ИПВ в капсулах для длительного высвобождения и патчах для фракционного интрадермального введения [27, 28]. Патчи более термостабильны по сравнению с ИПВ в форме раствора или суспензии. Модификация буферов и водорастворимых вспомогательных веществ в составе микропатчей HD-MAP

¹⁴ An economic analysis of strategies to reduce the cost of routine IPV immunization. Program for Appropriate Technology in Health; 2010. https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/TS_IPV_econ_analysis.pdf

¹⁵ <https://polioeradication.org/news-post/polio-vaccine-technology-transfer-continues/>

¹⁶ WHO policy statement: multi-dose vial policy (MDVP): handling of multi-dose vaccine vials after opening, Revision 2014. WHO; 2014. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/135972>

¹⁷ <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/immunization/tables/fipv-considerations-for-decision-making-april2017.pdf>

¹⁸ <https://ajvaccines.com/breakthrough-in-the-global-battle-against-polio-aj-vaccines-granted-who-prequalification-for-new-polio-vaccine/#:~:text=International%20vaccine%20manufacturer%2C%20AJ%20Vaccines,are%20expected%20by%20mid%2D2020>

(ранее — Nanopatch), Vaxxas, Австралия, позволяет улучшить систему доставки ИПВ, использовать фракционные дозы, хранить и транспортировать вакцину без охлаждения. Микроигольные патчи не требуют привлечения специалистов для иммунизации и не создают биологически опасных отходов [29–31].

Подходы к интенсификации технологического процесса производства инактивированной полиомиелитной вакцины

Для производства ИПВ ВОЗ рекомендованы: классическая ИПВ (вакцина Солка) на основе вирулентных вакцинных штаммов вирусов полиомиелита 1, 2 и 3 типов (штаммы Mahoney, MEF-1 и Saukett, представляющие вирусы полиомиелита типа 1, 2 и 3 соответственно); ИПВ на основе аттенуированных вакцинных штаммов вирусов полиомиелита 1, 2, 3 типов А. Сэбина (С-ИПВ); ИПВ на основе альтернативных аттенуированных штаммов, в частности штаммов, полученных с применением технологии рекомбинантной ДНК¹⁹. Основными производителями ИПВ являются Bilthoven Biologicals B.V. (Нидерланды), GlaxoSmithKline Vaccines (Бельгия), Sanofi Pasteur (Франция), AJ Vaccines (Дания), Shantha Biotechnics (Индия), Serum Institute of India (Индия), ООО «Инвак» (Российская Федерация)²⁰. Совершенствование и оптимизация технологии получения ИПВ является одним из основных путей решения проблемы глобальной иммунизации против полиомиелита.

Клеточные субстраты для изготовления инактивированных полиовакцин

Производители ИПВ используют в процессе производства перевиваемую линию клеток Vero (культура клеток почек африканской зеленой мартышки). Клеточная линия Vero является наиболее признаваемым регуляторными органами клеточным субстратом из-за низкого онкогенного потенциала, высокой перmissивности для вирусов и большей чувствительности к полиовирусам, чем диплоидные клетки человека [32, 33]. Для создания производственных мастер-банков культур клеток

ВОЗ предоставляет производителям вакцин линию клеток Vero (WHO) из референтного банка клеток Vero 10-87 (WHO Vero reference cell bank 10-87), созданного в 1987 г. и хранящегося в Американской коллекции типовых культур (ATCC CCL 81) и Европейской коллекции культур клеток животных (ECACC 88020401)²¹. Перевиваемая линия клеток Vero является адгезивной. Клетки Vero могут быть выращены на микроносителях с использованием больших ферментеров и одноразовых биореакторов [34, 35]. В связи с предстоящим глобальным увеличением потребления ИПВ усиливаются требования к продуктивности клеточного субстрата для наработки вируса, стандартизации производственного процесса, качеству питательных сред. Вместе с тем масштабирование производства вакцин в адгезивных культурах остается трудоемким и затратным [36].

Адаптация клеток Vero для выращивания в суспензии с использованием бессывороточных питательных сред позволят сделать технологический процесс более контролируемым и масштабируемым, уменьшить риск контаминации и снизить себестоимость производства вакцины. Линия клеток Vero была адаптирована к росту в бессывороточной среде IHM03 [36]. Безопасность перевиваемой линии клеток Vero была изучена в дополнительных исследованиях [37, 38]. С помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 были разработаны генетически модифицированные клетки Vero с улучшенной чувствительностью к полиовирусу [39]. Доступна коммерческая клеточная линия Vero-STAT1 knockout (ATCC CCL-81-VHG), более продуктивная по сравнению с исходной клеточной линией Vero (ATCC CCL 81).

Для производства С-ИПВ предложена линия клеток PER.C6[®], полученная в 1985 г. из клеток сетчатки глаза эмбриона человека, трансформированных аденовирусом 5 типа [33]. Культура клеток обладает способностью расти в суспензии до высокой плотности клеток без добавления сыворотки или микроносителей, что позволяет в десятки раз повысить выход всех известных производственных штаммов полиовирусов [40]. Клинические исследования показали хорошую переносимость и высокую иммуногенность

¹⁹ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (inactivated). Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 910. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization: sixty-fifth report. WHO Technical Report Series, No. 993, Annex 3. WHO; 2015. http://www.who.int/biologicals/vaccines/Annex3_IPV_Recommendations_eng.pdf?ua=1

Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (inactivated), Annex 3, TRS No 1024. WHO; 2020. <https://www.who.int/publications/m/item/poliomyelitis-vaccines-annex-3-trs-no-1024>

²⁰ <https://www.unicef.org/supply/media/791/file/inactivated%20polio%20vaccine%20IPV%20market%20update.pdf>

²¹ <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/who-reference-cell-banks>

С-ИПВ, полученной с использованием в качестве субстрата клеточной линии PER.C6[®] [41].

Инактивация полиовирусов

Стандартный (классический) технологический процесс производства ИПВ и С-ИПВ включает стадию химической инактивации полиовирусов путем длительной инкубации (от двух до трех недель) при 37 °С больших объемов вируса с формалином. После инактивации антигенная активность полиовирусов в ИПВ и С-ИПВ снижается. Кроме того, антигенные свойства полиовирусов в вакцинах ИПВ и С-ИПВ отличаются. Формалин изменяет специфичность нейтрализующих эпитопов вирусов, в том числе вирусов штаммов А. Сэбина. Показано, что после инактивации полиовируса типа 1 формалином в вакцине С-ИПВ у полиовирусов типа 1 более высокая иммуногенность по сравнению с вакциной ИПВ, тогда как после инактивации полиовирусов типа 2 и 3 в вакцине С-ИПВ у полиовирусов типа 2 и 3 меньшая иммуногенность по сравнению с ИПВ [42]. Перекись водорода, аскорбиновая кислота и эпигаллокатехин-3-галлат полностью и необратимо инактивировали полиовирусы штаммов А. Сэбина типов 1, 2, 3 в течение 24 ч с сохранением иммуногенных эпитопов полиовирусов типов 1, 2 и 3 в вакцине С-ИПВ [43].

Облучение в ультрафиолетовом диапазоне и радиационная стерилизация инфекционного биологического материала с разрушением нуклеиновых кислот и сохранением структуры поверхностных антигенов применяются в технологическом процессе производства ряда вакцин [37]. Технологический процесс получения С-ИПВ с использованием радиационной стерилизации (источник гамма-излучения — кобальт-60) и антиоксидантного комплексного соединения, полученного из устойчивого к облучению микроорганизма *Deinococcus radiodurans*, позволяет сохранить иммуногенные эпитопы полиовирусов типов 1, 2 и 3 вакцины С-ИПВ, что значительно упрощает производственный процесс и увеличивает выход вакцины [44].

Инактивированная полиомиелитная вакцина на основе аттенуированных штаммов А. Сэбина

Перед участниками стратегии реализации ГИЛП была поставлена задача получения необходимых количеств ИПВ, экономически

доступной для применения в странах-потребителях²². Производство ИПВ по классической технологии непосредственно в странах-потребителях из-за требований биологической безопасности разрешено только с использованием аттенуированных штаммов полиовирусов А. Сэбина²³. Размещение площадок по производству С-ИПВ в регионах обеспечит необходимое количество доз вакцины, позволит снизить производственные и транспортные расходы. Ожидается, что экономия средств будет обеспечена за счет производства в условиях низких затрат [45].

С-ИПВ были разрешены к применению в Японии (производство Biken Institute и Kakuketsan) [46]. На внутреннем рынке Китая доступна С-ИПВ производства Institute of Medical Biology of the Chinese Academy of Medical Sciences (IMBCAMS), произведенная по собственной технологии [47]. По механизму трансфера технологии организовано производство С-ИПВ: sIPV (Sinovac Biotech, Китай), WIBP (Sinopharm Wuhan, Китай); планируется выпуск С-ИПВ производителями: Beijing Minhai Biotechnology (Китай), Panacea Biotec (Индия) и Bharat Biotech (Индия)²⁴. Проведена преквалификация ВОЗ вакцины С-ИПВ Eurpolio™ (LG Chem, Республика Корея) что позволит поставлять вакцину в страны-потребители²⁵.

Для С-ИПВ проведены клинические исследования фазы 3, а для С-ИПВ производства IMBCAMS — клинические исследования фазы 4 [48]. При сравнении двух- и трехдозовых схем иммунизации С-ИПВ производства IMBCAMS было показано, что вакцина высокоиммуногенна и через один месяц после получения последней дозы обеспечивала иммунитет более 98% ко всем трем типам полиовирусов как в трехдозовой (2, 3 и 4 месяца), так и двухдозовой (4 месяца и на 8–11 месяцев) схемах вакцинации [49].

В Российской Федерации подготовлены технология и производственная база для промышленного выпуска зарегистрированной в 2021 г. вакцины С-ИПВ Полиоваксин (вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая из аттенуированных штаммов А. Сэбина, ООО «Инвак») [50].

Для стандартизации ВОЗ разработан международный стандартный образец С-ИПВ (WHO International Standard for Sabin Inactivated Polio Vaccine (sIPV) 17/160 NIBSC code: 17/160)

²² <http://polioeradication.org/tools-and-library/current-research-areas>

²³ <http://polioeradication.org/news-post/who-facilitates-new-polio-vaccine-technology-transfer/>

²⁴ Там же.

²⁵ <https://www.intravacc.nl/news/intravaccs-sabin-inactivated-polio-vaccine-sipv-outlicensed-to-lg-chem-receives-who-prequalification/>

для определения содержания антигенов вирусов полиомиелита 1, 2, 3 типа штаммов А. Сэбина в вакцине С-ИПВ²⁶ [51].

Усиление мукозального иммунитета инактивированной полиомиелитной вакцины

Особый интерес представляют способы применения и формуляции ИПВ и С-ИПВ, позволяющие усиливать местные иммунные реакции слизистой оболочки кишечника [52, 53]. Применение в составе ИПВ катионного адъюванта CAF01 (cationic adjuvant formulation) приводило к повышению уровня иммунного ответа, увеличению титра связывающих и нейтрализующих антител в сыворотке крови. Адъювант CAF01 влиял на кинетику как клеточного, так и гуморального ответа к ИПВ. При введении адъюванта наблюдалось преобладание изотипов IgG2a, IgG2b и IgG2c, а также специфических Т-клеток, секретирующих IFN- γ /IL-2. Использование CAF01 в составе ИПВ имеет перспективы при создании новой полиовакцины с целью усиления гуморального и клеточного иммунитета против вируса полиомиелита [54].

Адъювантные свойства dmLT (R192G/L211A), относящегося к семейству бактериальных АДФ-рибозилирующих энтеротоксинов и являющегося производным термолабильного энтеротоксина *E. coli*, изучены в ряде доклинических исследований на животных. Показана способность усиливать иммунный ответ на введенные вместе с dmLT антигены различных вакцин [55]. Применение ИПВ с адъювантом dmLT при парентеральном введении мышам приводило к усилению иммунитета слизистых оболочек, повышению уровня фекальной и кишечной секреции IgG и IgA, увеличению уровня нейтрализующих антител в сыворотке, а при сублингвальном введении – повышению уровня IgG, IgA в слюне и нейтрализующих антител в сыворотке [55, 56]. Иммуномодулятор 1,25-дигидроксивитамин D3 усиливал системный и мукозальный иммунный ответ мышей к ИПВ при внутрибрюшинном введении, приводил к увеличению уровня нейтрализующих антител ко всем трем типам вирусов и к повышению уровня IgA в слюне в ответ на ПВ 1 и 3 типа [57].

Альтернативной возможностью усиления системного и мукозального иммунитета является применение оральной бустерной вакцины после однократного праймирования ИПВ. Предложен вариант оральной вакцины, содержащей капсидный белок полиовируса VP1, экспрессирующийся в хлоропластах листьев табака, совместно

с растительным адъювантом-модулятором [58]. Пероральное введение мышам бустерной вакцины после однократного праймирования ИПВ приводило к значительному повышению титра IgG1 и уровня секреторных IgA в кишечнике, что обеспечивало защитный иммунитет против всех серотипов полиовируса.

Новые вакцины для применения в период после глобальной сертификации ликвидации полиомиелита

Разработка вакцин для применения в период после сертификации ликвидации полиомиелита направлена на получение безопасных, экономичных препаратов, производство которых может быть налажено в странах, являющихся потребителями вакцин против полиомиелита. С этой целью предполагается использовать генетически модифицированные вакцинные штаммы и новые технологии, позволяющие производить вакцины вне условий контейнента. Генетически стабильные штаммы А. Сэбина для новых оральных вакцин (НОПВ1, НОПВ2, НОПВ3) могут также служить недорогим и биобезопасным вариантом посевных вирусов для создания новой вакцины С-ИПВ следующего поколения. Предложено применение аттенуированных и генетически стабильных штаммов ПВ 1, 2, 3 (на основе штаммов Mahoney, MEF-1, Saukett, S19, Brunenders и на основе штаммов А. Сэбина) [59–61].

Биотехнологическое производство вирусоподобных частиц (ВПЧ) для создания вакцин против вирусных инфекций и производство рекомбинантных белков антигенов и ВПЧ в генетически модифицированных растениях («молекулярное фермерство», molecular farming) или растительных клеточных культурах не требуют культивирования живого вируса и представляются безопасным и эффективным подходом. Для получения полиовирусных ВПЧ возможно использование различных систем экспрессии в клетках млекопитающих, растений, насекомых и дрожжей [62, 63]. В настоящее время производство ВПЧ стало экономически более доступным, что позволяет ускорить внедрение нереплицирующейся вакцины на основе антигенов ПВ в виде ВПЧ. Проблемой для таких рекомбинантных ВПЧ являются низкая стабильность и тенденция к формированию С-антигенной конформации из D конформации. С помощью системы экспрессии в клетках млекопитающих (ВНК-21) путем внесения стабилизирующих мутаций были получены термостабилизированные ВПЧ,

²⁶ WHO International Standard Sabin Inactivated Polio Vaccine (sIPV) 17/160 NIBSC code: 17/160. Instructions for use (Version 2.0, Dated 11/12/2018). <https://www.nibsc.org/documents/ifu/17-160.pdf>

содержащие стабилизирующий покет-фактор и сохраняющие нативную D-антигенную конформацию [63]. Экспериментально было показано, что иммунизация крыс полученными ВПЧ вызывала индукцию высоких титров нейтрализующих антител.

Предложена векторная вакцина на основе вируса болезни Ньюкасла, в которой предшественник капсидного белка ПВ вместе с протеазой, необходимой для его процессинга, экспрессируются в векторном вирусе [64]. В этой системе полиовирусные ВПЧ продуцируются в клетках реципиентов вакцины и презентуются в контексте активной репликации вируса болезни Ньюкасла, который служит естественным адъювантом. Продemonстрировано, что интраназальное введение векторной вакцины морским свинкам приводило к индукции сильного системного и мукозального иммунного ответа.

Современные технологические подходы, основанные на достижениях в области генной инженерии и биотехнологии, усовершенствованных методах культивирования клеток, могут помочь снизить затраты и повысить объем производства, что позволит быстрее реагировать на возникающие угрозы по мере перехода на платформы для производства вакцин следующего поколения.

Вакцины на основе мРНК вирусов обладают важными преимуществами по сравнению с другими подходами, включая высокую эффективность, безопасность и потенциал для быстрого, экономичного и масштабируемого производства. В последнее время значительно увеличилось количество разработанных РНК-вакцин и проводимых клинических исследований. Показана способность РНК-вакцин вызывать мукозальный

иммунитет. Развитие технологической платформы для получения РНК-вакцин и методов их доставки, применение этих платформенных технологий в период пандемии COVID-19 повышают вероятность дальнейшей разработки и внедрения вакцины на основе РНК полиовирусов [65, 66].

Заключение

Стратегия ВОЗ предусматривает использование в схемах массовой иммунизации эффективных вакцин, не способных к репликации в организме человека. В рамках национальных календарей профилактических прививок предусмотрено применение инактивированных полиомиелитных вакцин (ИПВ или С-ИПВ) или комбинированных шестивалентных вакцин, содержащих в качестве компонента ИПВ (или С-ИПВ).

Разработки в области совершенствования технологического процесса, состава, методов доставки и схем иммунизации ИПВ и С-ИПВ, а также увеличение количества производителей С-ИПВ позволят обеспечить необходимое количество распределяемых доз вакцины. Наиболее вероятным в ближайшей перспективе представляется вариант вакцины, содержащей ИПВ на основе генетически стабильных штаммов А. Сэбина совместно с адъювантом-модулятором мукозального иммунного ответа, предназначенной для внутрикожного пути введения.

В настоящее время многие вопросы, касающиеся актуальных направлений совершенствования иммунопрофилактики полиомиелита, в том числе разработки вакцин на основе генетически модифицированных вакцинных штаммов вируса полиомиелита и вакцин, содержащих вирусоподобные частицы, являются дискуссионными и требуют решения в ближайшем будущем.

Литература/References

1. Minor PD. Live attenuated vaccines: historical successes and current challenges. *Virology*. 2015;479–480:379–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.032>
2. Melnick JL. My role in the discovery and classification of the enteroviruses. *Annu Rev Microbiol*. 1996;50:1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.1>
3. Simmonds P, Gorbalenya AE, Harvala H, Hovi T, Knowles NJ, Lindberg AM, et al. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Arch Virol*. 2020;165(3):793–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04520-6>
4. Guo H, Li Y, Liu G, Jiang Y, Shen S, Bi R, et al. A second open reading frame in human enterovirus determines viral replication in intestinal epithelial cells. *Nat Commun*. 2019;10:4066. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12040-9>
5. Lulla V, Dinan AM, Hosmillo M, Chaudhry Y, Sherry L, Irigoyen N, et al. An upstream protein-coding region in enteroviruses modulates virus infection in gut epithelial cells. *Nat. Microbiol*. 2019;4:280–92. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0297-1>
6. Agol VI, Gmyl AP. Emergency services of viral RNAs: repair and remodeling. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2018;82(2):e00067–17. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00067-17>
7. Domingo E, Perales C. Viral quasispecies. *PLoS Genet*. 2019;15(10):e1008271. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008271>
8. Harris KG, Coyne CB. Death waits for no man — does it wait for a virus? How enteroviruses induce and control cell death. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(5):587–96. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.08.002>
9. Chen YH, Du W, Hagemeijer MC, Takvorian PM, Pau C, Cali A, et al. Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses. *Cell*. 2015;160(4):619–30. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.032>

10. Leeks A, Sanjuán R, West SA. The evolution of collective infectious units in viruses. *Virus Res.* 2019;265:94–101. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.013>
11. Yang JE, Rossignol ED, Chang D, Zaia J, Forrester I, Raja K, et al. Complexity and ultrastructure of infectious extracellular vesicles from cells infected by non-enveloped virus. *Sci Rep.* 2020;10(1):7939. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64531-1>
12. Neverov A, Chumakov K. Massively parallel sequencing for monitoring genetic consistency and quality control of live viral vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(46):20063–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012537107>
13. Konz JO, Schofield T, Carlyle S, Wahid R, Ansari A, Strating JRPM, et al. Evaluation and validation of next-generation sequencing to support lot release for a novel type 2 oral poliovirus vaccine. *Vaccine X.* 2021;8:100102. <https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2021.100102>
14. Connor RI, Brickley EB, Wieland-Alter WF, Ackerman ME, Weiner JA, Modlin JF, et al. Mucosal immunity to poliovirus. *Mucosal Immunol.* 2022;15(1):1–9. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00428-0>
15. Ciapponi A, Bardach A, Rey Ares L, Glujovsky D, Cafferata ML, Cesaroni S, Bhatti A. Sequential inactivated (IPV) and live oral (OPV) poliovirus vaccines for preventing poliomyelitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;12(12):CD011260. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011260.pub2>
16. Li Li, Ivanova O, Driss N, Tiongo-Recto M, da Silva R, Shahmohmoodi S, et al. Poliovirus excretion among persons with primary immune deficiency disorders: summary of a seven-country study series. *J Infect Dis.* 2014;210(Suppl 1):S368–72. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu065>
17. Batson A, Federgruen A, Ganguly NK, Glassman A, Makoni S, Plotkin S. Polio eradication vaccine investment: how do we ensure polio vaccines are available to keep the world polio-free after transmission of wild poliovirus (wPV) has been interrupted? *BMJ Global Health.* 2021;6(11):e006447. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjgh-2021-006447>
18. Modlin JF, Bandyopadhyay AS, Sutter R. Immunization against poliomyelitis and the challenges to worldwide poliomyelitis eradication. *J Infect Dis.* 2021;224(Suppl 4):S398–404. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa622>
19. Duintjer Tebbens RJ, Thompson KM. Polio endgame risks and the possibility of restarting the use of oral poliovirus vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2018;17(8):739–51. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1506333>
20. Chumakov K, Ehrenfeld E, Agol VI, Wimmer E. Polio eradication at the crossroads. *Lancet Glob Health.* 2021;9(8):e1172–5. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(21\)00205-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00205-9)
21. Okayasu H, Sutter RW, Jafari HS, Takane M, Aylward RB. Affordable inactivated poliovirus vaccine: strategies and progress. *J Infect Dis.* 2014;210(Suppl 1):S459–64. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu128>
22. Jaiswal N, Singh S, Agarwal A, Chauhan A, Thumburu KK, Kaur H, Singh M. Equivalent schedules of intradermal fractional dose versus intramuscular full dose of inactivated polio vaccine for prevention of poliomyelitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;12(12):CD011780. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011780.pub2>
23. Anand A, Molodecky NA, Pallansch MA, Sutter RW. Immunogenicity to poliovirus type 2 following two doses of fractional intradermal inactivated poliovirus vaccine: a novel dose sparing immunization schedule. *Vaccine.* 2017;35(22):2993–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.008>
24. Sáez-Llorens X, Thierry-Carstensen B, Stoeck LS, Sørensen C, Wachmann H, Bandyopadhyay AS, et al. Immunogenicity and safety of an adjuvanted inactivated polio vaccine, IPV-AI, following vaccination in children at 2, 4, 6 and at 15–18 months. *Vaccine.* 2020;38(21):3780–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.02.066>
25. He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(2):477–88. <https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>
26. Kraan H, van Herpen P, Kersten G, Amorij JP. Development of thermostable lyophilized inactivated polio vaccine. *Pharm Res.* 2014;31(10):2618–29. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1359-6>
27. Tzeng SY, McHugh KJ, Behrens AM, Rose S, Sugarman JL, Ferber S, et al. Stabilized single-injection inactivated polio vaccine elicits a strong neutralizing immune response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(23):E5269–78. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1720970115>
28. Kolluru C, Gomaa Y, Prausnitz MR. Development of a thermostable microneedle patch for polio vaccination. *Drug Deliv and Transl Res.* 2019;9:192–203. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-00608-9>
29. Wan Y, Hickey JM, Bird C, Witham K, Fahey P, Forster A, et al. Development of stabilizing formulations of a trivalent inactivated poliovirus vaccine in a dried state for delivery in the Nanopatch™ microprojection array. *J Pharm Sci.* 2018;107(6):1540–51. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.01.027>
30. Muller DA, Henricson J, Baker, SB, Togö T, Flores CMJ, Lemaire PA, et al. Innate local response and tissue recovery following application of high density microarray patches to human skin. *Sci Rep.* 2020;10:18468. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75169-4>
31. Anand A, Zaman K, Estivariz CF, Yunus M, Gary HE, Weldon WC, et al. Early priming with inactivated poliovirus vaccine (IPV) and intradermal fractional dose IPV administered by a microneedle device: a randomized controlled trial. *Vaccine.* 2015;33(48):6816–22. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.039>
32. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(5):607–18. <https://doi.org/10.1586/erv.09.19>
33. Jordan I, Sandig V. Matrix and backstage: cellular substrates for viral vaccines. *Viruses.* 2014;6(4):1672–700. <https://doi.org/10.3390/v6041672>
34. Merten OW. Advances in cell culture: anchorage dependence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1661):20140040. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0040>
35. Jiang Y, van der Welle JE, Rubingh O, van Eikenhorst G, Bakker WAM, Thomassen YE. Kinetic model for ad-

- herent Vero cell growth and poliovirus production in batch bioreactors. *Process Biochem.* 2019;81:156–64. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.03.010>
36. Shen CF, Guilbault C, Li X, Elahi SM, Ansoorge S, Kamen A, Gilbert R. Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. *Vaccine.* 2019;37(47):6996–7002. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.003>
37. Andreani NA, Renzi S, Piovani G, Ajmone Marsan P, Bomba L, Villa R, et al. Potential neoplastic evolution of Vero cells: in vivo and in vitro characterization. *Cytotechnology.* 2017;69(5):741–50. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0082-7>
38. Osada N, Kohara A, Yamaji T, Hirayama N, Kasai F, Sekizuka T, et al. The genome landscape of the African green monkey kidney-derived Vero cell line. *DNA Research.* 2014;21(6):673–83. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>
39. van der Sanden SM, Wu W, Dybdahl-Sissoko N, Weldon WC, Brooks P, O'Donnell J, et al. Engineering enhanced vaccine cell lines to eradicate vaccine-preventable diseases: the polio end game. *J Virol.* 2015;90(4):1694–704. <https://doi.org/10.1128/JVI.01464-15>
40. Sanders BP, Oakes Ide L, van Hoek V, Liu Y, Marissen W, Minor PD, et al. Production of high titer attenuated poliovirus strains on the serum-free PER.C6⁺ cell culture platform for the generation of safe and affordable next generation IPV. *Vaccine.* 2015;33(48):6611–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.091>
41. Leroux-Roels I, Leroux-Roels G, Shukarev G, Schuitemaker H, Cahill C, de Rooij R, et al. Safety and immunogenicity of a new Sabin inactivated poliovirus vaccine candidate produced on the PER.C6⁺ cell-line: a phase 1 randomized controlled trial in adults. *Hum Vaccin Immunother.* 2021;17(5):1366–73. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1812315>
42. Verdijk P, Rots NY, Bakker WA. Clinical development of a novel inactivated poliomyelitis vaccine based on attenuated Sabin poliovirus strains. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(5):635–44. <https://doi.org/10.1586/erv.11.51>
43. Abd-Elghaffar AA, Rashed ME, Ali AE, Amin MA. In-Vitro inactivation of Sabin-polioviruses for development of safe and effective polio vaccine. *Vaccines.* 2020;8(4):601. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040601>
44. Tobin GJ, Tobin JK, Gaidamakova EK, Wiggins TJ, Bushnell RV, Lee WM, et al. A novel gamma radiation-inactivated sabin-based polio vaccine. *PLoS One.* 2020;15(1):e0228006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228006>
45. Thomassen YE, van 't Oever AG, van Oijen MG, Wijffels RH, van der Pol LA, Bakker WA. Next generation inactivated polio vaccine manufacturing to support post polio-eradication biosafety goals. *PLoS One.* 2013;8(12):e83374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083374>
46. Okayasu H, Sein C, Hamidi A, Bakker W, Sutter R. Development of inactivated poliovirus vaccine from Sabin strains: a progress report. *Biologicals.* 2016;44(6):581–7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.08.005>
47. Sutter RS, Okayasu H, Kieny M. Next generation inactivated poliovirus vaccine: the future has arrived. *Clin Infect Dis.* 2017;64(10):1326–7. <https://doi.org/10.1093/cid/cix116>
48. Jiang R, Liu X, Sun X, Wang J, Huang Z, Li C, et al. Immunogenicity and safety of the inactivated poliomyelitis vaccine made from Sabin strains in a phase IV clinical trial for the vaccination of a large population. *Vaccine.* 2021;39(9):1463–71. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.027>
49. Wang Y, Xu Q, Jeyaseelan V, Ying Z, Mach O, Sutter R, Wen N, et al. Immunogenicity of two-dose and three-dose vaccination schedules with Sabin inactivated poliovirus vaccine in China: an open-label, randomized, controlled trial. *Lancet Reg Health West Pac.* 2021;10:100133. <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2021.100133>
50. Piniaeva A, Ignatyev G, Kozlovskaya L, Ivin Y, Kovpak A, Ivanov A, et al. Immunogenicity and safety of inactivated Sabin-strain polio vaccine “PoliovacSin”: clinical trials phase I and II. *Vaccines.* 2021;9(6):565. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060565>
51. Modlin JF, Chumakov K. Sabin strain inactivated polio vaccine for the polio end-game. *J Infect Dis.* 2020;221(4):504–5. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz077>
52. Clements JD, Freytag LC. Parenteral vaccination can be an effective means of inducing protective mucosal responses. *Clin Vaccine Immunol.* 2016;23(6):438–41. <https://doi.org/10.1128/CI.00214-16>
53. Kraan H, Soema P, Amorij JP, Kersten G. Intranasal and sublingual delivery of inactivated polio vaccine. *Vaccine.* 2017;35(20):2647–53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.090>
54. Dietrich J, Andreasen LV, Andersen P, Agger EM. Inducing dose sparing with inactivated polio virus formulated in adjuvant CAF01. *PLoS One.* 2014;9(6):e100879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100879>
55. Norton EB, Bauer DL, Weldon WC, Oberste MS, Lawson LB, Clements JD. The novel adjuvant dmlT promotes dose sparing, mucosal immunity and longevity of antibody responses to the inactivated polio vaccine in a murine model. *Vaccine.* 2015;33(16):1909–15. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.02.069>
56. White JA, Blum JS, Hosken NA, Marshak JO, Duncan L, Zhu C, et al. Serum and mucosal antibody responses to inactivated polio vaccine after sublingual immunization using a thermoresponsive gel delivery system. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(12):3611–21. <https://doi.org/10.4161/hv.32253>
57. Ivanov AP, Dragunsky EM, Chumakov KM. 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances systemic and mucosal immune responses to inactivated poliovirus vaccine in mice. *J Infect Dis.* 2006;193(4):598–600. <https://doi.org/10.1086/499970>
58. Chan HT, Xiao Y, Weldon WC, Oberste SM, Chumakov K, Daniell H. Cold chain and virus-free chloroplast-made booster vaccine to confer immunity against different poliovirus serotypes. *Plant Biotechnol J.* 2016;14(11):2190–200. <https://doi.org/10.1111/pbi.12575>
59. Yeh MT, Bujaki E, Dolan PT, Smith M, Wahid R, Konz J, et al. Engineering the live-attenuated polio vaccine to prevent reversion to

- virulence. *Cell Host Microbe*. 2020;27(5):736–51.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.003>
60. Sanders BP, de Los Rios Oakes I, van Hoek V, Bockstal V, Kamphuis T, Uil TG, et al. Cold-adapted viral attenuation (CAVA): highly temperature sensitive polioviruses as novel vaccine strains for a next generation inactivated poliovirus vaccine. *PLoS Pathog*. 2016;12(3):e1005483. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005483>
61. Knowlson S, Burlison J, Giles E, Fox H, Macadam AJ, Minor PD. New strains intended for the production of inactivated polio vaccine at low-containment after eradication. *PLoS Pathog*. 2015;11(12):e1005316. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005316>
62. Fox H, Knowlson S, Minor PD, Macadam AJ. Genetically thermo-stabilised, immunogenic poliovirus empty capsids; a strategy for non-replicating vaccines. *PLoS Pathog*. 2017;13(1):e1006117. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006117>
63. Bahar MW, Porta C, Fox H, Macadam AJ, Fry EE, Stuart DI. Mammalian expression of virus-like particles as a proof of principle for next generation polio vaccines. *NPI Vaccines*. 2021;6(1):5. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00267-3>
64. Viktorova EG, Khattar SK, Kouliavskaya D, Laassri M, Zagorodnyaya T, Dragunsky E, et al. Newcastle disease virus-based vectored vaccine against poliomyelitis. *J Virol*. 2018;92(17):e00976–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00976-18>
65. Chan RWY, Liu S, Cheung JY, Tsun JGS, Chan KC, Chan KY, et al. The mucosal and serological immune responses to the novel coronavirus (SARS-CoV-2) vaccines. *Front Immunol*. 2021;12:744887. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744887>
66. Pardi N, Hogan M, Porter F, Weissman D, et al. mRNA vaccines – a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(4):261–79. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>

Вклад авторов. *Е.Э. Евреинова* – обработка и анализ данных литературы, написание текста рукописи; *Л.М. Хантимирова* – дизайн статьи, обработка и анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; *В.А. Шевцов* – анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; *В.А. Меркулов* – критическое обсуждение текста рукописи, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; *В.П. Бондарев* – интерпретация результатов аналитического исследования, критическое обсуждение текста рукописи.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 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».

Authors' contributions. *E.E. Evreinova*—review and analysis of literature data and drafting of the paper; *L.M. Khantimirova*—elaboration of the study design, review and analysis of literature data, editing of the paper; *V.A. Shevtsov*—analysis of literature data and editing of the paper; *V.A. Merkulov*—revision of the paper and approval of the final version for publication; *V.P. Bondarev*—interpretation of the study results and revision of the paper.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Conflict of interest. V.A. Merkulov is the Editor-in-chief of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. V.P. Bondarev is the Deputy Editor-in-chief of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Еврейнова Елена Эдуардовна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3250-0937>

Хантимирова Лейсан Маратовна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6269-0201>

Khantimirova@expmed.ru

Шевцов Владимир Александрович, канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7164-2890>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

merkulov@expmed.ru

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Bondarev@expmed.ru

Elena E. Evreinova, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3250-0937>

Leysan M. Khantimirova, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6269-0201>

Khantimirova@expmed.ru

Vladimir A. Shevtsov, Cand. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7164-2890>

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

merkulov@expmed.ru

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Bondarev@expmed.ru

Поступила 16.02.2021

После доработки 15.02.2022

Принята к публикации 11.03.2022

Online first 30.05.2022

Received 16 February 2021

Revised 15 February 2022

Accepted 11 March 2022

Online first 30 May 2022

УДК604: 615.371:615.07

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-154-169>

Обзорная статья | Review article



Перспективы применения метода ионной хроматографии в оценке качества биологических лекарственных препаратов

А.С. Минеро , О.Б. Рунова, О.Б. Устинникова, А.А. Мовсисянц

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

✉ Минеро Анастасия Сальвадоровна; minero@expmed.ru

Резюме

Количественная характеристика вспомогательных веществ, входящих в состав биологических лекарственных препаратов (БЛП), является важной составляющей процесса подтверждения качества как на уровне готового продукта, так и на стадиях промежуточных продуктов, в том числе фармацевтических субстанций. Метод ионной хроматографии с амперометрическим и кондуктометрическим способами детектирования продуктов разделения обладает рядом достоинств, основным из которых является возможность прямого определения малолетучих соединений, не имеющих хромофорных групп и не обладающих собственной флуоресценцией. Цель работы — на основании сравнительного анализа метода ионной хроматографии и альтернативных методов определить перспективные области применения метода ионной хроматографии в оценке качества БЛП. На основании результатов проведенного анализа нормативной документации и данных литературы обобщены методы количественного определения вспомогательных веществ с ионной структурой в БЛП. Рассмотрены возможности применения метода ионной хроматографии для определения основного действующего вещества в полисахаридных вакцинах и вспомогательных веществ в БЛП. Показана целесообразность применения метода ионной хроматографии для одновременного количественного определения катионов (аммоний, кальций, магний) и анионов (хлориды, сульфаты, нитраты) в растворителе для лиофилизированных БЛП, для оценки качества действующего вещества БЛП (количественное определение полисахарида в полисахаридных вакцинах, гликопрофиль гликозилированных протеинов и т.д.), а также при определении нескольких стабилизаторов углеводной природы БЛП одной методикой. Сделан вывод, что ионообменная хроматография с кондуктометрическим и амперометрическим детектированием при оценке качества БЛП в ближайшей перспективе может занять лидирующие позиции в количественной оценке вспомогательных веществ с ионной структурой, стабилизаторов углеводной природы и основного действующего вещества — полисахарида в полисахаридных вакцинах, в том числе вакцинах национального календаря профилактических прививок.

Ключевые слова: ионная хроматография; ионообменная ВЭЖХ; биологические лекарственные препараты; полисахаридные вакцины; углеводы; кондуктометрическое и амперометрическое детектирование

Для цитирования: Минеро А.С., Рунова О.Б., Устинникова О.Б., Мовсисянц А.А. Перспективы применения метода ионной хроматографии в оценке качества биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):154–169. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-154-169>

Prospects for ion chromatography in quality assessment of biologicals

A.S. Minero ✉, O.B. Runova, O.B. Ustinnikova, A.A. Movsesyants

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

✉ Anastasia S. Minero; minero@expmed.ru

Abstract

Quantitative characterisation of excipients in biologicals is an important part of the quality assurance process both at the level of finished products and intermediates, as well as active pharmaceutical ingredients. Ion chromatography with amperometric and conductometric detection of separation products has a number of advantages. The main of the advantages is the possibility of direct determination of semivolatile compounds that have neither chromophoric groups, nor intrinsic fluorescence. The aim of this study was to compare ion chromatography with alternative methods in order to identify promising areas for its use in assessing the quality of biologicals. The authors analysed regulatory documents and literature and summarised the methods applied for quantitative determination of ionic excipients in biological medicinal products. The authors investigated the possibility of using ion chromatography for determination of the main active pharmaceutical ingredient in polysaccharide vaccines and excipients in biologicals. The study demonstrated the feasibility of ion chromatography for simultaneous quantitation of cations (ammonium, calcium, magnesium) and anions (chlorides, sulfates, nitrates) in reconstitution solvents for lyophilised biologicals; quality assessment of active pharmaceutical ingredients in biologicals (quantitative analysis of polysaccharides in polysaccharide vaccines, profiling of glycosylated proteins, etc.); and determination of several carbohydrate stabilisers in biologicals with the same analytical procedure. According to the conclusions, ion-exchange chromatography with conductometric and amperometric detection, aimed at quality assessment of biological products, can shortly take a leading position in quantitation of ionic excipients, carbohydrate stabilisers, and main active ingredients (polysaccharides) in polysaccharide vaccines, including the vaccines in the immunisation schedule.

Key words:

ion chromatography; ion-exchange HPLC; biologicals; polysaccharide vaccines; carbohydrates; conductometric and amperometric detection

For citation:

Minero A.S., Runova O.B., Ustinnikova O.B., Movsesyants A.A. Prospects for ion chromatography in quality assessment of biologicals. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):154–169. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-154-169>

Введение

Метод ионной хроматографии был разработан в 1975 г. [1] и за короткое время из способа детектирования небольшого числа ионов превратился в самостоятельный вид анализа [2]. Ион-парная ВЭЖХ, ион-эксклюзионная ВЭЖХ, ионообменная ВЭЖХ с последующим УФ- или флуориметрическим детектированием продуктов разделения применяется при оценке качества биологических лекарственных препаратов (БЛП) достаточно давно [3–16]. Также в последние годы в нормативной документации на БЛП представлены методики ионной хроматографии с кондуктометрическим или амперометрическим детектированием.

Достоинством кондуктометрического и амперометрического детекторов в хроматографи-

ческом анализе является возможность их использования для прямого высокоселективного определения малолетучих соединений, не имеющих хромофорных групп и не обладающих собственной флуоресценцией.

Цель работы – на основании сравнительного анализа метода ионной хроматографии и альтернативных методов определить перспективные области применения данного метода ионной хроматографии в оценке качества БЛП.

Важным аспектом разработки современных лекарственных препаратов является не только изучение свойств основного действующего компонента, но и научно обоснованный выбор вспомогательных веществ, предназначенных для формирования, конструирования

лекарственных форм и терапевтических систем, а также для обеспечения стабильности. Вспомогательные вещества должны обеспечивать надлежащий фармакологический эффект и фармакокинетические параметры лекарственного препарата [17, 18].

В статье представлены результаты проведенного анализа нормативной документации и данных литературы.

Применение метода ионной хроматографии для определения вспомогательных веществ с ионной структурой

В настоящее время метод ионной хроматографии с подавлением фоновой проводимости и последующим кондуктометрическим детектированием используется рядом зарубежных производителей БЛП для количественного определения вспомогательных веществ с ионной структурой, таких как натрия хлорид, каприловая кислота, а также катионы и анионы в растворителе для лиофилизированных препаратов. Однако количественная оценка вспомогательных веществ с ионной структурой отличается большим методическим разнообразием и метод ионной хроматографии – пока не самое распространенное решение (табл. 1).

На основе информации, представленной в таблице 1, можно предположить, что методическое разнообразие оценки количественного содержания вспомогательных веществ с ионной структурой обусловлено отсутствием фармакопейных методик и необходимостью использования высокотехнологичного оборудования, уже имеющегося на предприятии.

Инструментальные достоинства метода ионной хроматографии с кондуктометрическим детектированием очевидны: небольшой расход анализируемого соединения (около 0,3 мл); простая пробоподготовка, предполагающая разведение испытуемого образца и при необходимости исключение белка; короткое время анализа (около 10 мин); возможность использования подвижных фаз, не требующих доведения pH; автоматизированный процесс всей последовательности анализа, что обеспечивает полную прослеживаемость результатов. Кроме того, существенным конструктивным достоинством современных ионных хроматографов является возможность одновременного детектирования анионов и катионов, а также автоматизированного генерирования элюентов, что исключает стадию приготовления подвижной фазы и работу с концентрированными едкими растворами.

Таким образом, использование метода ионной хроматографии для определения вспомогательных веществ с ионной структурой, в силу высокой стоимости оборудования и необходимости наличия высококвалифицированных кадров, экономически целесообразно для крупномасштабных производств, имеющих широкую линейку продукции, где затраты на закупку, обслуживание и персонал окупаются поточной загрузкой оборудования.

Применение метода ионной хроматографии для определения основного действующего вещества в полисахаридных вакцинах и вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах

Метод ионной хроматографии с последующим амперометрическим детектированием применяют для определения так называемых электроактивных веществ, обладающих низкой проводимостью, но способных окисляться или восстанавливаться на поверхности электрода. К таким соединениям относятся, например, аминокислоты, углеводы, амины, полиолы. Впервые амперометрический детектор для ВЭЖХ был предложен в 1973 г. для определения катехоламинов в биологических жидкостях [19]. Но, несмотря на длительную историю применения, данный метод не стал самым распространенным в оценке качества лекарственных средств. Максимально полная спецификация на готовый продукт, включающая количественное определение вспомогательных веществ, – сравнительно новая тенденция в контроле качества БЛП. Кроме того, в прошлом данный метод анализа характеризовался плохой воспроизводимостью, поскольку на поверхности электрода оставались продукты окисления аналитов, которые приходилось удалять вручную после каждой инъекции. Современная конструкция детекторов позволяет автоматически чередовать напряжение на электроде, предполагает автоматическую его очистку и восстановление, что существенно повышает воспроизводимость методик.

Также следует отметить, что для анализа состава углеводных смесей существует много других методов, например газовая хроматография с пламенно-ионизационной детекцией [20, 21], ВЭЖХ с флуориметрическим и УФ-детектированием, капиллярный электрофорез. В сравнении с данными методами ионообменная хроматография с импульсным амперометрическим детектированием является менее трудозатратной. В данном методе применяется стандартная пробоподготовка

Таблица 1. Методы количественного определения вспомогательных веществ с ионной структурой в биологических лекарственных препаратах
Table 1. Methods for quantitative determination of excipients with ionic structure in biological medicinal products

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) <i>Biological product name (INN or generic name)</i>	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Наименование показателя по спецификации <i>Specification parameter</i>	Метод определения <i>Test method</i>
1	Сепротин® (протеин С человеческого) <i>Cerprotin® (Human protein C)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>
2	Антитромбин III человеческого (анти-тромбин III) <i>Antithrombin III, human (Antithrombin III)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>
3	Протромплес 600 (Факторы свертывания крови II, VII, IX и X в комбинации [Протромбиновый комплекс]) <i>Prothromplex 600 (Coagulation factors II, VII, IX and X in combination [Prothrombin complex])</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>
4	Идельвион® (Албутрепенонаког альфа) <i>Idelvion® (Albutrepenonacog-alpha)</i>	СиЭл БERING ГмбХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Нитраты ^а <i>Nitrates^a</i>	Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>
			Хлориды ^а <i>Chlorides^a</i>	
			Сульфаты ^а <i>Sulfates^a</i>	
			Аммоний ^а <i>Ammonium^a</i>	
			Кальций и магний ^а <i>Calcium and magnesium^a</i>	
			Натрия цитрат <i>Sodium citrate</i>	Фотометрический <i>Photometry</i>
5	Фейба® (Антиингибиторный коагулянтный комплекс) <i>Feiba® (Anti-inhibitor coagulant complex)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>
6	Альбумин человеческого (альбумин человека) <i>Human albumin (Human albumin)</i>	Бакстер АГ <i>Baxter, AG</i>	Каприловая кислота <i>Caprylic acid</i>	Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) <i>Biological product name (INN or generic name)</i>	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Наименование показателя по спецификации <i>Specification parameter</i>	Метод определения <i>Test method</i>
7	Коаглекс (Факторы свертывания крови II, VII, IX и X в комбинации [Протромбиновый комплекс]) <i>Coaglex (Coagulation factors II, VII, IX and X in combination [Prothrombin complex])</i>	СиЭсЭл Беринг ГмбХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i> Нитраты ^а <i>Nitrates^a</i> Хлориды ^а <i>Chlorides^a</i> Сульфаты ^а <i>Sulfates^a</i> Аммоний ^а <i>Ammonium^a</i> Кальций и магний ^а <i>Calcium and magnesium^a</i>	Аргентометрический <i>Argentometry</i> Ионная хроматография <i>Ion chromatography</i>
8	Полисахаридная менингококковая вакцина А+С <i>Meningococcal polysaccharide vaccine, groups A and C combined</i>	Санофи Пастер С.А. <i>Sanofi Pasteur, S.A.</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Титриметрический <i>Titrimetry</i>
9	Вилате® Нео (Фактор свертывания крови VIII + фактор Виллебранда) <i>Wilate® Neo (Coagulation factor VIII + von Willebrand factor)</i>	Октафарма Фармацевтика Продукт-онгес мбХ <i>Octapharma Pharmazeutika Produktionsgesellschaft, mbH</i>	Натрий <i>Sodium</i> Кальций <i>Calcium</i> Цитрат <i>Citrate</i>	Атомно-эмиссионная спектрометрия <i>Atomic emission spectrometry</i> Абсорбционная спектрофотометрия в УФ и видимой области <i>UV-visible absorption spectrophotometry</i>
10	АФСТИЛА® (Лонотокког альфа) <i>AFSTYLA® (Lonotocog alfa)</i>	СиЭсЭл Беринг ГмбХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Хлориды <i>Chlorides</i> Натрий <i>Sodium</i> Кальций <i>Calcium</i>	Потенциометрическое титрование <i>Potentiometric titration</i> Атомно-абсорбционная спектрометрия <i>Atomic absorption spectrometry</i>
11	Габриглобин (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Gabriglobine (Human normal immunoglobulin)</i>	ГУЗ «Ивановская областная станция переливания крови» <i>Ivanovo Regional Blood Transfusion Station</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Пламенная фотометрия <i>Flame photometry</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) <i>Biological product name (INN or generic chemical name)</i>	Наименование держателя или владельца БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Наименование показателя по спецификации <i>Specification parameter</i>	Метод определения <i>Test method</i>
12	Октагам (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Octagam (Human normal immunoglobulin)</i>	Октафарма Фармацевтика Продуктсионгес мбХ <i>Octapharma Pharmazeutika Produktionsgesellschaft, mbH</i>	Натрий <i>Sodium</i> Калий <i>Potassium</i> Алюминий <i>Aluminium</i> Хлориды <i>Chlorides</i>	Пламенная фотометрия <i>Flame photometry</i> Атомно-адсорбционная спектрометрия <i>Atomic absorption spectrometry</i> Потенциометрическое титрование <i>Potentiometric titration</i>
13	Флебогамма® 5% ДИФ (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Flebogamma® DIF, 5% (Human normal immunoglobulin)</i>	Института Грифолз, С.А. <i>Instituto Grifols, S.A.</i>	Ацетат <i>Acetate</i>	УФ-спектрофотометрический <i>UV spectrophotometry</i>
14	Хиберикс® (Вакцина для профилактики инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenza</i> тип b гемофильной) <i>Hiberix® (Prophylactic vaccine against Haemophilus influenzae type b)</i>	АО «ГласкоСмитКлайн Трейдинг» <i>GlaxoSmithKline Trading, AO</i>	Хлориды ^а <i>Chlorides^a</i>	Аргентометрическое титрование (обратный способ) <i>Argentometric titration (back titration)</i>
15	Адвейт® (Октоког альфа) <i>Advate® (Octocog alfa)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Натрий <i>Sodium</i> Кальций <i>Calcium</i>	Атомная эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой <i>Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry</i>
16	НовоСэвен® (Эптаког альфа [активированный]) <i>NovaSeven® (Eptacog alfa [activated])</i>	Ново Нордиск А/С <i>Novo Nordisk, A/S</i>	Кальций <i>Calcium</i>	Атомно-адсорбционная спектрометрия <i>Atomic absorption spectrometry</i>
17	Когенэйт ФС (Октоког альфа) <i>Kogenate FS (Octocog alfa)</i>	Байер Хелскэр ЛЛС <i>Bayer HealthCare, LLC</i>	Натрий <i>Sodium</i> Хлориды <i>Chlorides</i> Кальций <i>Calcium</i>	Пламенная фотометрия <i>Flame photometry</i> Титриметрия <i>Titrimetry</i> Атомно-адсорбционная спектрометрия <i>Atomic absorption spectrometry</i>
18	Октофактор® (Мороктоког альфа) <i>Octofactor® (Morococog alfa)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Кальция хлорид <i>Calcium chloride</i> Натрия хлорид ^е <i>Sodium chloride^e</i>	Спектрофотометрия атомно-адсорбционная <i>Atomic absorption spectrophotometry</i> Титриметрический <i>Titrimetry</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) <i>Biological product name (INN or generic (chemical) name)</i>	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Наименование показателя по спецификации <i>Specification parameter</i>	Метод определения <i>Test method</i>
19	Рефакто АФ (Мороктоког альфа) <i>ReFacto AF (Moroctocog alfa)</i>	Пфайзер Инк <i>Pfizer, Inc.</i>	Кальция хлорида дигидрат <i>Calcium chloride dihydrate</i>	Атомно-абсорбционная спектроскопия <i>Atomic absorption spectroscopy</i>
20	Нувик (Симоктоког альфа (фактор свертывания крови VIII человека рекомбинантный)) <i>Nuwiq (Simoctocog alfa (recombinant human coagulation factor VIII))</i>	Октафарма АБ <i>Octapharma, AB</i>	Цитрат <i>Citrate</i> Натрий <i>Sodium</i>	ВЭЖХ <i>HPLC</i> Атомно-эмиссионная спектрофотометрия <i>Atomic emission spectrophotometry</i>
			Кальций <i>Calcium</i>	Спектрофотометрический <i>Spectrophotometry</i>
			Хлорид <i>Chloride</i>	Потенциометрическое титрование <i>Potentiometric titration</i>
			Хлориды ^а <i>Chlorides^a</i>	Качественная реакция <i>Qualitative reaction</i>
			Нитраты ^а <i>Nitrates^a</i>	Колориметрический <i>Colourimetry</i>
			Сульфаты ^а <i>Sulfates^a</i>	Качественная реакция <i>Qualitative reaction</i>
			Аммоний ^а <i>Ammonium^a</i>	Колориметрический <i>Colourimetry</i>
			Кальций и магний ^а <i>Calcium and magnesium^a</i>	Качественная реакция <i>Qualitative reaction</i>
21	Бенефикс® (Нонаког альфа) <i>BeneFIX® (Nonacog alfa)</i>	ООО «Вайет» <i>Wyeth, OOO</i>	Натрия хлорид <i>Sodium chloride</i>	Качественная реакция <i>Qualitative reaction</i>

Примечание. БЛП — биологический лекарственный препарат; МНН — международное непатентованное наименование.

^а В растворителе для лиофилизированных БЛП.

Note: INN — international nonproprietary name.

^а The parameter is for solvents for lyophilised biologicals.

образца (гидролиз, твердофазная экстракция, разведение и т.д.), в то время как все вышеперечисленные техники требуют дополнительной стадии, а именно предварительной дериватизации углеводов [22]. Так, например, поскольку моносахариды являются нелетучими соединениями, разделение их смесей методом газожидкостной хроматографии возможно после получения летучих триметилсилильных производных [20, 21].

Известно, что в основном растворе углеводы способны ионизироваться [23]. Внедрение стационарных фаз на основе полимеров, обеспечивающих стабильность в широком диапазоне pH, способствовало разработке универсального и эффективного метода разделения углеводов и родственных соединений. Так, в 1988 г. ионная хроматография с импульсным амперометрическим детектированием была впервые применена для определения содержания моносахаридов в гликозилированных белках [24]. Было отмечено основное достоинство метода: хорошая чувствительность без использования пред- и постколоночной дериватизации. Сегодня ионную хроматографию с пульсирующим амперометрическим детектированием используют для анализа углеводной части гликопротеинов наряду с гидрофильной ВЭЖХ и капиллярным электрофорезом, при этом капиллярный электрофорез предполагает флуорометрическое детектирование олигосахаридов, предварительно дериватизированных флуорофором [25].

В оценке качества БЛП ионообменную хроматографию с амперометрическим детектированием применяют наряду с другими методами количественного определения вспомогательных веществ (аминокислот, углеводов, полиолов) и основного действующего вещества — полисахарида в полисахаридных поливалентных вакцинах (табл. 2).

Для определения таких вспомогательных веществ БЛП, как аминокислоты, моно- и дисахаридные стабилизаторы (табл. 2), чаще используют альтернативные методы, чем ионную ВЭЖХ. Анионообменная ВЭЖХ с импульсным амперометрическим детектированием в основном используется только зарубежными производителями.

Особое значение ионообменная хроматография приобретает в оценке качества полисахаридных вакцин. Количественное определение основного действующего вещества на стадии готового продукта является обязательным для всех БЛП, к которым относятся вакцины, созданные на основе очищенных бактериальных полисахаридов. Такие вакцины могут быть моно- и поливалентными, т.е. содержать полисахарид одного или нескольких серотипов.

Моновалентные вакцины можно отнести к полисахаридным вакцинам первого поколения, количественная оценка действующего вещества которых проводилась расчетным методом по структурным элементам. Так, например, в менингококковой вакцине, содержащей полисахарид серотипа А, количественная оценка возможна по содержанию фосфора, а в менингококковой вакцине, содержащей полисахариды серотипов А и С, — по фосфору и сиаловой кислоте соответственно. Однако с появлением четырехвалентной менингококковой вакцины, состоящей из серотипов А, С, Y и W-135, данный подход перестает быть селективным, поскольку в состав полисахаридов Y и W-135 также входит сиаловая кислота.

Кроме того, количественное определение полисахарида расчетными методами имеет еще один существенный недостаток: длительная и трудоемкая стадия пробоподготовки, в некоторых случаях включающая препаративное хроматографическое разделение полисахаридов и обессоливание.

Альтернативной расчетному методу может служить иммунохимическое количественное определение полисахаридов в составе поливалентных вакцин. Метод иммунохимической нефелометрии отличается высокой селективностью и точностью, единственным недостатком которого является необходимость наличия специфических иммунохимических реагентов: иммунохимических антисывороток и стандартов, индивидуальных для полисахарида каждого серотипа. Этот метод применяют для количественной оценки полисахаридов каждого серотипа в поливалентных пневмококковых вакцинах, содержащих 13 или 23 серотипа пневмококкового полисахарида [26].

Метод ионной хроматографии с амперометрическим детектированием позволяет количественно определить полисахарид каждой серогруппы в четырехвалентной менингококковой вакцине благодаря относительно простой структуре каждого полисахарида — либо гомополимер: полисахарид серогруппы А (состоит из повторяющихся фрагментов N-ацетилманнозамина, связанных $1\alpha \rightarrow 6$ фосфодиэфирными связями) и полисахарид серогруппы С (состоит из повторяющихся фрагментов сиаловой кислоты, связанных $2\alpha \rightarrow 9$ гликозидными связями), либо дисахарид из повторяющихся единиц: полисахарид серогруппы Y (состоит из чередующихся фрагментов сиаловой кислоты и D-глюкозы, связанных $2\alpha \rightarrow 6$ и $1\alpha \rightarrow 4$ гликозидными связями) и полисахарид серогруппы W-135 (состоит из чередующихся фрагментов сиаловой кислоты

Таблица 2. Методы определения основного действующего вещества в полисахаридных вакцинах и вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах
Table 2. Methods for the determination of the main active ingredient in polysaccharide vaccines and excipients in biologicals

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) ^а <i>Biological product name (INN or generic (chemical) name)^a</i>	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Определяемое соединение <i>Analyte</i>	Метод определения <i>Test method</i>
Определение основного действующего вещества в полисахаридных вакцинах <i>Determination of the main active ingredient in polysaccharide vaccines</i>				
1	Пентаксим® (вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> тип b, конъюгированная) <i>Pentaxim® (Diphtheria and tetanus (adsorbed), pertussis (acellular), poliomyelitis (inactivated) and Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine)</i>	Санофи Пастер С.А. <i>Sanofi Pasteur, S.A.</i>	Свободный полисахарид полирибозил-рибитол-фосфат <i>Free polysaccharide polyribosyl ribitol phosphate</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
2	Инфанрикс® Гекса (Вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), полиомиелита (инактивированная), гепатита В комбинированная, адсорбированная в комплексе с вакциной для профилактики инфекции, вызываемой <i>Haemophilus influenzae</i> тип b конъюгированной, адсорбированной) <i>Infanrix® Hexa (Diphtheria, tetanus, pertussis (acellular), poliomyelitis (inactivated), hepatitis B (combined, adsorbed) and Haemophilus influenzae type b (adsorbed) conjugate vaccine)</i>	АО «ГлаксосмитКляйн Трейдинг» <i>GlaxoSmithKline Trading, AO</i>	Полисахарид <i>Haemophilus influenzae</i> тип b <i>Haemophilus influenzae type b polysaccharide</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
3	МЕНАКТРА® [вакцина менингококковая полисахаридная (серогрупп А, С, Y и W-135), конъюгированная с дифтерийным анатоксином] <i>МЕНАКТРА® [Meningococcal (serogroups A, C, Y and W-135) polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccine]</i>	Санофи Пастер Инк. <i>Sanofi Pasteur, Inc.</i>	Полисахарид <i>Neisseria meningitidis</i> серогрупп А, С, W-135, Y <i>Neisseria meningitidis serogroup A, C, W-135, Y polysaccharide</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
4	МЕНВЕО (Вакцина менингококковая олигосахаридная конъюгированная серогрупп А, С, W-135, Y) <i>МЕНВЕО (Meningococcal (serogroups A, C, W-135, and Y) oligosaccharide conjugate vaccine)</i>	АО «ГлаксосмитКляйн Трейдинг» <i>GlaxoSmithKline Trading, AO</i>	Сахарид (маннозамин-6-фосфат) <i>Saccharide (mannosamine-6-phosphate)</i> Олигосахариды <i>Neisseria meningitidis</i> серогрупп С, W-135, Y <i>Neisseria Meningitidis serogroup C, W-135, Y oligosaccharides</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

5	Полисахаридная менингококковая вакцина A+C <i>Polysaccharide meningococcal vaccine A+C</i>	Санофи Пастер С.А. <i>Sanofi Pasteur, S.A.</i>	Полисахарид <i>Neisseria meningitidis</i> серогруппы A <i>Neisseria meningitidis serogroup A polysaccharide</i>	Расчетный метод по содержанию фосфора <i>Phosphorus assay</i>
6	МенингоВак А+С (вакцина менингококковая групп А и С полисахаридная) <i>MeningoVac A + C (Meningococcal (serogroups A and C) polysaccharide vaccine)</i>	АО «НПО «Микроген» <i>SIC Microgen, JSC</i>	Полисахарид <i>Neisseria meningitidis</i> серогруппы C <i>Neisseria meningitidis serogroup C polysaccharide</i>	Расчетный метод по содержанию сиаловой кислоты <i>Sialic acid assay</i>
7	Превенар® 13 (Вакцина пневмококковая полисахаридная конъюгированная адсорбированная тринадцативалентная) <i>Prevenar® 13 (13-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine, adsorbed)</i>	ООО «Вайет» <i>Wyeth, ООО</i>	Полисахарид <i>Neisseria meningitidis</i> серогруппы C <i>Neisseria meningitidis serogroup C polysaccharide</i>	Расчетный метод по содержанию сиаловой кислоты <i>Sialic acid assay</i>
8	Синфлорикс (Вакцина 10-валентная пневмококковая полисахаридная, конъюгированная с D-протеином нетипируемой <i>Haemophilus influenzae</i> , столбнячным и дифтерийным анатоксинами, адсорбированная) <i>Synflorix (10-valent pneumococcal conjugate vaccine (non-typeable Haemophilus influenzae protein D, diphtheria and tetanus toxoid conjugates), adsorbed)</i>	АО «ГласкоСмитКляйн Трейдинг» <i>GlaxoSmithKline Trading, AO</i>	Полисахариды <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae polysaccharides</i>	Кинетическая нефелометрия <i>Kinetic nephelometry</i>
9	Пневмовакс® 23 (Вакцина пневмококковая, поливалентная) <i>Pneumovax® 23 (Polyvalent pneumococcal vaccine)</i>	Мерк Шарп и Доум Б.В. <i>Merck Sharp and Dohme, B.V.</i>	Полисахариды <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae polysaccharides</i>	Кинетическая нефелометрия <i>Kinetic nephelometry</i>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) ^a <i>Biological product name (INN or generic (chemical) name)^a</i>	Наименование держателя или владельца БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Определяемое соединение <i>Analyte</i>	Метод определения <i>Test method</i>
Определение вспомогательных веществ <i>Determination of excipients</i>				
1	АФСТИЛА® (Лоноткоког альфа) <i>AFSTYLA® (Lonotocog alfa)</i>	СиЭсЭл Беринг ГмбХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Гистидин <i>Histidine</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
2	Вилате® Нео (Фактор свертывания крови VIII + фактор Виллебранда) <i>Wilate® Neo Coagulation factor VIII + von Willebrand factor</i>	Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес мбХ <i>Octapharma Pharmazeutika Produktionsgesellschaft, mbH</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Фотометрический <i>Photometry</i>
3	Идельвион® (Албутрепенаког альфа) <i>Idelvion® (Albutreponacog-alfa)</i>	СиЭсЭл Беринг ГмбХ CSL <i>CSL Behring, GmbH</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
4	Октагам (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Octagam (Human normal immunoglobulin)</i>	Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес м.б.Х. <i>Octapharma Pharmazeutika Produktionsgesellschaft, mbH</i>	Мальтоза <i>Maltose</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
5	Пентаксим® (вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная и инфекций, вызываемых <i>Haemophilus influenzae</i> тип b, конъюгированная) <i>Pentaxim® (Diphtheria and tetanus (adsorbed), pertussis (acellular), poliomyelitis (inactivated) and Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine)</i>	Санофи Пастер С.А. <i>Sanofi Pasteur, S.A.</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Поляриметрический <i>Polarimetry</i>
6	МЕНВЕО (Вакцина менингококковая олигосахаридная конъюгированная серогрупп ACW135Y) <i>MENVEO (Meningococcal (serogroups A, C, W-135, and Y) oligosaccharide conjugate vaccine)</i>	АО «ГласкоСмитКляйн Трейдинг» <i>GlaxoSmithKline Trading, AO</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Спектрофотометрический <i>Spectrophotometry</i>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

7	Бериате® (Фактор свертывания крови VIII) <i>Beriate® (Coagulation factor VIII)</i>	СиЭсЭл Беринг ГмбХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Глицин <i>Glycine</i>	Метод Кельдаля <i>Kjeldahl method</i>
8	Иммуновенин® (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Immunovenin® (Human normal immunoglobulin)</i>	АО «НПО «Микроген» <i>SIC Microgen, JSC</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Ферментативный <i>Photometry</i>
9	Пентаглобин (Иммуноглобулин человека нормальный [IgG+IgM+IgGAI]) <i>Pentaglobin (Human normal immunoglobulin [IgG+IgM+IgGAI])</i>	Биотест Фарма ГмбХ <i>Biotech Pharma, GmbH</i>	Декстроза <i>Maltose</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>
10	Полисахаридная менингококковая вакцина А+С <i>Polysaccharide meningococcal vaccine A+C</i>	Санофи Пастер С.А. <i>Sanofi Pasteur, S.A.</i>	Глицин <i>Glycine</i>	ВЭЖХ с постолонной дериватизацией и спектрофотометрическим детектированием <i>HPLC with post-column derivatisation and spectrophotometric detection</i>
11	МенингоВак А+С (Вакцина менингококковая групп А и С полисахаридная) <i>MeningoVac A+C (Meningococcal serogroups A and C polysaccharide vaccine)</i>	Биотест Фарма ГмбХ <i>Biotech Pharma, GmbH</i>	Глюкоза <i>Glucose</i>	Спектрофотометрический метод с антроновым реактивом или ферментативный метод <i>Spectrophotometry with anthrone reagent or enzymatic determination</i>
12	Имбиглобулин (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Imbiglobulin (Human normal immunoglobulin)</i>	Санофи Пастер С.А. <i>Sanofi Pasteur, S.A.</i>	Лактоза <i>Lactose</i>	Спектрофотометрический ферментативный метод <i>Spectrophotometry Enzymatic determination</i>
13	Монолайн® (Фактор свертывания крови IX) <i>Monoline® (Coagulation factor IX)</i>	АО «НПО «Микроген» <i>SIC Microgen, JSC</i>	Лактоза <i>Lactose</i>	Рефрактометрический <i>Refractometry</i>
14	Инфликсимаб (Инфликсимаб) <i>Infliximab (Infliximab)</i>	АО «НПО «Микроген» <i>SIC Microgen, JSC</i>	Мальтоза <i>Maltose</i>	Титриметрический (модифицированный метод Хагедорна—Йенсена) <i>Titrimetry (modified Hagedorn-Jensen method)</i>
15	Лейцита® (Филграстим) <i>Leicita® (Filgrastim)</i>	СиЭсЭл Беринг ГмбХ <i>CSL Behring, GmbH</i>	Гистидин <i>Histidine</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
16	Эмплицити® (Элотузумаб) <i>Empliciti® (Elotuzumab)</i>	ЗАО «Биокад» <i>Biocad, JSC</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>
17	Лейцита® (Филграстим) <i>Leicita® (Filgrastim)</i>	ООО «Сигардис Рус» <i>Sigardis Rus, OOO</i>	Сорбитол <i>Sorbitol</i>	ВЭЖХ с спектрофотометрическим детектированием <i>HPLC with spectrophotometric detection</i>
18	Эмплицити® (Элотузумаб) <i>Empliciti® (Elotuzumab)</i>	Бристол-Майерс Сквибб Компани <i>Bristol-Myers Squibb Company</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	ВЭЖХ с испарительным детектором светорассеяния <i>HPLC with evaporative light scattering detection</i>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

№ п/п	Наименование БЛП (МНН или группировочное (химическое) наименование) ^a <i>Biological product name (INN or generic (chemical) name)^a</i>	Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения БЛП <i>Name of the holder or owner of the marketing authorisation for the product</i>	Определяемое соединение <i>Analyte</i>	Метод определения <i>Test method</i>
17	Далибра® (Адалимумаб) <i>Dalibra® (Adalimumab)</i>	ЗАО «Биокад» <i>Biocad, JSC</i>	Маннитол <i>Mannitol</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>
18	Экстимия® (Эмпрегилграстин) <i>Extimia® (Eprexifilgrastim)</i>	ЗАО «Биокад» <i>Biocad, JSC</i>	Маннитол <i>Mannitol</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>
19	Иммуноглобулин Сигардис (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Immunoglobulin-Sigardis (Human normal immunoglobulin)</i>	ООО «Сигардис Рус» <i>Sigardis Rus, OOO</i>	Декстроза <i>Dextrose</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектором <i>HPLC with refractive index detection</i>
20	Антитромбин III человеческого (антитромбин II) <i>Antithrombin III, human (Antithrombin II)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Глюкоза <i>Glucose</i>	Ферментативный метод с УФ детекцией <i>Enzymatic determination with UV detection</i>
21	Флебогамма® 5% ДИФ (Иммуноглобулин человека нормальный) <i>Flebogamma® DIF, 5% (Human normal immunoglobulin)</i>	Институт Грифолз С.А. <i>Instituto Grifols, S.A.</i>	Сорбитол <i>Sorbitol</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>
22	Адвейт® (Октоког альфа) <i>Advate® (Octocog alfa)</i>	АО «Эс Джи Биотех» <i>SG Biotech, JSC</i>	Гистидин <i>Histidine</i>	ВЭЖХ с дериватизацией образцов <i>HPLC with sample derivatisation</i>
			Маннитол Трегалоза дигидрат <i>Mannitol Trehalose dihydrate</i>	ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>HPLC with refractive index detection</i>
23	Когенэйт ФС (Октоког альфа) <i>Kogenate FS (Octocog alfa)</i>	Байер Хелскэр ЛЛС <i>Bayer Healthcare LLC</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>
24	РефактоАФ (Мороктоког альфа) <i>ReFacto AF (Moroctocog alfa)</i>	Пфайзер Инк <i>Pfizer, Inc.</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Газовая хроматография <i>Gas chromatography</i>
25	Нувиук (Симоктоког альфа (фактор свертывания крови VIII человеческого рекомбинантный)) <i>Nuwiq (Simoctocog alfa (recombinant human coagulation factor VIII))</i>	Октафарма АБ <i>Octapharma, AB</i>	Сахароза <i>Sucrose</i>	Ионная хроматография с амперометрическим детектированием <i>Ion chromatography with amperometric detection</i>

Примечание. БЛП – биологический лекарственный препарат; МНН – международное непатентованное наименование.

^a Для вакцин МНН или группировочное (химическое) наименование не указано.

Note. INN – international nonproprietary name.

^a INNs or generic (chemical) names are not specified for vaccines.

и D-галактозы, связанных 2 α →6 и 1 α →4 гликозидными связями).

Хроматографической стадии анализа предшествует пробоподготовка в виде гидролиза испытуемого препарата и стандартных образцов полисахаридов с образованием манноза-6-фосфата — для полисахарида серогруппы А, галактозы и N-ацетилнейраминовой кислоты — для полисахарида серогруппы W-135, глюкозы и N-ацетилнейраминовой кислоты — для полисахарида серогруппы Y и N-ацетилнейраминовой кислоты — для полисахарида С. Количество полисахарида С определяют с учетом вклада в площадь пика N-ацетилнейраминовой кислоты полисахаридов серогрупп Y и W-135, долю которых определяют по хроматограммам гидролизатов индивидуальных образцов соответствующих полисахаридов [27].

Аналогичным образом количественно определяют полисахарид в вакцине против инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* тип b, подвергая полисахарид полирибозилрибитол фосфат, состоящий из повторяющихся единиц 3- β -D-рибофуранозил-(1→1)-рибитол-5-фосфат, гидролизу с образованием дисахарида рибозилрибитолфосфата, который количественно определяют ионообменной хроматографией с амперометрическим детектированием [28].

Данный подход к количественной оценке является высокоселективным и обладает хорошими точностными характеристиками: правильностью и прецизионностью. К недостаткам метода можно отнести необходимость регулярной промывки хроматографической системы при работе с низкоконтентрированными (микрограммы) анализируемыми растворами [28].

Тем не менее метод ионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием был одним из основных при разработке международных стандартных образцов полисахаридов *Neisseria meningitidis* серогрупп А¹, С², W³, Y⁴.

В Европейской фармакопее количественное определение полисахаридов в менингококковых вакцинах⁵ и вакцинах против инфекций, вызы-

ваемых *Haemophilus influenzae* тип b⁶, методом ионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием предложен как альтернативный наряду с расчетными методами определения по фосфору, сиаловой кислоте и рибозе.

Таким образом, метод ионной хроматографии с амперометрическим детектированием является востребованным при количественном определении полисахаридов в менингококковых вакцинах и в вакцинах против инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* тип b. Также можно предположить, что ионной хроматографии отдается предпочтение при одновременном определении нескольких вспомогательных веществ БЛП, а также при наличии в составе БЛП соединений, мешающих определению альтернативными методами.

Можно предположить, что метод ионной хроматографии за счет высокой чувствительности и селективности целесообразно применять для одновременного количественного определения катионов (аммоний, кальций, магний) и анионов (хлориды, сульфаты, нитраты) в растворителе для лиофилизированных БЛП; для оценки качества действующего вещества БЛП (количественное определение полисахарида в полисахаридных вакцинах, гликофиль гликозилированных протеинов и т.д.), а также при определении нескольких стабилизаторов углеводной природы БЛП одной методикой.

Заключение

Сравнительный анализ метода ионной хроматографии и альтернативных методов при оценке качества БЛП показал, что к существенным преимуществам метода можно отнести его селективность, относительную быстроту анализа, возможность использования небольших количеств анализируемого соединения, прямое детектирование анализируемых соединений без необходимости пред- и постколоночной дериватизации, максимальную автоматизацию процесса.

Таким образом, в ближайшей перспективе при оценке качества БЛП ионообменная хроматография с кондуктометрическим

¹ 1st WHO International Standard for Meningococcal Group A Polysaccharide. NIBSC code: 13/246. Instructions for use (Version 2.0, Dated 01/05/2019). <https://www.nibsc.org/documents/ifu/13-246.pdf>

² 1st WHO International Standard for Meningococcal Serogroup C Polysaccharide. NIBSC code: 08/214. Instructions for use (Version 5.0, Dated 05/03/2021). <https://www.nibsc.org/documents/ifu/08-214.pdf>

³ 1st International Standard for Meningococcal Capsular Group W Polysaccharide. NIBSC code: 16/152. Instructions for use (Version 1.0, Dated 12/11/2019). <https://nibsc.org/documents/ifu/16-152.pdf>

⁴ WHO International Standard, 1st International Standard for Meningococcal Capsular Group Y Polysaccharide. NIBSC code: 16/206, Instructions for use (Version 1.0, Dated 11/11/2019). <https://www.nibsc.org/documents/ifu/16-206.pdf>

⁵ Monograph 3066 Meningococcal group A, C, W135 and Y conjugate vaccine. European Pharmacopoeia. 10th ed.; 2019.

⁶ Monograph 2622 Haemophilus type b and Meningococcal group C conjugate vaccine. European Pharmacopoeia. 10th ed.; 2016.

и амперометрическим детектированием может занять лидирующие позиции в количественной оценке вспомогательных веществ с ионной

структурой, стабилизаторов углеводной природы и основного действующего вещества — полисахарида в полисахаридных вакцинах.

Литература/References

- Small H, Stevens TS, Bauman WC. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. *Anal Chem.* 1975;47(11):1801–9. <https://doi.org/10.1021/ac60361a017>
- Бёккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика. Методы хроматографии и капиллярного электрофореза: монография. М.: Техносфера, 2009. [Becker Y. *Chromatography. Instrumental analytics. Methods of chromatography and capillary electrophoresis*: monograph. Moscow: Technosphere, 2009 (In Russ.)]
- Skelly NE. Separation of inorganic and organic anions on reversed-phase liquid chromatography columns. *Anal Chem.* 1982;54(4):712–5. <https://doi.org/10.1021/ac00241a026>
- Miao S, Xie P, Mao Z, Fan L, Liu X, Zhou Y, et al. Identification of multiple sources of the acidic charge variants in an IgG1 monoclonal antibody. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(14):5627–38. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8301-x>
- Wang G, Tomasella FP. Ion-pairing HPLC methods to determine EDTA and DTPA in small molecule and biological pharmaceutical formulations. *J Pharm Analysis.* 2016;6(3):150–6. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.002>
- Shibue M, Mant CT, Hodges RS. Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2005;1080(1):68–75. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.035>
- Åsberg D, Langborg Weinmann A, Leek T, Lewis RJ, Klarqvist M, Leško M, et al. The importance of ion-pairing in peptide purification by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2017;1496:80–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.041>
- Leblanc Y, Ramon C, Bihoreau N, Chevreux G. Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: case study after a long-term storage at +5 °C. *J Chromatogr B.* 2017;1048:130–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.017>
- Hebbi V, Chattopadhyay S, Rathore AS. High performance liquid chromatography (HPLC) based direct and simultaneous estimation of excipients in biopharmaceutical products. *J Chromatogr B.* 2019;1117:118–26. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.022>
- Lodi G, Storti G, Pellegrini LA, Morbidelli M. Ion exclusion chromatography: model development and experimental evaluation. *Ind Eng Chem Res.* 2017;56(6):1621–32. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b04475>
- Yan Y, Liu AP, Wang S, Daly TJ, Li N. Ultrasensitive characterization of charge heterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies using strong cation exchange chromatography coupled to native mass spectrometry. *Anal Chem.* 2018;90(21):13013–20. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03773>
- Muneeruddin K, Bobst CE, Frenkel R, Houde D, Turyan I, Sosic Z, Kaltashov IA. Characterization of a PEGylated protein therapeutic by ion exchange chromatography with on-line detection by native ESI MS and MS/MS. *Analyst.* 2017;142(2):336–44. <https://doi.org/10.1039/C6AN02041K>
- Fekete S, Beck A, Fekete J, Guilleme D. Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: salt gradient approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;102:33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.035>
- Fekete S, Beck A, Fekete J, Guilleme D. Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part II: pH gradient approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;102:282–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.032>
- Spanov B, Olaleye O, Lingg N, Bentlage AEH, Govorukhina N, Hermans J, et al. Change of charge variant composition of trastuzumab upon stressing at physiological conditions. *J Chromatogr A.* 2021;1655:462506. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462506>
- Vlasak J, Bussat MC, Wang S, Wagner-Rousset E, Schaefer M, Klinguer-Hamour C, et al. Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody. *Anal Biochem.* 2009;392(2):145–54. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.043>
- Faghihi H, Merrikhihagh S, Najafabadi AR, Ramezani V, Sardari S, Vatanara A. A comparative study to evaluate the effect of different carbohydrates on the stability of Immunoglobulin G during lyophilization and following storage. *Pharm Sci.* 2016;22(4):251–9. <https://doi.org/10.1517/PS.2016.39>
- Włodarczyk SR, Custódio D, Pessoa A Jr, Monteiro G. Influence and effect of osmolytes in biopharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;131:92–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.019>
- Kissinger PT, Refshauge C, Dreiling R, Adams RN. An electrochemical detector for liquid chromatography with picogram sensitivity. *Anal Lett.* 1973;6(5):465–77. <https://doi.org/10.1080/00032717308058694>
- Merkle RK, Poppe I. Carbohydrate composition analysis of glycoconjugates by gas-liquid chromatography/mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 1994;230:1–15. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)30003-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)30003-8)
- Schenk J, Nagy G, Pohl NLB, Leghissa A, Smuts J, Schug KA. Identification and deconvolution of carbohydrates with gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopy. *J Chromatogr A.* 2017;1513:210–21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.052>

22. Haas M, Lamour S, Trapp O. Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2018;1568:160–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>
23. Rendleman JA, Jr. In: Isbell HS, ed. Carbohydrates in solution. *Advances in Chemistry Ser ACS*. Washington; 1973;117:51–68.
24. Hardy MR, Townsend RR, Lee YC. Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal Biochem*. 1988;170(1):54–62. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90089-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90089-9)
25. Rohrer JS, Basumallick L, Hurum DC. Profiling N-linked oligosaccharides from IgG by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Glycobiology*. 2016;26(6):582–91. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww006>
26. Talaga P, Vialle S, Moreau M. Development of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates. *Vaccine*. 2002;20(19–20):2474–84. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00183-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00183-4)
27. Gudlavalleti SK, Crawford EN, Harder JD, Reddy JR. Quantification of each serogroup polysaccharide of *Neisseria meningitidis* in A/C/Y/W-135-DT conjugate vaccine by high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection analysis. *Anal Chem*. 2014;86(11):5383–90. <https://doi.org/10.1021/ac5003933>
28. van der Put RM, de Haan A, van den IJssel JG, Hamidi A, Beurret M. HPAEC-PAD quantification of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide in upstream and downstream samples. *Vaccine*. 2015;33(48):6908–13. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.028>

Вклад авторов. А.С. Минеро — анализ и обобщение данных, изложенных в нормативных документах и научной литературе, составление текста рукописи; О.Б. Рунова — редактирование текста рукописи; О.Б. Устинникова — определение направления исследования, постановка задачи, редактирование текста рукописи; А.А. Мовсесянц — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

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

Authors' contributions. A.S. Minero—analysis and consolidation of data from literature and regulatory documents, drafting of the text of the manuscript; O.B. Runova—revision of the text; O.B. Ustinnikova—determination of the research direction, setting of objectives, and revision of the text; A.A. Movsesyants—final approval of the version to be published.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Conflict of interest. A.A. Movsesyants is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Минеро Анастасия Сальвадоровна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>
minero@expmed.ru

Рунова Ольга Борисовна, канд. хим. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>
runova@expmed.ru

Устинникова Ольга Борисовна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>
ustinnikova@expmed.ru

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
movsesyants@expmed.ru

Anastasia S. Minero. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>
minero@expmed.ru

Olga B. Runova. Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>
runova@expmed.ru

Olga B. Ustinnikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>
ustinnikova@expmed.ru

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
movsesyants@expmed.ru

Поступила 26.11.2021

После доработки 09.06.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Received 26 November 2021

Revised 9 June 2022

Accepted 10 June 2022

УДК 615.371:578.74:578.832.1:615.322

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-170-186>

Научная статья | Scientific article



Разработка и лабораторное получение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов, оценка их адъювантных свойств при иммунизации мышей гриппозными антигенами

В.А. Евсеенко , А.С. Гудымо, Н.В. Данильченко, С.В. Святченко, О.С. Таранов, А.Б. Рыжиков

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости, АБК, корп. 12а, р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

 Евсеенко Василий Александрович; evseenko_va@vector.nsc.ru

Резюме

Пандемия COVID-19 обострила потребность общества в эффективных вакцинных препаратах. В этих условиях существенную финансовую поддержку получили разработки ряда инновационных вакцин, в том числе вакцин, в состав которых входят адъюванты на основе сапонинов. В 2021 г. ВОЗ была одобрена первая противомаларийная вакцина Mosquirix, содержащая сапонины. На стадии одобрения находится вакцина Novavax против COVID-19. Перспективным подходом к созданию вакцин является использование вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов (ИСКОМ) на основе сапонинов и создание на их основе комплексов с антигеном (ИСКОМ-антиген). **Цель работы:** получение и изучение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов Квиллайи мыльной (*Quillaja saponaria*), а также аналогов на основе сапонинов Синюхи голубой (*Polemonium caeruleum*), полученных из отечественного сырья. **Материалы и методы:** с применением метода жидкостной хроматографии получали препараты ИСКОМ адъювантов – Матрикс-BQ и Матрикс-BP. Проведено электронно-микроскопическое исследование препаратов. Иммунизацию мышей Balb/c препаратами ИСКОМ-антиген проводили интраперитонеально и внутримышечно. Иммунизированных животных заражали адаптированным летальным для мышей штаммом вируса гриппа A/California/4/2009 (H1N1)pdm09. Образцы сыворотки крови иммунизированных животных исследовали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). **Результаты:** получены ИСКОМ, содержащие сапонины Синюхи голубой и Квиллайи мыльной. В образцах сыворотки крови животных, однократно внутримышечно иммунизированных препаратом ИСКОМ-антиген, содержащим по 1 мкг гемагглютиниона каждого из штаммов вирусов гриппа A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09, A/Kansas/14/2017 (H3N2), B/Phuket/3073/2013, значения титров антител в РТГА составили более 1:40 к соответствующим антигенам. При двукратном внутримышечном введении препарата ИСКОМ-антиген, содержащего 50 нг каждого антигена, был выявлен протективный ответ. Максимальные значения титров антител в РТГА выявлены при двукратном интраперитонеальном введении препарата ИСКОМ-антиген и составили 1:20480 к гемагглютиниону вакцинного штамма A/Kansas/14/2017 (H3N2). Показано, что двукратное внутримышечное введение 5 мкг, 1 мкг, 200 нг, 50 нг препарата ИСКОМ-антиген и 5 мкг, 1 мкг, 200 нг контрольного антигена коммерчески доступной вакцины мышам, впоследствии зараженным летальным штаммом вируса гриппа A/California/4/2009 (H1N1)pdm09, защищает экспериментальных животных от гибели. **Выводы:** полученные препараты на основе ИСКОМ обладали высокой иммуностимулирующей активностью в исследовании на мыши-

ной модели. Представленные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения препаратов на основе ИСКОМ при разработке как противовирусных, так и иммунокорректирующих препаратов.

Ключевые слова: вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы; ИСКОМ; адъювант; сапонин; вакцина; иммунизация; грипп; респираторная инфекция

Для цитирования: Евсеенко В.А., Гудымо А.С., Данильченко Н.В., Святченко С.В., Таранов О.С., Рыжиков А.Б. Разработка и лабораторное получение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов, оценка их адъювантных свойств при иммунизации мышей гриппозными антигенами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):170–186. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-170-186>

Development and laboratory production of virus-like immune-stimulating complexes based on saponins and evaluation of their adjuvant potential using mice immunisation with influenza antigens

V.A. Evseenko ✉, A.S. Gudymo, N.V. Danilchenko, S.V. Svyatchenko, O.S. Taranov, A.B. Ryzhikov

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, World-class genomic research center for biological safety and technological independence, ABK, 12A, Koltsovo, Novosibirsk Region 630559 Russian Federation

✉ Vasily A. Evseenko; evseenko_va@vector.nsc.ru

Abstract

The COVID-19 pandemic has exacerbated the public's need for effective vaccines. Consequently, significant financial support has been provided to developers of a number of innovative vaccines, including the vaccines with saponin-based adjuvants. In 2021, the World Health Organisation recommended Mosquirix, the first malaria vaccine, which contains a saponin adjuvant. An anti-covid vaccine by Novavax is in the approval phase. A promising approach to vaccine development is presented by the use of virus-like immune-stimulating complexes (ISCOMs) containing saponins and by the creation of combinations of ISCOMs with antigens. **The aim of the study** was to develop, produce and characterise virus-like immune-stimulating complexes based on saponins of *Quillaja saponaria*, as well as similar saponins of Russian-sourced *Polemonium caeruleum*. **Materials and methods:** The ISCOM adjuvants, Matrix-BQ and Matrix-BP, were produced using liquid chromatography and examined using electron microscopy. Balb/c mice were immunised intraperitoneally and intramuscularly with ISCOM-antigen preparations. Afterwards, the immunised animals were challenged with the influenza virus strain, A/California/4/2009(H1N1)pdm09, adapted and lethal to mice. The serum samples were examined using haemagglutination inhibition (HI) tests. **Results:** The authors produced the ISCOMs containing saponins of *Quillaja saponaria* and *Polemonium caeruleum*. After one intramuscular injection of either of the ISCOM-antigen preparations with 1 µg of each of A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09, A/Kansas/14/2017 (H3N2), and B/Phuket/3073/2013 haemagglutinin antigens (HAs), HI tests detected serum antibody titres to the corresponding antigens of ≥1:40. Two intramuscular injections of the ISCOM-antigen preparation containing 50 ng of each of the HAs and Matrix-BQ resulted in a protective response. In some animals, two intraperitoneal injections of ISCOM-antigen preparations resulted in the maximum antibody titre to the A/Kansas/14/2017 (H3N2) vaccine strain of 1:20,480. Two intramuscular injections of a test preparation containing 5 µg, 1 µg, 200 ng, or 50 ng of each of the HAs and Matrix-BQ or a control preparation containing 5 µg, 1 µg, or 200 ng of each of the HAs (commercially available vaccines) to the mice that

were afterwards infected with the lethal influenza strain protected the experimental animals from death. **Conclusions:** The ISCOM-based preparations had high immunostimulatory activity in the mouse-model study. The presented results indicate the potential of further studies of ISCOM-based preparations in terms of both vaccine and immunotherapeutic development.

Key words: virus-like immune-stimulating complexes; ISCOM; adjuvant; saponin; vaccine; immunisation; influenza; respiratory infection

For citation: Evseenko V.A., Gudymo A.S., Danilchenko N.V., Svyatchenko S.V., Taranov O.S., Ryzhikov A.B. Development and laboratory production of virus-like immune-stimulating complexes based on saponins and evaluation of their adjuvant potential using mice immunisation with influenza antigens. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):170–186. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-170-186>

Введение

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 обострила проблемы, связанные с иммунопрофилактикой респираторных заболеваний вирусной природы. Для заболеваний, вызываемых респираторно-синцитиальным вирусом, сезонным коронавирусом, риновирусом, парамиксовирусом и другими, вакцины не применяются, а противогриппозные вакцины не обеспечивают продолжительную защиту. Одной из инновационных технологий является разработка вакцин на основе иммуностимулирующих комплексов – ИСКОМ (immune-stimulating complexes, ISCOM), в том числе создание вирусоподобных ИСКОМ на основе сапонинов. Сапонины относятся к семейству амфипатических растительных гликозидов и структурно состоят из липофильных тритерпеновых производных [1]. Отличительной особенностью некоторых растительных сапонинов является высокая аффинность к холестерину. Вирусоподобные комплексы размером около 40 нм, состоящие из сапонинов Квиллайи мыльной (*Quillaja saponaria*), холестерина и лецитина, имеющие выраженные иммуномодулирующие свойства при парентеральном введении, исследуются с середины 80-х годов прошлого века [1]. Первые образцы обладали высокой цитотоксичностью, и использование ИСКОМ в низкой концентрации в препарате не имело преимуществ по сравнению с хорошо зарекомендовавшим себя адъювантом – гидроокисью алюминия. С развитием биотехнологических систем фракционирования компонентов при разработке и производстве биопрепаратов стало возможным проводить сложные исследования, результаты которых продемонстрировали уникальные свойства этих наночастиц. Сапонинсодержащие адъюванты стимулируют врожденный и адаптивный клеточный иммунитет, а также гуморальный ответ, характеризующийся продукцией всех изотипов

IgG, таким образом, наблюдается формирование смешанного Th1/Th2 типа иммунного ответа. В ряде работ, в которых для иммунизации использовали сапонинсодержащие адъюванты, был выявлен выраженный клеточный иммунный ответ на растворимые белки, и в частности на овальбумин [2–4]. Была установлена основная роль дендритных клеток в этом процессе [4]. Для сравнения, препараты, содержащие гидроокись алюминия или масляные адъюванты, в основном стимулируют Th2-иммунный ответ. Показано, что именно сапонины в составе ИСКОМ являются молекулярным компонентом, формирующим инфламмасомы [5]. Уникальные особенности ИСКОМ на основе сапонинов и установленные молекулярные механизмы их действия позволяют рассматривать их как перспективные адъювантные компоненты профилактических и терапевтических вакцин для борьбы с инфекционными и онкологическими заболеваниями.

Получение ИСКОМ возможно с применением различных биотехнологических методик. Это обусловлено сильным биохимическим родством сапонинов, лецитина и холестерина, которые в растворе детергента при понижении его концентрации формируют идентичные корпускулярные структуры, устойчивые при фракционировании. В физиологических растворах ИСКОМ заряжены отрицательно и при добавлении полярно заряженных вирусных антигенов связываются с ними, формируя комплексы ИСКОМ-антиген. Эти свойства позволяют проектировать аминокислотную последовательность антигенов таким образом, чтобы в их составе были положительно заряженные кластеры аминокислот, и формирование препарата ИСКОМ-антиген происходило с ожидаемой эффективностью [6]. Для получения ИСКОМ нами была использована гель-фильтрация (SEC).

Аналитические исследования указывают на высокую перспективность вакцин, содержа-

ших компонент на основе ИСКОМ, в частности адъювант Matrix-M (Novavax, США) [7]. Опасения, связанные с высокой реактогенностью Matrix-M, не оправдались. Препараты, содержащие Matrix-M, находятся на завершающих стадиях клинических исследований (КИ): вакцина против сезонного гриппа NanoFlu (Novavax, США) для применения в возрастной группе 65 лет и старше прошла фазу 3 КИ; вакцина против респираторного синцитиального вируса RSV F (Novavax, США) — фазу 3 КИ¹ [8]. Препарат для профилактики новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, NVX-CoV2373 (Novavax, США), успешно прошел клинические испытания [9] и официально одобрен.

В Российской Федерации активно применяются гриппозные вакцины, содержащие адъюванты Совидон и Полиоксидоний [10, 11]. В мировой практике применение адъювантов в гриппозных вакцинах произошло с запозданием. В настоящий момент доступны препараты, содержащие масляный адъювант MF59 [12]. В то же время, помимо незначительной экономии антигена, использование данных соединений не привело к существенным изменениям производственного процесса, при котором необходима ежегодная аттестация производственных штаммов ВОЗ, или кардинальному снижению заболеваемости гриппом.

Цель работы — получение и изучение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов Квиллайи мыльной (*Quillaja saponaria*), а также аналогов на основе сапонинов Синюхи голубой (*Polemonium caeruleum*), полученных из отечественного сырья.

Материалы и методы

Материалы:

- лаурил саркозинат натрия (Sodium Lauroyl Sarcosine, Amerco #0719-500G); холестерин (Cholesterol, PanReac Applichem #A0807); лецитин (Lecithin, PanReac Applichem #A0893); сапонины *Quillaja saponaria* (Saponin, *Quillaja saponaria*, PanReac Applichem #A2542); шприцевая фильтрующая насадка с размером пор 0,22 мкм (Minisart NML, Sartorius); гель-фильтрующий носитель Sephadex G-100 Superfine (GE Healthcare #17006101); фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,4 (VWR #E404-200TABS);
- стандартные антигены вируса гриппа: A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019

(H1N1)pdm09; A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2); B/Washington/02/2019 (B/Victoria); B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata); A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09; B/Colorado/06/2017; A/Kansas/14/2017 (H3N2) (ООО «ППДП», Санкт Петербург, Россия);

- антигены A/YANAO/1/2019 (H1N1)pdm09, A/Russia/01/2009 (H1N1)pdm09, A/Solomon Islands/03/06 (H1N1), A/New Caledonia/20/1999 (H1N1), A/Texas/50/2012 (H3N2), A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (B/Victoria) (предоставлены отделом зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

В работе были использованы мыши линии Balb/c (предоставлены вивариумом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Методы

Получение иммуностимулирующих комплексов.

В пробирку объемом 15 мл (Corning #430055) вносили 3 мл деионизованной воды, в которую далее, работая в респираторе 3М (PPP), аккуратно, не допуская распыления, вносили навеску 500±50 мкг лаурил саркозината натрия. Далее встряхивали пробирку на вортексе до полного растворения детергента. Пробирку центрифугировали при 5000 g до исчезновения пены. Далее в пробирку вносили 30±5 мг холестерина и 30±5 мг лецитина. Смесь встряхивали на вортексе с интервалом 30 мин в течение 3 ч при комнатной температуре. За 30 мин до завершения инкубации отдельно в 2 мл деионизованной воды растворяли навеску 400±50 мг сапонинов Квиллайи мыльной (550000±26540 гемолитических единиц). После растворения сапонинов раствор фильтровали с использованием фильтрующей насадки с размером пор 0,22 мкм и вносили в смесь детергента, холестерина и лецитина. Смесь тщательно перемешивали на вортексе в течение 1 мин и далее инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре с периодическим встряхиванием на вортексе. После завершения инкубации смесь центрифугировали при 10000 g, шприцем на 15 мл с иглой отбирали содержимое из центра пробирки, не касаясь осадка и поверхностной пленки. Эту реакционную смесь фильтровали с использованием фильтрующей насадки с размером пор 0,22 мкм, после чего наносили на хроматографическую колонку HK-50 (GE Healthcare) с носителем

¹ Safety and immunogenicity study to evaluate single- or two-dose regimens of RSV F vaccine with and without aluminum phosphate or Matrix-M1™ adjuvants in clinically-stable older adults. NCT03026348. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03026348>

Sephadex G-100, уравновешенную ФСБ pH 7,4 и соединенную с хроматографом AKTA pure (General Electric Healthcare). Нанесение препарата на колонку осуществляли при скорости потока 200 мкл/мин. Хроматографию проводили при скорости потока 200 мкл/мин в течение 12 ч, а затем при скорости 500 мкл/мин в течение приблизительно 1,5 ч. Выход частиц фиксировали в первом характерном пике при длине волны 280 нм. Раствор с частицами обладал выраженными опалесцирующими свойствами. В зависимости от лабораторной серии выход продукта составлял 30–40 мл. Непосредственно после завершения процедуры проводили стерилизующую фильтрацию с использованием фильтрующей насадки с размером пор 0,22 мкм. Препарат хранили до иммунизации при 4 °C не более 30 сут. Срок хранения, установленный с помощью определения 50% летальной дозы для мышей при интраперитонеальном введении (ИМЛД₅₀), на момент публикации составил 7 мес. (методика определения ИМЛД₅₀ приведена далее). Замораживание препарата не допускается, так как часть препарата агрегирует и выпадает в осадок.

ИСКОМ на основе сапонинов Синюхи голубой изготавливали идентичным способом со следующими изменениями. В реакционную смесь добавляли сапонины Синюхи голубой, стандартизованные в гемолитической реакции (550000±36562 ед.). Выделение сапонинов из Синюхи голубой проводили согласно методике, описанной ранее [13]. Оптическую плотность раствора частиц измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм для сравнительной оценки потерь [14].

Определение единицы дозирования иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов Синюхи голубой (Матрикс-ВР) и Квиллайи мыльной (Матрикс-ВQ). Для некоторых биопрепаратов, например для токсинов, ферментов и др., биологическая активность может не в полной мере соответствовать концентрации, определяемой физико-химическими методами. Методов биологической стандартизации ИСКОМ ранее не описано. В данной работе мы применили биологическую пробу, аналогичную проводимой для токсинов. Природа токсичности при интраперитонеальном введении ИСКОМ связана с гиперпродукцией цитокинов, приводящей к шоку и гибели животного. В ходе предварительных тестов с вирусоподобными иммуностимулиру-

ющими комплексами Матрикс-ВР и Матрикс-ВQ было установлено, что при интраперитонеальном введении ИСКОМ наблюдалась гибель мышей на первые или вторые сутки. При этом цитолитической активности у препаратов не наблюдалось при внесении даже 20-кратного концентрата исходного продукта. Также не наблюдалось цитопатического эффекта для культур клеток MDCK и Vero при внесении 20-кратных концентратов исходного продукта ИСКОМ. В связи с этим было принято решение проводить стандартизацию и дозирование препаратов на основе 50% летальной дозы для мышей при интраперитонеальном введении (ИМЛД₅₀), принятой за 1 ед. активности. Мышам линии Balb/c (5 мышей, самцы 18–20 г в группе) интраперитонеально вводили 200 мкл 5-кратных разведений полученных препаратов в ФСБ (pH 7,4). Учитывали гибель животных на 1–3 сут после введения. Рассчитывали ИМЛД₅₀ по методу Риды и Менча [15].

Иммунизация и заражение экспериментальных животных. Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен Биоэтической комиссией № 1 при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол ГНЦ ВБ «Вектор»/03-04.2021). До начала иммунизации экспериментальные животные находились на адаптационном карантине и стандартном рационе вивария *ad libitum*.

Инфицирование животных вирусом гриппа A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 проводили интраназально дозой 25 ЛД₅₀ в объеме 50 мкл. Животных перед заражением наркотизировали с использованием комбинации препаратов Золетил 100 и Ксила, которые вводили внутримышечно. После инфицирования, начиная с 3 сут, регистрировали гибель животных в течение 21 сут. Далее оставшихся животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации с соблюдением правил гуманного обращения с животными². В случае, если у животного в результате тяжелого течения заболевания развивалось состояние, не совместимое с жизнью, выражавшееся в потере более 20% изначальной массы тела, на пике болезни проводили эвтаназию животного.

Для проведения интраперитонеальной иммунизации было сформировано 7 групп по 5 животных. Мышей линии Balb/c иммунизировали интраперитонеально посредством введения 200 мкл препарата ИСКОМ-

² Руководство по работе с лабораторными животными для сотрудников ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, занятых проведением доклинических испытаний. М.: Изд-во ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова; 2015.

антиген, в состав которого входило по 7,5 мкг или по 2 мкг гемагглютинаина трех вакцинных штаммов вирусов гриппа и 0,1 ИМЛД₅₀/мл Матрикс-ВР или Матрикс-ВQ. Препарат готовили за 1 ч до иммунизации. Для приготовления препарата ИСКОМ-антиген использовали антигены вакцины гриппозной трехвалентной инактивированной расщепленной, содержащей 15 мкг гемагглютинаина каждого из вакцинных штаммов вирусов гриппа A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09, B/Colorado/06/2017, A/Kansas/14/2017 (H3N2) без адъюванта. В качестве положительного контроля использовали препараты, содержащие аналогичную концентрацию антигенов, но не содержащие ИСКОМ адъювант. Группе отрицательного контроля вводился ИСКОМ Матрикс-ВQ. На 142 сут проводили повторную иммунизацию идентичными препаратами. На 14, 28, 142 и 170 сут у мышей отбирали кровь из орбитального синуса для анализа образцов сыворотки крови.

Последующий эксперимент предполагал определение нижней границы концентрации гемагглютининов, вызывающей при внутримышечном введении 10 ИМЛД₅₀ Матрикс-ВQ образование антител, детектируемых в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Использовали инактивированную четырехвалентную расщепленную вакцину, содержащую антигены A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Washington/02/2019 (B/Victoria), B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata). Группы по 5 животных внутримышечно иммунизировали препаратом ИСКОМ-антиген, содержащим 5, 1, 0,2 или 0,05 мкг каждого гемагглютинаина, дозу 10 ИМЛД₅₀/мл Матрикс-ВQ. В качестве положительного контроля было сформировано 4 группы по 5 животных, которых иммунизировали внутримышечно 5, 1, 0,2 или 0,05 мкг каждого гемагглютинаина без ИСКОМ адъюванта. В качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым внутримышечно вводили дозу 10 ИМЛД₅₀/мл Матрикс-ВQ. Использование препарата, содержащего только сапонины Квиллайи мыльной, обусловлено коммерческой доступностью сырья для изготовления. Доза адъюванта при внутримышечном введении была выбрана исходя из того, что доза 10 ИМЛД₅₀ ИСКОМ Матрикс-ВQ при введении мышам внутримышечно не вызывала определяемых визуально нарушений поведения, циркадных ритмов, а также нарушения динамики набора веса. Эта доза может быть неоптимальной и, возможно, потребует уточнения при дальнейших работах с более крупными животными. Кровь у животных отбирали на 21

сут после первой иммунизации, в этот же день осуществляли вторую иммунизацию и на 21 сут после второй иммунизации также отбирали кровь для анализа сыворотки в РТГА. На 42 сут после первой иммунизации всех животных заражали адаптированным к мышам летальным штаммом вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 в дозе 25 ЛД₅₀. За мышами наблюдали в течение 21 сут, учитывали погибших животных. На 27 сут после заражения у выживших животных отбирали кровь для анализа образцов сыворотки в РТГА. РТГА и гемолитическую реакцию проводили согласно методике, описанной V. Evseenko с соавт. [16]. Для вычисления значений средних геометрических титров (СГТ) и погрешностей измерения считали, что титр ниже предела детекции равен 1:10.

Электронная микроскопия. Для электронно-микроскопического исследования полученные препараты, подвергшиеся стерилизующей фильтрации через фильтр-насадку 0,22 мкм, наносили в объеме 15 мл в мембранный центрифужный концентратор с мембраной 100 кДа (Millipore). Центрифугировали в течение 1 ч при 1500 g (ротатор 12150-H, Sigma). Концентрат переносили в пробирки в объеме 150 мкл. Изображения получены методом негативного контрастирования 1% уранилацетатом с анализом на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, США).

Определение остаточной концентрации детергента. Остаточный детергент в препаратах Матрикс-ВР, Матрикс-ВQ определяли в реакции гемолиза. Лаурил саркозинат натрия, применяемый при изготовлении ИСКОМ Матрикс-ВQ и Матрикс-ВР, является детергентом и в следовых количествах обладает способностью лизировать эритроциты. Для оценки гемолитической активности использовали эритроциты петуха. Гемолитическую активность препаратов сравнивали с гемолитической активностью стандартного раствора детергента. Для приготовления стандартного раствора детергента навеску лаурил саркозината натрия 0,015±0,002 г растворяли в 1 мл ФСБ (pH 7,4).

Гемолитическую реакцию проводили в микроварианте в 96-луночных полистироловых планшетах [16]. На одном планшете готовили двукратные разведения исследуемых растворов ИСКОМ (Матрикс-ВР и Матрикс-ВQ) и стандартного раствора детергента в повторях, после чего добавляли по 50 мкл 0,5% суспензии эритроцитов петуха. При завершении оседания эритроцитов в контрольных лунках учитывали лизис эритроцитов в стандартных и экспериментальных лунках. Рассчитывали предельные

разведения препаратов, вызывающие лизис эритроцитов.

Результаты

Предложенная лабораторная технология позволила получать препараты ИСКОМ адъювантов в объеме $42,0 \pm 5,7$ мл (15 серий): Матрикс-ВР или Матрикс-ВQ-содержащих растворов (в 1 мл $77,9 \pm 8,3$ ИМЛД₅₀). Растворы характеризуются выраженной опалесценцией. При фильтрации через фильтр-насадку 0,22 мкм контролировали потерю активного компонента спектрофотометрически при длине волны 280 нм. В препаратах Матрикс-ВР, Матрикс-ВQ минимальная концентрация, вызывающая лизис эритроцитов, составила 107 ± 11 мкг/мл.

Частицы, полученные с использованием сапонинов Квиллайи мыльной, имели размер около 40 нм и характерную клетчатую (cage-like) структуру (рис. 1А, 1D). Данные характеристики аналогичны ранее описанным ИСКОМ, в том числе препарату Matrix-M, входящему в состав вакцины NVX-CoV2373 (Novavax, США) для профилактики COVID-19 [9].

Изучая снимки препарата до и после инкубации с антигенами вирусов гриппа, можно уверенно сделать вывод о том, что антиген распределен по поверхности частицы. Важно отметить, что не наблюдается свободного антигена в поле зрения (рис. 1В, 1F).

Частицы, изготовленные с использованием сапонинов Синюхи голубой, имеют размер 250–330 нм и слабовыраженную клетчатую структуру (рис. 1С, 1Е). При стерилизующей фильтрации фиксировались потери $8,3 \pm 4,0\%$. По сравнению с частицами с размером 40 нм на основе Квиллайи мыльной в препаратах на основе Синюхи голубой более отчетливо видна ассоциация антигенов вирусов гриппа с частицами, визуально представленная в виде электронно-прозрачного вещества на поверхности частицы (рис. 1С, 1F).

Оценка эффективности интраперитонеальной иммунизации мышей иммуностимулирующими комплексами

Результаты проведения РТГА с образцами сыворотки крови мышей, иммунизированных интраперитонеально, представлены в виде значений СГТ антител на рисунках 2А, 2В и 3А, 3В. Для анализа и обсуждения выбраны группы, в которых значения СГТ составили 1:40 и выше для выбранного типа антигена (протективный уровень)³.

В сыворотке крови животных, взятой на 14 сут после иммунизации, только у некоторых животных фиксировалась сероконверсия (рис. 2А). К 28 сут после иммунизации препаратом во всех экспериментальных группах и группах положительного контроля наблюдался подъем значений титров антител к компонентам А/(Н1N1)pdm09 и А/(Н3N2). На компонент вируса гриппа В значения титров 1:40 и выше были только в группе животных, иммунизированных препаратом ИСКОМ-антиген: комплексом 2 мкг каждого антигена + 0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-ВQ. Внутри экспериментальных групп и групп положительного контроля не отмечено статистически значимых отличий ($P=0,95$) между значениями СГТ на А/(Н1N1)pdm09 и А/(Н3N2) компоненты на 28 сут. Важно отметить, что значения СГТ к А/(Н1N1)pdm09 и А/(Н3N2) компонентам в группах, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексом 2 мкг антигена + 0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-ВР; комплексом 7,5 мкг антигена + 0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-ВQ; комплексом 2 мкг антигена + 0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-ВQ, были статистически достоверно выше ($P=0,95$) в 3,0; 3,5; 5,3 раза (в случае антигенного компонента А/(Н1N1)pdm09) и в 5,3; 6,0; 13,9 раза (в случае антигенного компонента А/(Н3N2)) в сравнении со значениями СГТ в ответ на препарат положительного контроля, содержащий 7,5 мкг каждого антигена без ИСКОМ адъюванта. Наиболее сильный ответ был отмечен для препарата, содержащего по 2 мкг антигена и 0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-ВQ (рис. 2В).

На 142 сут (около 4,5 мес.) после иммунизации наблюдалось снижение титров ко всем антигенным компонентам во всех группах, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген. Из-за неоднородности ответа снижение у разных животных происходило по-разному. Статистически достоверные различия ($P=0,95$) наблюдались между группами животных, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексом 2 мкг антигена + 0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-ВР; комплексом 7,5 мкг антигена + 0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-ВQ; комплексом 2 мкг антигена + 0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-ВQ в сравнении с группой положительного контроля, иммунизированной 2 мкг каждого антигена без ИСКОМ адъюванта (рис. 3А). Важно отметить, что во всех группах также не было статистически достоверных различий ($P=0,95$) СГТ на антигенные компоненты А/(Н1N1)pdm09 и А/(Н3N2). Во всех группах фактически не определялся ответ на антиген гриппа В или был на пределе определения (рис. 3А).

³ Методические указания МУ 3.1.3490-17 Изучение популяционного иммунитета к гриппу у населения Российской Федерации (утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 27.10.2017); 2017.

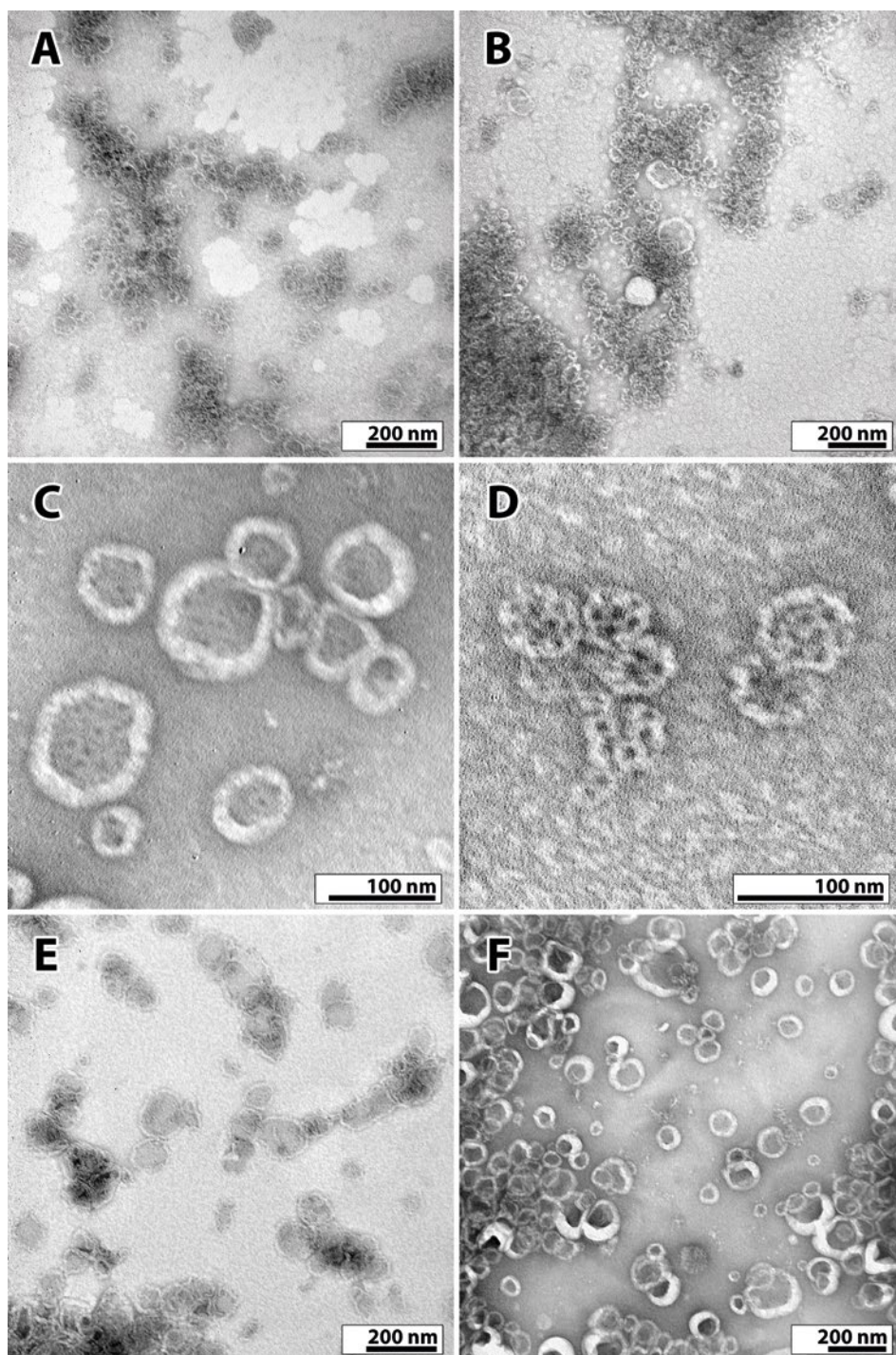


Рис. 1. Фотографии частиц иммуностимулирующих комплексов, полученных с использованием сапонинов Квиллайи мыльной: А – 100-кратный концентрат Матрикс-BQ, В – 100-кратный концентрат Матрикс-BQ после инкубации с антигенами гриппозной вакцины. Ультраструктура частиц иммуностимулирующих комплексов: С – частицы Матрикс-BP, изготовленных с использованием сапонинов Синюхи голубой; D – частицы Матрикс-BQ, изготовленных с использованием сапонинов Квиллайи мыльной. Фотографии частиц иммуностимулирующих комплексов, полученных с использованием сапонинов Синюхи голубой: E – 100-кратный концентрат Матрикс-BP, F – 100-кратный концентрат Матрикс-BP после инкубации с антигенами гриппозной вакцины.

Fig. 1. Images of the immune-stimulating complexes containing *Quillaja saponaria* saponins: (A) a concentrate (100×) of Matrix-BQ, (B) a concentrate (100×) of Matrix-BQ after incubation with influenza vaccine antigens. Ultrastucture of immune-stimulating complexes: Matrix-BP particles containing *Polemonium caeruleum* saponins (C); Matrix-BQ particles containing *Quillaja saponaria* saponins (D). Images of the immune-stimulating complexes containing *Polemonium caeruleum* saponins: (E) a concentrate (100×) of Matrix-BP, (F) a concentrate (100×) of Matrix-BP after incubation with influenza vaccine antigens.

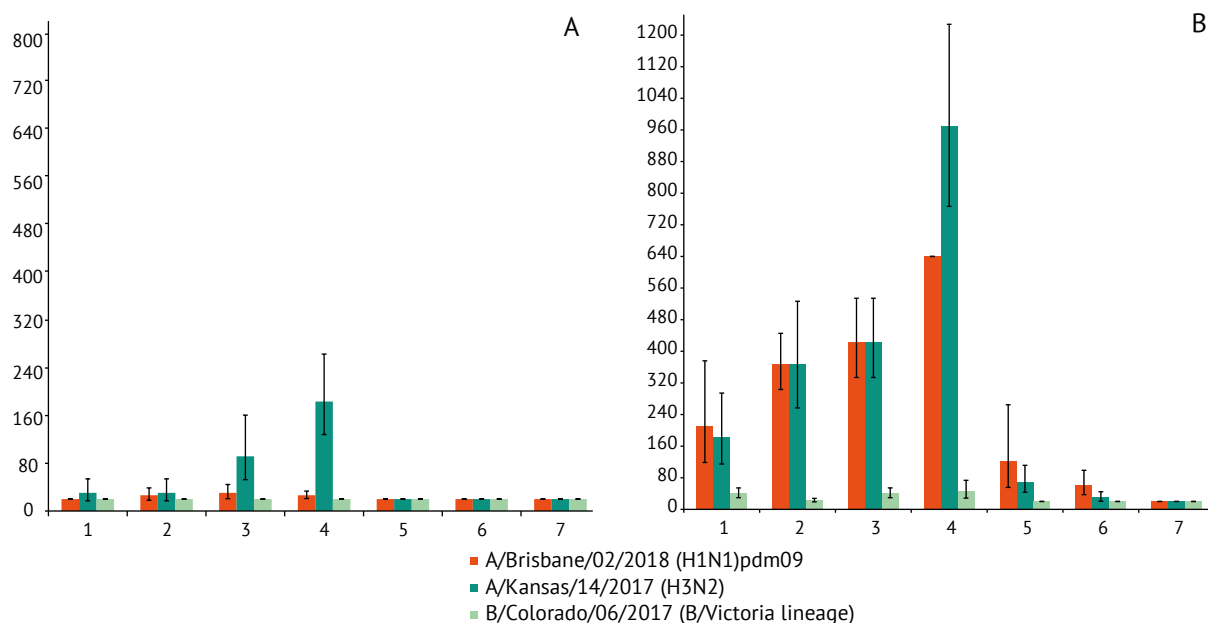


Рис. 2. Данные реакции торможения гемагглютинации с образцами сыворотки крови иммунизированных интраперитонеально мышей, взятыми на 14 (А) и 28 (В) сутки после иммунизации. Ось абсцисс — группы экспериментальных животных: 1 — Матрикс-ВР + 7,5 мкг антигена; 2 — Матрикс-ВР + 2 мкг антигена; 3 — Матрикс-ВК + 7,5 мкг антигена; 4 — Матрикс-ВК + 2 мкг антигена; 5 — 7,5 мкг антигена; 6 — 2 мкг антигена; 7 — Матрикс-ВК без антигена (отрицательный контроль). Ось ординат — среднее геометрическое значений обратных титров антител. В легенде указаны антигены вирусов гриппа, использованные для иммунизации. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала при $P=0,95$.

Fig. 2. Data on haemagglutination inhibition in mouse serum samples taken on days 14 (A) and 28 (B) after intraperitoneal immunisation. The X-axis shows the experimental animal groups: (1) Matrix-BP + 7.5 μ g of each antigen; (2) Matrix-BP + 2 μ g of each antigen; (3) Matrix-BQ + 7.5 μ g of each antigen; (4) Matrix-BQ + 2 μ g of each antigen; (5) 7.5 μ g of each antigen; (6) 2 μ g of each antigen; (7) the negative control group of Matrix-BQ without antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The legend indicates the influenza virus antigens used for immunisation. Whiskers reflect confidence intervals at $P=0.95$.

После проведенной повторной интраперитонеальной иммунизации идентичными препаратами ИСКОМ-антиген в образцах сыворотки крови, взятых на 28 (170) сут после второй иммунизации, был отмечен значительный подъем значений титров. Анализ результатов РТГА показывает наличие статистически достоверных различий ($P=0,95$) значений СГТ на антигенные компоненты А/(H1N1)pdm09, А/(H3N2) и В/Victoria между группами, иммунизированными препаратами, содержащими ИСКОМ адъюванты, и группами, иммунизированными без ИСКОМ адъювантов (рис. 3В). Достоверных различий ($P=0,95$) значений СГТ к А/(H1N1)pdm09, А/(H3N2) и В/Victoria между группами, иммунизированными препаратом, содержащим 7,5 мкг или 2 мкг каждого антигена, нет. Существенным образом изменился титр антител к компоненту вируса гриппа В. Если на 142 сут он не определялся, то после второй инъекции достоверные различия ($P=0,95$) между значениями СГТ к компонентам А/(H1N1)pdm09 и В/Victoria отсутствуют (рис. 3В). Максимальное значение СГТ к антигену В/Colorado/06/17 (В/Victoria) составило 1:2413 в группе, иммунизированной комплексом 7,5 мкг антигена +

0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-ВК. Существенным образом выросли титры к А/(H3N2) компоненту. У некоторых животных, иммунизированных препаратами, содержащими ИСКОМ адъювант, титры были 1:20480, что для реакции торможения гемагглютинации можно назвать рекордными значениями. Значения СГТ к компоненту А/(H3N2) в конкретной группе животных, иммунизированных с ИСКОМ адъювантом, были в 4–7 и 4,6–8,3 раза выше, чем к компонентам А/(H1N1)pdm09 и В/Victoria соответственно. Сравнивая экспериментальные группы и группы положительного контроля, можно заключить, что в ответ на введение препаратов с ИСКОМ адъювантом значения СГТ в РТГА были выше в 4,6–12,1 раза в зависимости от типа антигена (рис. 3В).

Ранее полученные экспериментальные данные, а также данные, представленные в требованиях методических указаний, позволяют считать титры 1:40–1:80 протективными, а титры 1:320 и выше защищающими не только от тяжелого течения гриппа, но и от заражения [16]. Нами определены титры кросс-реактивности сывороток, полученных в этой работе, в РТГА с антигенами штаммов вирусов гриппа, ранее

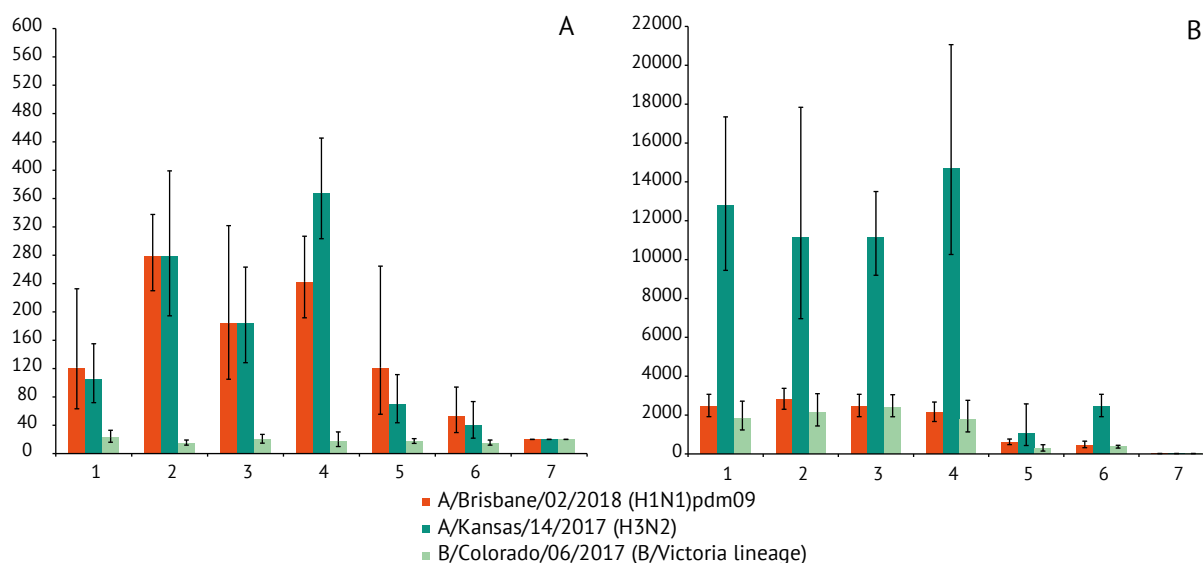


Рис. 3. Данные реакции торможения гемагглютинации с образцами сыворотки крови иммунизированных интраперитонеально мышей, взятыми на 142 сутки после иммунизации (А) и на 28 сутки после повторной иммунизации (170 сутки после иммунизации) (В). Ось абсцисс — группы экспериментальных животных: 1 — Матрикс-ВР + 7,5 мкг антигена; 2 — Матрикс-ВР + 2 мкг антигена; 3 — Матрикс-ВQ + 7,5 мкг антигена; 4 — Матрикс-ВQ + 2 мкг антигена; 5 — 7,5 мкг антигена; 6 — 2 мкг антигена; 7 — Матрикс-ВQ без антигена (отрицательный контроль). Ось ординат — среднее геометрическое значений обратных титров антител. В легенде указаны антигены вирусов гриппа, использованные для иммунизации. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала при $P=0,95$.

Fig. 3. Data on haemagglutination inhibition in mouse serum samples taken on 142 day after intraperitoneal immunization (A) and 28 day after boosting second immunization (170 day after immunization) (B). The X-axis shows the experimental animal groups: (1) Matrix-BP + 7.5 μ g of each antigen; (2) Matrix-BP + 2 μ g of each antigen; (3) Matrix-BQ + 7.5 μ g of each antigen; (4) Matrix-BQ + 2 μ g of each antigen; (5) 7.5 μ g of each antigen; (6) 2 μ g of each antigen; (7) the negative control group of Matrix-BQ without antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The legend indicates the influenza virus antigens used for immunisation. Whiskers reflect confidence intervals at $P=0.95$.

использовавшимися для производства вакцин, эпидемическими штаммами, выделенными в культуре клеток от людей с диагнозом грипп, и допандемическим штаммом A/Solomon Islands/03/06 (H1N1). Результаты определения значений СГТ представлены в таблице 1.

Оценка эффективности внутримышечной иммунизации мышей иммуностимулирующими комплексами

Значения титров антител в образцах сыворотки крови мышей, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген с адъювантом Матрикс-ВQ, взятых на 21 сут после внутримышечной иммунизации, а также значения титров антител в образцах сыворотки крови контрольных животных, определенные в РТГА, представлены на рисунке 4А. Животные экспериментальных групп, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексом 1 мкг антигена + Матрикс-ВQ или комплексом 5 мкг антигена + Матрикс-ВQ, в РТГА против четырех антигенов A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Washington/02/2019 (B/Victoria), B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata) имели протективные значения СГТ 1:40 и выше.

В группе животных, иммунизированных комплексом ИСКОМ-антиген в дозе 200 нг антигена + Матрикс-ВQ, протективное значение СГТ 1:92 наблюдалось для A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09. Для остальных антигенов детектируемые в РТГА титры фиксировались у единичных животных. В группе мышей, иммунизированных комплексом ИСКОМ-антиген в дозе 50 нг антигена + Матрикс-ВQ, только у одного животного в РТГА детектировались титры к антигенам A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09 и B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), которые, тем не менее, не достигали уровня 1:40. У мышей из этой группы не было выявлено титров к остальным антигенам. В группах положительного и отрицательного контролей антитела в сыворотке крови не детектировались в РТГА.

Значения титров антител в образцах сыворотки крови мышей, иммунизированных антигенами с ИСКОМ адъювантом Матрикс-ВQ, взятых на 42 сут после первой иммунизации (повторная иммунизация проводилась на 21 сут после первой), а также значения титров антител в образцах сыворотки крови контрольных животных, определенные в РТГА, представлены

Таблица 1. Результаты реакции торможения гемагглютинации в образцах сыворотки крови мышей, двукратно интраперитонеально иммунизированных 7,5 мкг или 2 мкг антигена вируса гриппа каждого субтипа (A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09; B/Colorado/06/2017 (B/Victoria); A/Kansas/14/2017 (H3N2)) в составе препарата ИСКОМ Матрикс-BQ

Table 1. Results of haemagglutination inhibition reactions in serum samples of mice immunised twice intraperitoneally with 7.5 µg or 2 µg of each haemagglutinin of A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09, B/Colorado/06/2017, and A/Kansas/14/2017 (H3N2) influenza strains, adjuvanted with Matrix-BQ

Штамм, использованный в РТГА в качестве антигена <i>Strains used as HI antigens</i>	Значения СГТ антител в образцах сыворотки крови животных, иммунизированных препаратами <i>Serum antibody GMTs in animals immunised with the preparations</i>	
	Матрикс-BQ + 7,5 мкг антигена ^а <i>Matrix-BQ + 7.5 µg antigen^a</i>	Матрикс-BQ + 2 мкг антигена ^а <i>Matrix-BQ + 2 µg antigen^a</i>
A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09 ^б	2425 (3068–1917)	2111 (2671–1668)
A/YANAO/1/2019 (H1N1)pdm0 ^с	5382 (7558–3832)	4525 (6699–3057)
A/Russia/01/2009 (H1N1)pdm09 ^с	3675 (5884–2295)	3200 (4335–2361)
A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09	800 (1393–459)	566 (837–382)
A/Solomon Islands/03/06 (H1N1) ^д	113 (167–76)	57 (84–38)
A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) ^д	<20	<20
A/Kansas/14/2017 (H3N2) ^б	11143 (13503–9195)	14703 (21063–10264)
A/Texas/50/2012 (H3N2)	673 (1289–351)	1600 (2786–919)
A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	2690 (3779–1916)	3805 (5344–2710)
A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	283 (419–191)	400 (696–230)
B/Colorado/06/2017 (B/Victoria) ^б	2414 (3046–1913)	1766 (2759–1130)
B/Brisbane/60/2008 (B/Victoria)	1903 (2672–1355)	2263 (5439–941)
B/Washington/02/2019 (B/Victoria)	226 (335–153)	452 (893–229)
B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata)	<20	<20

Примечание. РТГА — реакция торможения гемагглютинации; СГТ — среднее геометрическое титров антител.

^а Доверительный интервал при $P=0,95$.

^б Гомологичные вакцинные штаммы, использованные при иммунизации.

^с Изоляты вируса гриппа «дикого» типа, выделенные в культуре клеток MDCK.

^д Штаммы являются допандемическими.

Note. HI—haemagglutinin inhibition reaction; GMT—geometric mean antibody titre.

^а Confidence intervals are at $P=0.95$.

^б Homologous vaccine strains used for immunisation.

^с Wild-type influenza virus isolates obtained in MDCK.

^д Prepandemic strains.

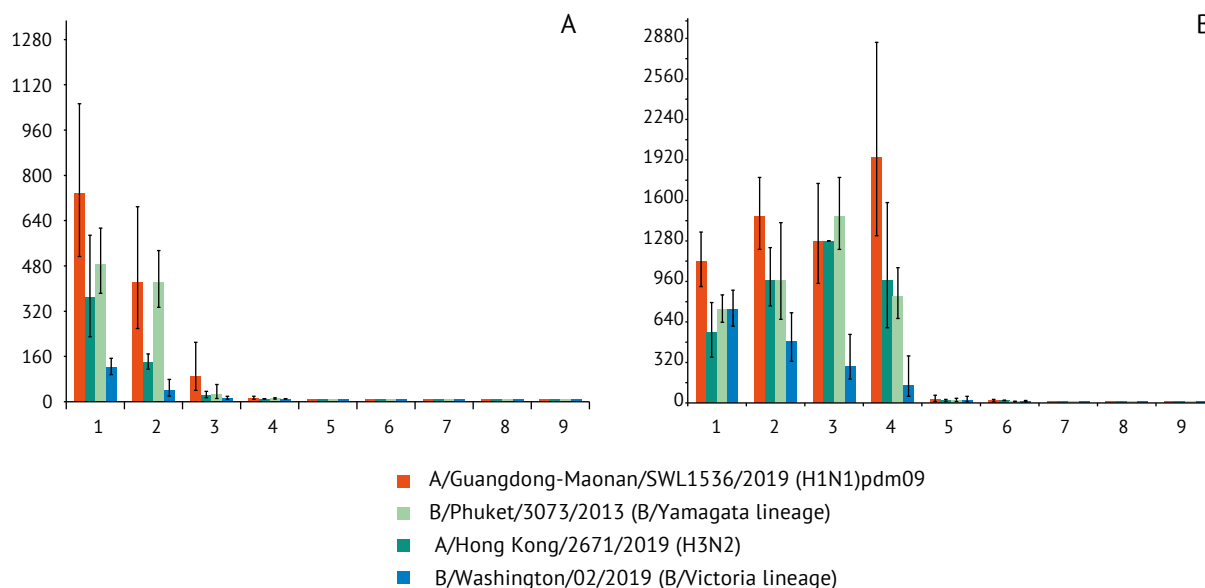


Рис. 4. Данные реакции торможения гемагглютинации с образцами сыворотки крови иммунизированных внутримышечно мышей, взятыми на 21 (А) и 42 (В) сутки после иммунизации. Ось абсцисс — группы экспериментальных животных: 1 — Матрикс-BQ + 5 мкг антигена; 2 — Матрикс-BQ + 1 мкг антигена; 3 — Матрикс-BQ + 200 нг антигена; 4 — Матрикс-BQ + 50 нг антигена; 5 — 5 мкг антигена; 6 — 1 мкг антигена; 7 — 200 нг антигена; 8 — 50 нг антигена; 9 — Матрикс BQ без антигена (отрицательный контроль). Ось ординат — среднее геометрическое значений обратных титров антител. В легенде указаны антигены вирусов гриппа, использованные для иммунизации. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала при $P=0,95$.

Fig. 4. Data on haemagglutination inhibition in mouse serum samples taken on days 21 (A) and 42 (B) after intramuscular immunisation. The X-axis shows the experimental animal groups: (1) Matrix-BQ + 5 µg of each antigen; (2) Matrix-BQ + 1 µg of each antigen; (3) Matrix-BQ + 200 ng of each antigen; (4) Matrix-BQ + 50 ng of each antigen; (5) 5 µg of each antigen; (6) 1 µg of each antigen; (7) 200 ng of each antigen; (8) 50 ng of each antigen; (9) the negative control group of Matrix-BQ without antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The legend indicates the influenza virus antigens used for immunisation. Whiskers reflect confidence intervals at $P=0.95$.

на рисунке 4В. Значения СГТ антител в образцах сыворотки крови животных из экспериментальных групп, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексом 1, 0,2 или 0,05 мкг каждого антигена с адъювантом Матрикс-BQ, после повторной иммунизации достоверно ($P=0,95$) выросли против всех четырех использованных антигенов. Наибольший рост значений титров зафиксирован в группе мышей, иммунизированных комплексом 0,05 мкг антигена + Матрикс-BQ, который составил 147, 95, 73 и 24 раза соответственно против A/(H1N1)pdm09, A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Victoria, B/Yamagata антигенов. В группах животных, внутримышечно иммунизированных препаратами антигенов в дозе 5 и 1 мкг без ИСКОМ адъюванта, не наблюдалось достоверного нарастания значений титров, а в группах, иммунизированных 0,2 и 0,05 мкг, антитела не детектировались в РТГА. Рассматривая вопрос достоверности различий между экспериментальными группами, необходимо отметить, что различия детектировались только между значениями СГТ антител против некоторых антигенов в некоторых группах. То есть в совокупности можно сде-

лать заключение, что при двукратном введении препаратов ИСКОМ-антиген в предложенных концентрациях дозозависимого эффекта не наблюдалось и введение 50 нг антигена вызывает ответ, схожий с ответом на введение 5 мкг.

Результаты оценки выживаемости экспериментальных животных, иммунизированных внутримышечно, инфицированных адаптированным штаммом вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1)pdm09, на 42 сут после первой иммунизации представлены на рисунке 5. Гибель животных из группы отрицательного контроля фиксировалась с 4 сут после заражения. На 9 сут 100% животных погибли. Также гибель животных на 8–15 сут после заражения фиксировалась в группе, дважды иммунизированной препаратом без ИСКОМ адъюванта, смесью антигенов по 50 нг гемагглютинаина штаммов A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Washington/02/2019, B/Phuket/3073/2013. Неожиданно, но в группе животных, иммунизированных дважды препаратом без ИСКОМ адъюванта, содержащим 200 нг каждого гемагглютинаина, притом, что ни у одного животного

не фиксировалось титров антител методом РТГА, гибели мышей не наблюдалось.

У выживших животных на 27 сут после заражения были отобраны пробы крови, и сыворотка была исследована в РТГА. Значения титров к компоненту A/(H1N1)pdm09 представлены на рисунке 6. Были определены значения титров к исследовавшимся четырем компонентам, но достоверные различия со значениями титров до заражения зафиксированы только для компонента A/(H1N1)pdm09. Для животных, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген в дозе 5 мкг, 1 мкг, 200 нг, 50 нг, имевших высокие титры антител в РТГА перед заражением, характерно снижение титров. На основании статистически достоверных различий ($P=0,95$) можно сделать вывод о том, что в группах мышей, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексом 5 мкг антигена + Матрикс-BQ и комплексом 50 нг антигена + Матрикс-BQ, падение значений СГТ антител составило 1,52 и 2,3 раза соответственно. В то же время у животных, иммунизированных препаратом без ИСКОМ адъюванта, титры значительно выросли. В группе животных,

иммунизированных препаратом в дозе 50 нг без ИСКОМ адъюванта, выжило 2 животных. В группе отрицательного контроля (Матрикс BQ без антигена) все животные погибли.

Обсуждение

Данные, обсуждаемые в этом исследовании, получены при интраперитонеальной и внутримышечной иммунизации мышей препаратами ИСКОМ-антиген в сравнении с антигенами без ИСКОМ адъюванта. Эти модели дают ряд преимуществ, таких как доступность линейных животных, возможность введения препарата в объеме, рассчитанном исходя из предполагаемого введения человеку, и др. В то же время при внутримышечном введении возможен иной уровень ответа по сравнению с интраперитонеальным, и для этого были изготовлены препараты с небольшим объемом введения.

Растительные сапонины давно известны и применяются в медицине. С развитием иммунологии стали известны уникальные особенности сапонинов, которые обуславливают выраженные адъювантные свойства, в основном

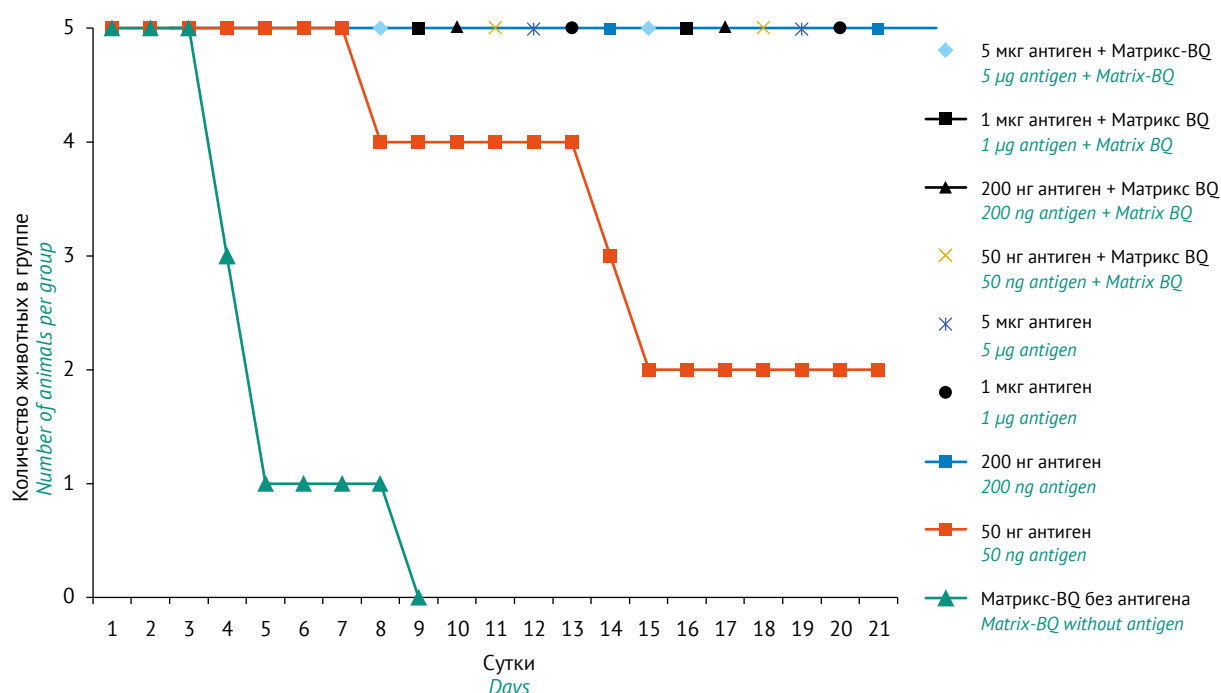


Рис. 5. Выживаемость экспериментальных животных, двукратно иммунизированных внутримышечно, после заражения адаптированным штаммом вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1)pdm09. В легенде приведены наименования групп: указана доза каждого гемагглютинина в смеси штаммов A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2), B/Washington/02/2019, B/Phuket/3073/2013 в комплексе с компонентом ИСКОМ Матрикс-BQ или без него, а также отрицательный контроль — Матрикс-BQ без антигена.

Fig. 5. Survival rates of experimental animals infected with mouse-adapted A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 after two intramuscular immunisations. The legend names the study groups, indicating haemagglutinin concentrations of each strain (A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09; A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2); B/Washington/02/2019; B/Phuket/3073/2013) in the mixtures with or without Matrix-BQ, and the negative control group of Matrix-BQ without antigens.

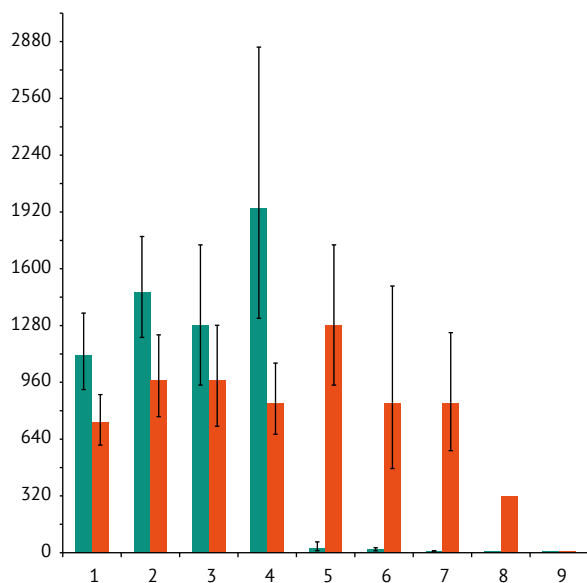


Рис. 6. Данные реакции торможения гемагглютинации с образцами сыворотки крови иммунизированных двукратно внутримышечно мышей, инфицированных адаптированным летальным штаммом вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1)pdm09. Ось абсцисс – группы экспериментальных животных: 1 – Матрикс-BQ + 5 мкг антигена; 2 – Матрикс-BQ + 1 мкг антигена; 3 – Матрикс-BQ + 200 нг антигена; 4 – Матрикс-BQ + 50 нг антигена; 5 – 5 мкг антигена; 6 – 1 мкг антигена; 7 – 200 нг антигена; 8 – 50 нг антигена; 9 – Матрикс BQ без антигена (отрицательный контроль). Ось ординат – среднее геометрическое значений обратных титров антител. На гистограмме указаны данные о титрах антител до заражения животных штаммом A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 (■) и после заражения (■). Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала при $P=0,95$.

Fig. 6. Data on haemagglutination inhibition reactions in mice serum samples after two intramuscular immunisations and infection with the A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 strain adapted and lethal to mice. The X-axis shows the experimental animal groups: (1) Matrix-BQ + 5 μ g of each antigen; (2) Matrix-BQ + 1 μ g of each antigen; (3) Matrix-BQ + 200 ng of each antigen; (4) Matrix-BQ + 50 ng of each antigen; (5) 5 μ g of each antigen; (6) 1 μ g of each antigen; (7) 200 ng of each antigen; (8) 50 ng of each antigen; (9) the negative control group of Matrix-BQ without antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The boxes indicate antibody titres to A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 before (■) and after infection (■). Whiskers reflect confidence intervals at $P=0.95$.

обусловленные Th1 иммунным ответом [17]. В ходе исследования было установлено, что единообразно стандартизованные и полученные по одной технологии на основе сапонинов Синюхи голубой и Квиллайи мыльной иммуностимулирующие комплексы обладают аналогичными свойствами.

Образцы сыворотки крови, полученные в после интраперитонеального введения комплексов ИСКОМ с антигенами вируса гриппа, имеют сопоставимые значения титров. Коммерчески доступны сапонины Квиллайи мыльной. Сапо-

нины Синюхи голубой могут быть получены в больших количествах, так как это растение пригодно для промышленного культивирования. Данные адъюванты показали перспективные свойства с точки зрения производственных стратегий, предполагающих рациональное использование антигенов. Даже после однократного интраперитонеального введения, на 28 сут после иммунизации, препараты ИСКОМ-антиген, содержавшие комплексы 0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-BP или 0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-BQ с 2 мкг гемагглютинаина каждого вакцинного штамма A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09, A/Kansas/14/2017 (H3N2), B/Colorado/06/2017, вызвали достоверное кратное увеличение титров по сравнению с введением антигена (7,5 мкг антигена) без ИСКОМ адъюванта. В экспериментальных работах, проведенных ранее, было показано, что антитела в титре в РТГА более 1:320 к антигену (H1N1)pdm09 способны защищать животное от заражения вирусом гриппа данного подтипа, а значения титров более 1:40 – от гибели [16]. Полученные в этом исследовании результаты свидетельствуют о том, что от летального исхода при заражении адаптированным к мышам штаммом вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1)pdm09 защищает иммунизация такими концентрациями антигенов, ответ на которые не фиксируется в РТГА, то есть менее 1:10. Несмотря на то что гриппозные антигены, производимые в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), могут иметь серологические отличия от эпидемических штаммов и их культуральных изолятов, иммунный ответ, формируемый на двукратное внутримышечное введение таких низких доз антигенов, полученных с использованием РКЭ, как 0,2 мкг, не приводящий к выработке антител в количествах, детектируемых в РТГА, может являться протективным и предотвращать гибель экспериментальных животных при заражении культуральным штаммом вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1)pdm09, прошедшим 8 пассажей на мышах.

После двукратного введения препаратов ИСКОМ-антиген у мышей сформировались такие высокие титры антител в сыворотке крови, уровень которых гипотетически может способствовать формированию стерилизующего иммунитета к вирусам гриппа, при достижении которого можно было бы стремиться к эрадикации гриппа наравне с корью и полиомиелитом при широком распространении такого типа вакцин. Это требует подтверждения в экспериментах с использованием более крупных животных, у которых возможно взятие назальных смывов для количественных исследований репликации вируса.

Можно предположить возможность рассмотрения вопроса об универсальной гриппозной вакцине. В настоящее время под универсальной вакциной в основном понимают препарат равноэффективный в отношении всех вирусов гриппа в течение продолжительного периода времени. Для этих целей рассматривают возможность иммунизации высококонсервативными компонентами вириона — матриксным белком или нуклеопротеином [18]. Серологический анализ, проведенный нами в данном исследовании, показывает, что при использовании препаратов ИСКОМ-антиген антитела имеют кросс-реактивность к циркулировавшим ранее штаммам гриппа на протективном уровне. Наиболее ярким свидетельством этого является то, что значения СГТ антител к допандемическому штамму A/Solomon Islands/03/06 (H1N1) при двукратной интраперитонеальной иммунизации антигенами, входившими в вакцину сезона 2019–2020 гг., составили 113,2 (167,5–76,5) и 56,6 (83,7–38,2) для групп животных, иммунизированных препаратами ИСКОМ-антиген: комплексами 7,5 и 2 мкг каждого антигена и 0,1 ИМЛД₅₀ Матрикс-BQ соответственно. Эти значения статистически неразличимы со значениями титров антител к использовавшемуся при иммунизации штамму A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09 на 28 сут в группе животных, однократно интраперитонеально иммунизированных вакциной в дозе 7,5 мкг. Штаммы разделяет не только 12-летний интервал циркуляции, но и то, что предшественник A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09 в это время циркулировал в популяциях свиней.

Также заслуживает внимания факт, что образцы сыворотки крови мышей, полученные при иммунизации компонентом вакцины B/Colorado/06/2017 (B/Victoria), имеют значения СГТ антител к штамму B/Brisbane/60/2008 (Victoria) в интервале 1:1902,7–1:2262,7 в зависимости от группы животных, и эти титры статистически неразличимы ($P=0,95$) в сравнении с титрами к гомологичному штамму B/Colorado/06/2017 (B/Victoria). Для исследованных негомологичных штаммов подтипа H3N2 значения СГТ антител были ниже по сравнению со значениями титров в РТГА со штаммом A/Kansas/14/2017 (H3N2), использовавшимся при иммунизации, но они также позволяют говорить не только о протективном, но и, вероятно, стерилизующем иммунитете для временного интервала 10 лет.

Отдельно стоит обратить внимание на данные по кросс-реактивности полученных сывороток с изолятами вируса гриппа «дикого» типа, выделенными на клеточной культуре MDCK.

Для исследованных в этой работе антигенов штаммов A/(H1N1)pdm09 нет достоверных различий между образцами, полученными в РКЭ, и культуральными изолятами, циркулировавшими 11 лет назад (табл. 1). В Российской Федерации производство инактивированных гриппозных вакцин основано на культивировании штаммов-продуцентов в РКЭ. За счет адаптации к клеткам птиц вирус изменяется, и после иммунизации наблюдается снижение кросс-реактивности с изолятами вируса гриппа «дикого» типа. Анализ образцов сыворотки крови, полученных в этом исследовании при иммунизации мышей антигенами, полученными в РКЭ, в составе комплекса ИСКОМ-антиген, показал, что между значениями СГТ, определенными при постановке РТГА с использованием штаммов-продуцентов, адаптированных к РКЭ, и «диких» культуральных изолятов подтипа A/(H1N1)pdm09 не выявляется статистически достоверных различий. Эти данные сопоставимы с аналогичными результатами, полученными ранее [19, 20].

Заключение

В результате выполнения данной работы создана лабораторная технология получения ИСКОМ адъювантов с использованием сапонинов Синюхи голубой и Квиллайи мыльной. Структура препаратов была изучена с помощью электронной микроскопии, установлена идентичность ИСКОМ адъюванта Матрикс-BQ адъюванту Matrix-M (Novavax, США). Исследование биологических свойств показало, что полученные нами препараты аналогичны адъювантам, используемым в производстве вакцины против COVID-19 NVX-CoV2373 и гриппозной вакцины NanoFlu (Novavax, США).

Результатом внедрения ИСКОМ адъювантов Матрикс-BQ и Матрикс-BP может стать существенное снижение потребности в антигенах вирусов при производстве вакцин. Опираясь на полученные данные, можно высказать предположение, что при использовании Матрикс-BP и Матрикс-BQ или аналогичных адъювантов возможно достигнуть экономии антигенов в 15–30 раз для препаратов, вводимых однократно, и 150–300 раз для препаратов, вводимых двукратно и более. Эффективность использования препаратов Матрикс-BP и Матрикс-BQ в разработке вакцин для профилактики инфекционных заболеваний, показанная в нашем исследовании, позволяет считать целесообразным рассмотрение возможности их применения также и при разработке иммунокорректирующих препаратов.

Литература/References

1. Morein B, Sundquist B, Höglund S, Dalsgaard K, Osterhaus A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*. 1984;308(5958):457–60. <https://doi.org/10.1038/308457a0>
2. Villacres MC, Behboudi S, Nikkila T, Lovgren-Bengtsson K, Morein B. Internalization of Iscom-borne antigens and presentation under MHC class I or class II restriction. *Cellular Immunology*. 1998;185(1):30–8. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1278>
3. Cibulski SP, Mourglia-Ettlin G, Teixeira TF, Quirici L, Roehe PM, Ferreira F, Silveira F. Novel ISCOMs from *Quillaja brasiliensis* saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine*. 2016;34(9):1162–71. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.029>
4. den Brok MH, Büll C, Wassink M, de Graaf AM, Wagenaar JA, Minderman M, et al. Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nat Commun*. 2016;7:13324. <https://doi.org/10.1038/ncomms13324>
5. Marty-Roix R, Vladimir GI, Pouliot K, Weng D, Buglione-Corbett R, West K, et al. Identification of QS-21 as an inflammasome-activating molecular component of saponin adjuvants. *J Biol Chem*. 2016;291(3):1123–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683011>
6. Barr IG, Mitchell GF. ISCOMs (immunostimulating complexes): the first decade. *Immunol Cell Biol*. 1996;74(1):8–25. <https://doi.org/10.1038/icb.1996.2>
7. Черникова МИ, Васильев ЮМ. Вакцины против гриппа с иммуoadъювантами: данные прямых сравнительных исследований. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015;(5):88–102. [Chernikova MI, Vasiliev YuM. Adjuvanted influenza vaccines: data from direct comparative studies. *Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2015;(5):88–102 (In Russ.)]
8. Shinde V, Cho I, Plested JS, Agrawal S, Fiske J, Cai R, et al. Comparison of the safety and immunogenicity of a novel Matrix-M-adjuvanted nanoparticle influenza vaccine with a quadrivalent seasonal influenza vaccine in older adults: a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(1):73–84. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00192-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00192-4)
9. Keech C, Albert G, Cho I, Robertson A, Reed P, Neal S, et al. Phase 1-2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N Engl J Med*. 2020;383:2320–32. <https://doi.org/10.1056/NEJ-Moa2026920>
10. Лioзнов ДА, Харит СМ, Ерофеева МК, Зубкова ТГ, Горчакова ОВ, Николаенко СЛ. Оценка реактогенности и иммуногенности вакцины гриппозной четырехвалентной инактивированной субъединичной. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018;17(3):57–62. [Lioznov DA, Kharit SM, Erofeeva MK, Zubkova TG, Gorchakova OV, Nikolaenko SL. Assessment of reactogenicity and immunogenicity of the quadrivalent live attenuated influenza vaccine. *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018;17(3):57–62 (In Russ.)] <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-3-57-62>
11. Никифорова АН, Миронов АН, Бушменков ДС, Меркулов ВА, Степанов НН. Безопасность и иммуногенность инактивированной гриппозной вакцины с адъювантом совидон производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2011;(2):30–4. [Nikiforova AN, Mironov AN, Bushmenkov DS, Merkulov VA, Stepanov NN. Safety and immunogenicity of inactivated influenza vaccine associated with sovidon, developing by «Microgen». *Epidemiologiya i vaccinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2011;(2):30–4 (In Russ.)]
12. Ko EJ, Kang SM. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(12):3041–5. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1495301>
13. Evseenko VA, Gudymo AS, Danilchenko NV, Onkhonova GS, Vu LT, Ryzhikov AB. Saponins extracted from *Polemonium caeruleum* have adjuvant activity in guinea pig intranasal immunization with trivalent influenza antigens. *Frontiers Drug Chemistry Clinical Res*. 2020;3:1–5. <https://doi.org/10.15761/FDC-CR.1000142>
14. El Barky AR, Hussein SA, Alm-Eldeen AA, Hafez YA, Mohamed TM. Anti-diabetic activity of *Holothuria thomasi* saponins. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:1472–87. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.002>
15. Ашмарин ИП, Воробьев АА. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Л.: Медгиз; 1962. [Ashmarin IP, Vorob'ev AA. *Statistical methods in microbiological research*. Leningrad: Medgiz; 1962 (In Russ.)]
16. Evseenko VA, Kolosova NP, Gudymo AS, Maltsev SV, Bulanovich JA, Goncharova NI, et al. Intranasal immunization of guinea pig with trivalent influenza antigen adjuvanted by *Cyclamen europaeum* tubers extract. *Arch Virol*. 2019;164(1):243–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4023-3>
17. Song X, Hu S. Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs. *Vaccine*. 2009;27(36):4883–90. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.033>
18. Nguyen QT, Choi YK. Targeting antigens for universal influenza vaccine development. *Viruses*. 2021;13(6):973. <https://doi.org/10.3390/v13060973>
19. Cox F, Saeland E, Baart M, Koldijk M, Tolboom J, Dekking L, et al. Matrix-M™ adjuvation broadens protection induced by seasonal trivalent virosomal influenza vaccine. *Virol J*. 2015;12:210. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0435-9>
20. Rimmelzwaan GF, Baars M, van Beek R, de Lijster P, de Jong JC, Claas EC, Osterhaus AD. Influenza virus subtype cross-reactivities of haemagglutination inhibiting and virus neutralising serum antibodies induced by infection or vaccination with an ISCOM-based vaccine. *Vaccine*. 1999;17(20–21):2512–6. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00063-8)

Вклад авторов. В.А. Евсеенко — разработка технологии и получение иммуностимулирующих вирусоподобных комплексов, существенный вклад в концепцию и дизайн работы; анализ, интерпретация результатов работы, написание текста рукописи; А.С. Гудымо — комплекс экспериментальных работ с лабораторными животными; Н.В. Данильченко — комплекс экспериментальных работ с лабораторными животными; С.В. Святченко — наработка и подготовка вируса гриппа, адаптированного к мышам, написание текста рукописи; О.С. Таранов — проведение комплекса электронно-микроскопических исследований; А.Б. Рыжиков — утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен Биоэтической комиссией № 1 при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол ГНЦ ВБ «Вектор»/03-04.2021).

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1665). Комплекс серологических исследований в данной работе был выполнен старшим научным сотрудником отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Дурымановым Александром Гавриловичем (1951–2021).

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

Authors' contributions. V.A. Evseenko—development of the production technology and production of the immune-stimulating virus-like complexes, a significant contribution to the concept and design of the work, analysis and interpretation of the results of the work, drafting of the manuscript; A.S. Gudymo—experimental work with laboratory animals; N.V. Danilchenko—experimental work with laboratory animals; S.V. Svyatchenko—development and preparation of the influenza virus adapted to mice, drafting of the manuscript; O.S. Taranov—electron microscopic studies; A.B. Ryzhikov—approval of the final version of the article for publication.

Ethics approval. The animal study protocol was approved by Bioethics Committee No. 1 of the SRC VB “Vector” (approval No. 03-04.2021).

Acknowledgements. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2019-1665).

The serologic studies reported in this article were performed by Alexander G. Durymanov (1951–2021), senior research scientist, Department of zoonotic diseases and influenza, SRC VB “Vector”.

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

Об авторах / Authors

Евсеенко Василий Александрович, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6720-1040>
evseenko_va@vector.nsc.ru

Гудымо Андрей Сергеевич. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6952-6412>
gudymo_as@vector.nsc.ru

Данильченко Наталья Викторовна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2655-4629>
daniilchenko_nv@vector.nsc.ru

Святченко Светлана Викторовна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4573-5783>
svyatchenko_sv@vector.nsc.ru

Таранов Олег Святославович, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
taranov@vector.nsc.ru

Рыжиков Александр Борисович, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7009-0748>
ryzhik@vector.nsc.ru

Vasily A. Evseenko, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6720-1040>
evseenko_va@vector.nsc.ru

Andrey S. Gudymo. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6952-6412>
gudymo_as@vector.nsc.ru

Natalia V. Danilchenko. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2655-4629>
daniilchenko_nv@vector.nsc.ru

Svetlana V. Svyatchenko. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4573-5783>
svyatchenko_sv@vector.nsc.ru

Oleg S. Taranov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
taranov@vector.nsc.ru

Aleksandr B. Ryzhikov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7009-0748>
ryzhik@vector.nsc.ru

Поступила 13.10.2021

После доработки 05.05.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Received 13 October 2021

Revised 5 May 2022

Accepted 10 June 2022

УДК 615.072:615.371:619.9

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-187-195>

Научная статья | Scientific article



Разработка технологии приготовления сухой питательной среды для производства сибиреязвенной вакцины

Д.А. Шаров, А.А. Лещенко ✉, Е.А. Коваленко, Д.В. Боровской, В.В. Крупин, С.В. Багин, Д.А. Мохов, А.Г. Лазыкин, И.В. Косенков, А.Н. Мошков

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), Октябрьский проспект, д. 119, Киров, 610000, Российская Федерация

✉ Лещенко Андрей Анатольевич; 23527@mil.ru

Резюме

В настоящее время при производстве вакцины сибиреязвенной живой для глубинного выращивания штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1 используется жидкая питательная среда, недостатками которой являются малый срок годности — не более одного месяца и узкий диапазон температуры ее хранения: от 2 до 8 °С. Сухие питательные среды (ПС) обладают рядом неоспоримых преимуществ: их можно хранить от 2 до 5 лет при температуре от 2 до 30 °С без консервантов; они транспортабельны, удобны в применении и стандартны в сохранении свойств. **Цель работы:** разработка технологии приготовления сухой ПС для производства сибиреязвенной вакцины. **Материалы и методы:** в исследованиях использовали вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 и ПС, состоящую из смеси ферментативного гидролизата казеина и раствора обработанного кукурузного экстракта в соотношении 70 и 30%, для культивирования сибиреязвенного микроба. Обезвоживание ПС осуществляли на установке распылительного типа. Экспериментальные серии сухой ПС оценивали по физико-химическим показателям на соответствие требованиям нормативной документации. Срок годности определяли методом «ускоренного старения». С использованием сухой ПС готовили вакцину сибиреязвенную живую и проводили оценку показателей качества препарата на соответствие требованиям нормативной документации. **Результаты:** разработана технология приготовления сухой ПС (скорость подачи ПС на сушку от 20 до 25 дм³/ч, давление сжатого воздуха в распылителе 0,02 МПа, температура воздуха на входе в сушильную камеру от 118 до 122 °С, температура воздуха на выходе — от 85 до 90 °С). По этой технологии получены 3 серии экспериментальной сухой ПС. Показано, что разработанная технология воспроизводима, а экспериментальные серии сухой ПС по изученным показателям отвечают предъявляемым требованиям. Срок годности сухой ПС, установленный с использованием метода «ускоренного старения», не менее 3 лет при температуре хранения от 2 до 30 °С. Экспериментально подтверждена возможность использования сухой ПС в технологии производства сибиреязвенной вакцины. Приготовленный препарат по основным показателям качества отвечает требованиям нормативной документации. **Выводы:** разработанная технология позволяет получить сухую ПС стандартную с увеличенным сроком хранения и удобную при использовании в производстве вакцины сибиреязвенной живой.

Ключевые слова: технология; ферментативный гидролизат казеина; кукурузный экстракт; питательная среда; сибиреязвенная вакцина; сушильная установка

Для цитирования: Шаров Д.А., Лещенко А.А., Коваленко Е.А., Боровской Д.В., Крупин В.В., Багин С.В., Мохов Д.А., Лазыкин А.Г., Косенков И.В., Мошков А.Н. Разработка технологии приготовления сухой питательной среды для производства сибиреязвенной вакцины. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):187–195. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-187-195>

© Д.А. Шаров, А.А. Лещенко, Е.А. Коваленко, Д.В. Боровской, В.В. Крупин, С.В. Багин, Д.А. Мохов, А.Г. Лазыкин, И.В. Косенков, А.Н. Мошков, 2022

Development of a technology for the preparation of a dry nutrient medium for anthrax vaccine production

D.A. Sharov, A.A. Leshchenko ✉, E.A. Kovalenko, D.V. Borovskoy, V.V. Krupin, S.V. Bagin, D.A. Mokhov, A.G. Lazykin, I.V. Kosenkov, A.N. Moshkov

Branch Office of the 48th Central Scientific Research Institute (Kirov), 119 Oktyabrsky Ave, Kirov 610000, Russian Federation

✉ Andrey A. Leshchenko; 23527@mil.ru

Abstract

Currently, submerged cultivation of the *Bacillus anthracis* STI-1 strain for live anthrax vaccine production requires liquid nutrient media, which have disadvantages of a short shelf life (no more than one month) and a narrow range of storage temperatures (2–8 °C). Dry media, in contrast, have a number of indisputable advantages: such media are transportable and easy to use, have a standard capability to retain properties, and can be stored without preservatives at 2–30 °C for 2–5 years. **The aim of this work** was to develop a technology for the preparation of a dry nutrient medium for anthrax vaccine production. **Materials and methods:** The study used the *Bacillus anthracis* STI-1 vaccine strain and a nutrient medium for its cultivation, containing a 70:30 mixture of an enzymatic digest of casein and a pre-processed corn extract solution. Drying of the nutrient medium was carried out on a spray-drying unit. The authors evaluated physicochemical parameters of experimental medium batches. The shelf life was determined by an accelerated stability study. The dry nutrient medium was used to produce a live anthrax vaccine. Quality attributes of the vaccine were assessed for compliance with regulatory requirements. **Results:** The authors developed the dry media production technology. According to it, the liquid nutrient medium is fed to the drying unit at a rate of 20–25 dm³/h. The spray air pressure is 0.02 MPa. Temperatures at the drying chamber inlet and outlet are 118–122 °C and 85–90 °C, respectively. The technology was used to obtain 3 experimental batches of the dry medium. The study results demonstrate that the technology is reproducible, and the tested quality attributes of experimental medium batches are consistent with the requirements. According to the accelerated stability study, the shelf life of the dry nutrient medium at 2–30 °C is at least 3 years. Experiments demonstrated the possibility of using the dry nutrient medium for live anthrax vaccine production. Critical quality attributes of the vaccine obtained with the medium met regulatory requirements. **Conclusions:** The developed technology allows for the production of a standard dry nutrient medium with a prolonged shelf life, which is convenient for live anthrax vaccine production.

Key words: production technology; enzymatic digest of casein; corn extract; nutrient medium; anthrax vaccine; drying unit

For citation: Sharov D.A., Leshchenko A.A., Kovalenko E.A., Borovskoy D.V., Krupin V.V., Bagin S.V., Mokhov D.A., Lazykin A.G., Kosenkov I.V., Moshkov A.N. Development of a technology for the preparation of a dry nutrient medium for anthrax vaccine production. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):187–195. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-187-195>

Введение

Сибирская язва относится к особо опасным инфекционным заболеваниям, которое встречается как в нашей стране, так и за рубежом¹. Одним из путей осуществления контроля за сибирской

язвой в Российской Федерации является совершенствование производства средств специфической профилактики надлежащего качества [1]. В Российской Федерации для профилактики сибирской язвы в соответствии с национальным

¹ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2021. https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/5fa/gd-seb_02.06-s-podpisyu_.pdf

календарем прививок по эпидемическим показателям используется вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения, выпускаемая ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России² [2].

Анализ технологии производства вакцины показал, что одной из наиболее критических стадий, влияющих на качество конечного продукта и стабильность выпуска препарата, является стадия приготовления питательной среды (ПС).

Для получения нативной споровой культуры *Bacillus anthracis* вакцинного штамма СТИ-1 используется жидкая ПС, содержащая в качестве питательной основы ферментативный гидролизат казеина (ФГК) и раствор обработанного кукурузного экстракта (КЭ). Приготовление ПС осуществляется в течение 48 ч перед глубинным культивированием на специально оборудованном участке. Несмотря на то что ПС обеспечивает питательные потребности сибиреязвенного микроба, для нее характерны отдельные недостатки, основными из которых являются малый срок годности – не более одного месяца и узкий диапазон температур хранения: от 2 до 8 °С³.

Современный рынок микробиологических питательных основ и сред⁴ представлен в подавляющем своем большинстве сухими формами препаратов⁵. Сухие ПС в отличие от жидких обладают целым рядом неоспоримых преимуществ: их можно хранить от 2 до 5 лет при температуре от 2 до 30 °С без консервантов; такие среды транспортабельны, удобны в применении и стандартны в сохранении физико-химических и биологических свойств⁶.

Все это определяет актуальность исследований по разработке технологии сухой формы ПС, внедрение которой в практику позволит повысить стабильность препарата и обеспечить непрерывность выпуска вакцины.

Цель работы – разработка технологии приготовления сухой ПС для производства сибиреязвенной вакцины.

Материалы и методы

Материалы:

- в исследованиях использовали вакцинный штамм *Bacillus anthracis* СТИ-1. Штамм получен из Государственной коллекции возбудителей бактериальных инфекций, используемых для разработки и оценки эффективности медицинских средств биологической защиты, филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров);
- жидкая ПС для культивирования сибиреязвенного микроба, состоящая из смеси ферментативного гидролизата казеина и раствора обработанного кукурузного экстракта в соотношении 70 и 30%.

Ферментативный гидролизат казеина и обработанный КЭ приготовлены на производственной базе организации и использованы в течение срока их годности.

Методы

Обезвоживание ПС, состоящей из смеси ФГК и раствора обработанного КЭ, осуществляли на установке распылительного типа А1-ФМУ (завод «Продмаш», г. Донецк).

Готовую сухую ПС оценивали по следующим физико-химическим показателям: «Внешний вид», «Растворимость», «Прозрачность и цветность», «Содержание общего азота и аминного азота», «Концентрация ионов водорода», «Потеря в массе при высушивании»⁷.

Предварительную оценку срока годности сухой ПС проводили методом «ускоренного старения»⁸. Метод «ускоренного старения» заключался в выдерживании испытуемой ПС при температурах, превышающих среднюю температуру хранения, с последующим изучением показателей ее качества. Срок годности вычисляли по формуле (1):

$$C = K \times C_3 = 2 \frac{t_3 - 20}{2} \times C_3, \quad (1)$$

где C – срок хранения (годности) при стандартных условиях, мес.; K – коэффициент соответствия

² Государственный реестр лекарственных средств (по состоянию на 06.05.2022). <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>

³ Промышленный регламент ПР № 08461522-26-19 на производство вакцины сибиреязвенной живой лиофилизата для приготовления суспензии для подкожного введения, накожного скарификационного нанесения. Утв. нач. НИЦ «48 ЦНИИ» Минобороны России, г. Киров; 2019.

⁴ Справочник по микробиологии Merck, 2021.

⁵ Питательные среды. Каталог продукции. <https://sredy-obolensk.ru/produkcija>

⁶ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11.08.2020 № 100 «О Фармакопее Евразийского экономического союза».

⁷ Методические указания МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.

⁸ Там же.

срока экспериментального хранения при повышенной температуре сроку хранения при стандартной температуре, равной 20 °С; C_3 — срок экспериментального хранения, мес.; 2 — принятое значение температурного коэффициента скорости химических реакций; t_3 — температура экспериментального хранения, °С.

За срок экспериментального хранения (C_3) принимали максимальное время хранения препарата при повышенных температурах, в течение которого все показатели качества находились в допустимых пределах. Срок годности препарата определяли как величину, рассчитанную по формуле (1) за вычетом 3 месяцев.

Сибиреязвенную вакцину готовили с использованием экспериментальной сухой ПС в соответствии с промышленным регламентом ПР 08461522-11-19⁹.

Изучение физико-химических и иммунологических свойств приготовленной вакцины сибиреязвенной живой выполняли методами, изложенными в нормативной документации (НД)¹⁰.

Испытания специфической безопасности и иммуногенности вакцины выполняли на лабораторных животных. Эксперименты проводили на морских свинках массой 275±25 г и кроликах массой 2–2,5 кг. В работе использовали здоровых животных, полученных из питомника филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров). Морских свинок и кроликов содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды в течение 10 суток. Эксперименты на животных осуществляли в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010¹¹.

Достоверность результатов оценивали с использованием критерия Стьюдента при уровне доверительной вероятности 0,95 [3].

Результаты и обсуждение

При разработке технологии приготовления ПС с улучшенными свойствами для производства сибиреязвенной вакцины осуществляли выбор способа и условий обезвоживания жидкой ПС, содержащей ФГК (70%) и раствор обработанного КЭ (30%).

При всем многообразии существующих способов обезвоживания и их аппаратного оформления наиболее производительным и эко-

номически целесообразным является сушка распылением. Специфические особенности данного процесса обезвоживания обуславливают возможность его использования для большинства термолабильных продуктов, и в том числе микробиологических питательных основ и сред [4].

Высушивание жидкой ПС проводили на распылительной сушильной установке типа А1-ФМУ с виброкипящим слоем гранул инертного материала.

В ходе отработки процесса были выбраны следующие технологические параметры: скорость подачи ПС на сушку от 20 до 25 дм³/ч, давление сжатого воздуха в распылителе 0,02 МПа, температура воздуха на входе в сушильную камеру от 118 до 122 °С, температура воздуха на выходе из сушильной камеры от 85 до 90 °С. Используя данный режим обезвоживания, получили три экспериментальные серии ПС. Поскольку сухая ПС для производства вакцины сибиреязвенной живой разрабатывалась впервые, то при оценке физико-химических показателей экспериментальных серий руководствовались требованиями МУК 4.2.2316-08 и ПР № 08461522-26-19. Результаты испытаний экспериментальных серий сухих ПС по физико-химическим показателям представлены в таблице 1.

Данные таблицы 1 свидетельствуют о том, что разработанная технология воспроизводима, а экспериментальные серии сухой ПС по изученным показателям отвечают предъявляемым требованиям.

Далее методом «ускоренного старения» определяли срок годности сухой ПС. Исследовались три экспериментальные серии сухой ПС, которые хранили в термостате при температуре, превышающей рекомендованную на 30 °С (50 °С). Перерасчет срока экспериментального хранения на срок годности сухой ПС при стандартных условиях выполняли по формуле (1).

В таблице 2 представлены результаты оценки физико-химических характеристик трех серий сухой ПС, хранившейся в условиях повышенной температуры.

Из представленных данных (табл. 2) следует, что по физико-химическим показателям образцы ПС, хранившиеся в течение 5 мес. при температуре 50 °С, сохраняют свою стабильность, а образцы с 6- и 7-месячным сроком хранения

⁹ Промышленный регламент ПР № 08461522-26-19 на производство вакцины сибиреязвенной живой лиофилизата для приготовления суспензии для подкожного введения, накожного скарификационного нанесения. Утв. нач. НИЦ «48 ЦНИИ» Минобороны России, г. Киров; 2019.

¹⁰ Нормативная документация Р N001273/01-161019 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения.

¹¹ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

Таблица 1. Результаты испытаний экспериментальных серий сухой питательной среды по физико-химическим показателям
Table 1. Results of testing experimental batches of the dry nutrient medium for physical and chemical parameters

Наименование показателя, ед. измерения <i>Parameter, measurement units</i>	Требование НД <i>Regulatory requirements</i>	Значение показателя для серии <i>Test results for batch No.</i>		
		1	2	3
Внешний вид ^а <i>Appearance^а</i>	Должно указываться физическое состояние, цветность <i>The physical form and colour of the medium should be indicated</i>	Порошок, цвет коричневый <i>A brown powder</i>		
Растворимость ^а <i>Solubility^а</i>	Количество препарата (г), необходимое для приготовления конкретной серии ПС, должно растворяться при перемешивании и, если необходимо, при кипячении в течение 2–3 мин <i>The amount (g) required for a batch of the nutrient medium should dissolve with stirring and, if necessary, boiling within 2–3 min</i>	ПС в количестве 2 г растворяется в 98 см ³ дистиллированной воды при кипячении в течение 1 мин <i>2 g of the nutrient medium dissolves in 98 cm³ of boiling distilled water within 1 min</i>		
Прозрачность и цветность ^а <i>Clarity and colour of solution^а</i>	Раствор ПС должен быть прозрачным, с указанием оттенка перед основным цветом <i>The nutrient medium solution should be clear. A shade is indicated before the main colour</i>	2% раствор ПС прозрачный, желто-коричневого цвета <i>2% solution of the nutrient medium is clear and yellow-brown</i>		
Потеря в массе при высушивании, % ^а <i>Loss on drying, %^а</i>	5,0, не более <i>No more than 5.0</i>	2,8	2,9	2,9
Содержание общего азота, % ^{а, б} <i>Total nitrogen, %^{а, б}</i>	От 8,5 до 11,5 <i>8.5 to 11.5</i>	9,6	10,6	10,2
Содержание аминного азота, % ^{а, б} <i>Amino-nitrogen, %^{а, б}</i>	От 2,5 до 4,5 <i>2.5 to 4.5</i>	3,3	4,2	4,4
Концентрация ионов водорода 2% водного раствора, ед. pH ^б <i>Concentration of hydrogen ions in 2 % aqueous solution, pH units^б</i>	От 7,4 до 8,0 <i>7.4 to 8.0</i>	7,8	7,8	7,9

Примечание. НД — нормативная документация; ПС — питательная среда.

^а Методические указания МУК 4.2.2316-08. Методы контроля бактериологических питательных сред. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.

^б Промышленный регламент ПР № 08461522-26-19 на производство вакцины сибиреязвенной живой лиофилизата для приготовления суспензии для подкожного введения, накожного скарификационного нанесения. Утв. нач. НИЦ «48 ЦНИИ» Минобороны России, г. Киров; 2019.

^а Guidelines MUK 4.2.2316-08. Methods for controlling bacteriological culture media. Moscow: Federal Centre for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2008.

^б Industrial regulation PR No. 08461522-26-19 for the production of lyophilised live anthrax vaccines for suspension for subcutaneous administration or scarification. Approved by the Head of the Branch Office of the 48th Central Scientific Research Institute, Kirov; 2019.

Таблица 2. Физико-химические показатели экспериментальных серий сухой питательной среды, хранившихся при повышенной температуре

Table 2. Physicochemical parameters of the experimental batches of the dry nutrient medium, stored at elevated temperatures

Наименование показателя, ед. измерения <i>Parameter, measurement units</i>	Требование НД <i>Regulatory requirements</i>	Номер серии <i>Batch number</i>	Срок экспериментального хранения / Срок хранения при стандартных условиях, мес. <i>Experimental shelf life / Shelf life under standard conditions, months</i>					
			0/0	3/24	4/32	5/40	6/48	7/56
Внешний вид ^а <i>Appearance^а</i>	Должны указываться физическое состояние, цветность <i>The physical form and colour of the medium should be indicated</i>	1	Мелкодисперсный гомогенный порошок коричневого цвета <i>A fine homogeneous brown powder</i>					
		2						
		3						
Растворимость ^а <i>Solubility^а</i>	Количество препарата (г), необходимое для приготовления конкретной серии ПС, должно растворяться при перемешивании и, если необходимо, при кипячении в течение 2–3 мин <i>The amount (g) required for a batch of the nutrient medium should dissolve with stirring and, if necessary, boiling within 2–3 min</i>	1	Препарат в количестве 2 г растворяется в 98 см ³ дистиллированной воды при кипячении в течение 1 мин <i>2 g of the nutrient medium dissolves in 98 cm³ of boiling distilled water within 1 min</i>				Препарат в количестве 2 г растворяется в 98 см ³ дистиллированной воды при кипячении в течение 4 мин <i>2 g of the nutrient medium dissolves in 98 cm³ of boiling distilled water within 4 min</i>	
		2						
		3						
Потеря в массе при высушивании, % ^а <i>Loss on drying, %^а</i>	5,0, не более <i>No more than 5.0</i>	1	2,8	3,2	3,3	3,7	4,0	4,0
		2	2,9	3,2	3,4	3,6	3,9	4,0
		3	2,9	3,2	3,3	3,6	4,0	4,1
Содержание общего азота, % ^б <i>Total nitrogen, %^б</i>	От 8,5 до 11,5 <i>8.5 to 11.5</i>	1	9,6	9,5	9,6	9,6	9,6	9,6
		2	10,6	10,6	10,5	10,5	10,6	10,6
		3	10,2	10,1	10,1	10,1	10,2	10,2
Содержание аминного азота, % ^б <i>Amino-nitrogen, %^б</i>	От 2,5 до 4,5 <i>2.5 to 4.5</i>	1	3,3	3,3	3,1	3,0	3,0	3,0
		2	4,2	4,2	4,1	4,2	4,1	4,2
		3	4,4	4,3	4,4	4,4	4,3	4,4
Концентрация ионов водорода 2% водного раствора, ед. pH ^б <i>Concentration of hydrogen ions in 2% aqueous solution, pH units^б</i>	От 7,4 до 8,0 <i>7.4 to 8.0</i>	1	7,8	7,8	7,7	7,7	7,1	7,0
		2	7,8	7,8	7,7	7,6	6,9	6,8
		3	7,9	7,8	7,7	7,6	6,9	6,8

Примечание. НД — нормативная документация; ПС — питательная среда.

^аМетодические указания МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.

^бПромышленный регламент ПР № 08461522-26-19 на производство вакцины сибиреязвенной живой лиофилизата для приготовления суспензии для подкожного введения, накожного скарификационного нанесения. Утв. нач. НИЦ «48 ЦНИИ» Минобороны России, г. Киров; 2019.

^аGuidelines MUK 4.2.2316-08. Methods for controlling bacteriological culture media. Moscow: Federal Centre for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор; 2008.

^бIndustrial regulation PR No. 08461522-26-19 for the production of lyophilised live anthrax vaccines for suspension for subcutaneous administration or scarification. Approved by the Head of the Branch Office of the 48th Central Scientific Research Institute, Kirov; 2019.

Таблица 3. Основные показатели качества серий вакцины сибиреязвенной живой, полученной с использованием экспериментальных серий сухой питательной среды

Table 3. Main quality attributes of live anthrax vaccine batches obtained using experimental batches of the dry nutrient medium

Наименование показателя, ед. измерения <i>Parameter, measurement units</i>	Требование нормативной документации <i>Regulatory requirements</i>	Значение показателя для серии <i>Test results for batch No.</i>		
		1	2	3
Описание <i>Description</i>	Пористая масса серовато-белого или желтовато-белого цвета с коричневатым оттенком. Восстановленный препарат — непрозрачная гомогенная суспензия серовато-белого или желтовато-белого цвета без посторонних включений <i>The lyophilised vaccine should be a porous grayish-white or yellowish-white mass with a brownish tint. The reconstituted vaccine should be an opaque homogeneous grayish-white or yellowish-white suspension free of foreign matter</i>	Пористая масса желтовато-белого цвета с коричневатым оттенком. Восстановленный препарат — непрозрачная гомогенная суспензия серовато-белого цвета без посторонних включений <i>The lyophilised vaccine is a porous grayish-white or yellowish-white mass with a brownish tint. The reconstituted vaccine is an opaque homogeneous greyish-white suspension free of foreign matter</i>		
Подлинность <i>Identification</i>	Должна содержать чистую культуру вакцинного штамма <i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>The vaccine should contain a pure culture of the B. anthracis STI-1 vaccine strain</i>	Содержит чистую культуру вакцинного штамма <i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>The vaccine contains a pure culture of the B. anthracis STI-1 vaccine strain</i>		
Время растворения, мин <i>Dissolution time, min</i>	5,0, не более <i>No more than 5.0</i>	3	3	2
Седиментативная устойчивость, мин <i>Sedimentation stability, min</i>	Суспензия не должна расслаиваться в течение 5 мин <i>The suspension should not separate within 5 min</i>	Суспензия не расслаивается в течение 5 мин <i>The suspension does not separate within 5 min</i>		
рН, ед. рН <i>pH, pH units</i>	От 6,8 до 8,3 <i>6.8 to 8.3</i>	7,8	7,9	7,8
Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	5,0, не более <i>No more than 5.0</i>	2,2	2,4	2,8
Средняя масса и отклонение от средней массы, % <i>Average mass and deviation from average mass, %</i>	5,0, не более <i>No more than 5.0</i>	1,9	2,1	1,9
Отсутствие посторонних бактерий и грибов <i>Bacteria and fungi</i>	Не должна содержать посторонних бактерий и грибов <i>The vaccine should not contain contaminating bacteria and fungi</i>	Вакцина не содержит посторонних бактерий и грибов <i>The vaccine does not contain contaminating bacteria and fungi</i>		
Специфическая безопасность <i>Specific safety</i>	Должна быть безопасной <i>The vaccine should be safe</i>	Вакцина безопасна <i>The vaccine is safe</i>		
Иммуногенность для морских свинок <i>Immunogenicity for guinea pigs</i>	Индекс иммунитета должен быть не менее 10000 <i>The immunity index should be at least 10000</i>	Индекс иммунитета 251000 <i>The immunity index is 251000</i>	Индекс иммунитета 398000 <i>The immunity index is 398000</i>	Индекс иммунитета 630000 <i>The immunity index is 630000</i>
Специфическая активность: <i>Potency:</i>				
1. Общая концентрация спор <i>1. Total spores</i>	4–6 млрд спор в ампуле <i>4–6 billion per ampoule</i>	5,1 млрд спор в ампуле <i>5.1 billion per ampoule</i>	5,3 млрд спор в ампуле <i>5.3 billion per ampoule</i>	4,8 млрд спор в ампуле <i>4.8 billion per ampoule</i>
2. Количество живых спор <i>2. Live spores</i>	Не менее 40% от общей концентрации <i>Not less than 40% of the total concentration</i>	53% от общей концентрации <i>53% of the total concentration</i>	62% от общей концентрации <i>62% of the total concentration</i>	67% от общей концентрации <i>67% of the total concentration</i>

не соответствуют требованиям НД по показателям растворимости и концентрации ионов водорода. Исходя из этого расчетный срок годности сухой ПС составил 36 мес.

На основе экспериментальных серий сухой ПС, хранившихся в течение 5 мес. при температуре 50 °С, были приготовлены три серии вакцины сибиреязвенной живой и проведена оценка показателей качества препаратов на соответствие требованиям НД¹². Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Все серии вакцины сибиреязвенной живой (табл. 3), приготовленные с использованием экспериментальных серий сухой ПС, хранившихся 5 мес. при температуре 50 °С, по основным показателям качества отвечают требованиям НД.

Таким образом, процесс распылительного обезвоживания позволяет приготовить сухую ПС на основе ФГК и КЭ, удовлетворяющую требованиям НД. Приготовленная таким образом сухая ПС обладает увеличенным сроком хранения и удобна

при использовании в производстве вакцины сибиреязвенной живой. На разработанную технологию получения сухой ПС получен патент [5].

Заключение

Разработанная технология распылительного обезвоживания питательной среды со следующими параметрами: скорость подачи питательной среды на сушку от 20 до 25 дм³/ч, давление сжатого воздуха в распылителе 0,02 МПа, температура воздуха на входе в сушильную камеру от 118 до 122 °С, температура воздуха на выходе от 85 до 90 °С позволяет получить сухую питательную среду, сохраняющую свои свойства при температуре от 2 до 30 °С в течение 3 лет.

Дальнейшие исследования целесообразно направить на разработку гранулированной формы питательной среды как более технологичной и удобной в производстве вакцины сибиреязвенной живой.

Литература/References

1. Попова АЮ, Ежлова ЕБ, Демина ЮВ, Куличенко АН, Рязанова АГ, Буравцева НП и др. Пути совершенствования эпидемиологического надзора и контроля за сибирской язвой в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017;(1):84–8. [Popova AYU, Ezhlova EB, Demina YuV, Kulichenko AN, Ryazanova AG, Buravtseva NP, et al. Ways to improve the epidemiological surveillance and control of anthrax in the Russian Federation. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(1):84–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-1-84-88>
2. Саяпина ЛВ, Бондарев ВП, Олефир ЮВ. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(2):107–10. [Sayapina LV, Bondarev VP, Olefir YuV. Current state of the vaccine prophylaxis of particularly dangerous infections. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(2):107–10 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-107-110>
3. Лакин ГФ. *Биометрия*. М.: Высшая школа; 1990. [Lakin GF. *Biometrics*. Moscow: High School; 1990 (In Russ.)]
4. Сазыкин ЮЮ, Орехов СН, Чакалева ИИ. *Биотехнология*. Катлинский АВ, ред. М.: «Академия»; 2014. [Sazykin YuYu, Orekhov SN, Chakaleva II. *Biotechnology*. Katlinsky AV, ed. Moscow: Academy; 2014 (In Russ.)]
5. Коваленко ЕА, Шаров ДА, Лещенко АА, Лазыкин АГ, Мохов ДА, Багин СВ и др. Способ получения питательного субстрата для выращивания сибиреязвенного микроба. Патент Российской Федерации № 2748307; 2021. [Kovalenko EA, Sharov DA, Leshchenko AA, Lazykin AG, Mokhov DA, Bagin SV, et al. Method for producing nutrient substrate for growing anthrax microbe. Patent of the Russian Federation № 2748307; 2021 (In Russ.)]

Вклад авторов. **Д.А. Шаров** — общее руководство исследования, окончательное редактирование текста рукописи; **А.А. Лещенко** — идея, концепция и дизайн исследования, теоретическое обоснование возможности создания технологии сухой среды для питательной производства сибиреязвенной вакцины; **Е.А. Коваленко** — экспериментальная работа по обоснованию условий хранения и определению срока годности сухой питательной среды, анализ и интерпретация результатов исследований, статистическая обработка результатов исследований; **Д.В. Боровской** — разработка дизайна исследования и окончательное утверждение версии рукописи для публика-

Authors' contributions. **D.A. Sharov**—general management of the study, final editing of the manuscript; **A.A. Leshchenko**—development of the study idea, concept and design, theoretical substantiation of the possibility of a technology for the preparation of dry nutrient media for the production of anthrax vaccines; **E.A. Kovalenko**—experimental justification of storage conditions and determination of the shelf life for the dry nutrient medium, and analysis, interpretation and statistical processing of the study results; **D.V. Borovskoy**—development of the study design and assistance in the final approval of the manuscript for publication; **V.V. Krupin**—participation in the development of the study design

¹² Нормативная документация Р N001273/01-161019 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения.

ции; **В.В. Крупин** — участие в разработке дизайна исследования и обсуждении полученных результатов; **С.В. Багин** — экспериментальная работа по выбору технологического оборудования и режима обезвреживания питательной среды, анализ и интерпретация результатов исследований; **Д.А. Мохов** — экспериментальная работа по определению показателей качества сухой питательной среды для производства сибиреязвенной вакцины и участие в корректировке текста статьи; **А.Г. Лазыкин** — экспериментальная работа по обоснованию условий хранения и определению срока годности сухой питательной среды, анализ и интерпретация результатов, оформление рукописи; **И.В. Косенков** — анализ литературы и участие в корректировке текста рукописи; **А.Н. Мошков** — экспериментальная работа по определению показателей качества полуфабрикатов и готового препарата — вакцины сибиреязвенной живой.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

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

and in the discussion of the obtained results; **S.V. Bagin**—experimental selection of the production equipment and dehydration mode for the nutrient medium, analysis and interpretation of the study results; **D.A. Mokhov**—experimental determination of the quality attributes of the dry nutrient medium for anthrax vaccine production, participation in the manuscript finalisation; **A.G. Lazykin**—experimental justification of storage conditions and determination of the shelf life for the dry nutrient medium, analysis and interpretation of the results, formatting of the manuscript; **I.V. Kosenkov**—literature review and participation in the manuscript finalisation; **A.N. Moshkov**—experimental determination of the quality attributes of intermediates and the finished live anthrax vaccine.

Acknowledgements. This study was carried out with no external funding.

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

Об авторах / Authors

Шаров Дмитрий Александрович, канд. техн. наук.
Лещенко Андрей Анатольевич, д-р техн. наук, проф.
SPIN-код РИНЦ: 8372-6969
23527@mil.ru

Коваленко Елена Александровна, канд. биол. наук.

Боровской Денис Витальевич, канд. биол. наук.

Крупин Владимир Викторович, канд. мед. наук.

Багин Сергей Валерьевич, канд. техн. наук.

Мохов Дмитрий Александрович, канд. биол. наук.

Лазыкин Алексей Геннадьевич, канд. биол. наук.

SPIN-код РИНЦ: 7269-0027

Косенков Иван Викторович.

Мошков Александр Николаевич.

Dmitry A. Sharov, Cand. Sci. (Techn.).

Andrey A. Leshchenko, Dr. Sci. (Techn.), Professor. SPIN-code: 8372-6969

23527@mil.ru

Elena A. Kovalenko, Cand. Sci. (Biol.).

Denis V. Borovskoy, Cand. Sci. (Biol.).

Vladimir V. Krupin, Cand. Sci. (Med.).

Sergey V. Bagin, Cand. Sci. (Techn.).

Dmitry A. Mokhov, Cand. Sci. (Biol.).

Aleksey G. Lazykin, Cand. Sci. (Biol.). SPIN-code: 7269-0027

Ivan V. Kosenkov.

Aleksandr N. Moshkov.

Поступила 27.10.2021

После доработки 18.05.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Received 27 October 2021

Revised 18 May 2022

Accepted 10 June 2022

УДК 615.072:616-097:579.841.95:604

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-196-207>

Научная статья | Scientific article



Разработка защитной среды высушивания и режима лиофилизации для стабилизации диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового

С.А. Курчева ✉, А.Г. Кошкидько, И.В. Жарникова, Д.В. Русанова, А.А. Семирчева, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова, М.М. Курноскина, И.С. Тюменцева

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Советская, д. 13–15, г. Ставрополь, 355035, Российская Федерация

✉ Курчева Светлана Александровна; kurcheva@yandex.ru

Резюме

Практическое применение эритроцитарных диагностических препаратов выявило недостатки, связанные с их транспортировкой на значительные расстояния с возможным несоблюдением режимов холодовой цепи, что может привести к полной потере их биологической активности. Для стабилизации основных свойств жидких форм эритроцитарных диагностических препаратов в настоящее время необходима разработка технологии получения лиофилизированных форм диагностикумов, которая позволит сохранить первоначальные свойства препарата в течение длительного времени. **Цель работы:** разработка защитной среды высушивания и режима лиофилизации для стабилизации диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового. **Материалы и методы:** были использованы вспомогательные вещества для подготовки защитных сред (желатин, тиомочевина, трегалоза, сахароза, декстран, твин 80). Для контроля чувствительности и специфичности лиофилизированных диагностикумов использовали 9 штаммов гомологичных и гетерологичных микроорганизмов разных родов и видов. При изучении стабильности основных показателей качества препаратов для диагностики *in vitro* (внешний вид высушенного препарата; потеря в массе при высушивании; растворимость, внешний вид восстановленного препарата; внешний вид препарата после оттаивания; чувствительность; специфичность) учитывали температуры различных климатических зон, в которых предполагается их реализация и использование. **Результаты:** разработаны и использованы стабилизирующие защитные среды с различным составом, с последующей сублимационной сушкой препарата и постановкой контрольных исследований. Наиболее перспективной признана среда высушивания для эритроцитарных диагностикумов, содержащая в своем составе меньшее количество ингредиентов – 6% декстрана, 0,06% твин 80 и азид натрия до 0,01%, как наиболее простая в исполнении и обеспечивающая полное сохранение качественных показателей препарата. Отработан рентабельный 12–14-часовой режим лиофилизации. **Выводы:** по совокупности полученных результатов изучения стабильности в реальном времени (долговременная стабильность) и ускоренном исследовании стабильности лиофилизированных форм диагностикума показана возможность хранения в течение двух лет при регламентированной температуре от 2 до 8 °С, а также в условиях повышенных и пониженных температур при 30±2 °С и минус 18 °С соответственно. Отрицательного влияния указанных температур на результаты контролируемых показателей не выявлено.

Ключевые слова: туляремия; среда высушивания; стабильность препаратов; реакция непрямой гемагглютинации; лиофилизация

© С.А. Курчева, А.Г. Кошкидько, И.В. Жарникова, Д.В. Русанова, А.А. Семирчева, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова, М.М. Курноскина, И.С. Тюменцева, 2022

Для цитирования: Курчева С.А., Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Русанова Д.В., Семирчева А.А., Старцева О.Л., Жданова Е.В., Курноскина М.М., Тюменцева И.С. Разработка защитной среды высушивания и режима лиофилизации для стабилизации диагностического эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):196–207. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-196-207>

Development of a protective lyophilisation medium and conditions to stabilise the erythrocyte diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin

S.A. Kurcheva ✉, A.G. Koshkidko, I.V. Zharnikova, D.V. Rusanova, A.A. Semircheva, O.L. Startseva, E.V. Zhdanova, M.M. Kurnoskina, I.S. Tyumentseva

Stavropol Antiplague Institute, 13–15 Sovetskaya St., Stavropol 355035, Russian Federation

✉ Svetlana A. Kurcheva; kurcheva@yandex.ru

Abstract

Liquid erythrocyte diagnostic preparations have a practical disadvantage; i.e., long-distance transportation involving possible non-compliance with cold-chain requirements may result in a complete loss of biological activity. A lyophilisation technology is necessary to ensure that the preparations retain their original properties for a long time. **The aim of the work** was to develop a protective medium and conditions for lyophilisation to stabilise the erythrocyte diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin. **Materials and methods:** Gelatin, thiourea, trehalose, sucrose, dextran, and Tween 80 were used as excipients for protective media. The authors used nine strains of homologous and heterologous microorganisms of different genera and species to control the lyophilised diagnostic preparation sensitivity and specificity. Evaluation of the main stability-related quality attributes (appearance of the dried preparation, loss on drying, solubility, appearance after reconstitution, appearance after settling, sensitivity, specificity) considered the temperatures specific to the climatic zones where the in vitro diagnostics is intended to be marketed and used. **Results:** The authors developed protective stabilising media with different compositions, used them in freeze-drying of the preparation and carried out control testing. The most promising was the lyophilisation medium containing a smaller amount of ingredients – 6% of dextran, 0.06% of Tween 80 and up to 0.01% of sodium azide—as it was the simplest one to prepare and ensured complete preservation of the quality attributes. The authors carried out practical evaluation of lyophilisation procedures, and the 12–14-hour procedure proved to be the most cost-effective. **Conclusions:** The results of long-term, or real time, and accelerated stability testing of the lyophilised diagnostic preparation demonstrated the possibility of two-year storage at a labelled temperature of 2–8 °C, as well as at elevated and low temperatures of 30±2 °C and –18 °C, respectively. The tests showed no negative effects of the temperatures on the controlled quality attributes.

Keywords: tularaemia; lyophilisation medium; stability; indirect hemagglutination test; lyophilisation

For citation: Kurcheva S.A., Koshkidko A.G., Zharnikova I.V., Rusanova D.V., Semircheva A.A., Startseva O.L., Zhdanova E.V., Kurnoskina M.M., Tyumentseva I.S. Development of a protective lyophilisation medium and conditions to stabilise the erythrocyte diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):196–207. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-196-207>

Введение

Туляремия — природно-очаговая зоонозная инфекция, которая занимает относитель-

но скромное место в структуре инфекционной патологии человека по уровню регистрируемой заболеваемости в Российской Федерации.

Актуальность проблемы определяется различными факторами и особенностями эпидемического проявления инфекции, возбудитель которой принадлежит к особо опасным микроорганизмам II группы патогенности (опасности), способен вызывать эпидемические проявления чрезвычайного характера и является потенциальным агентом биотерроризма [1–3].

В связи со сказанным лабораторная диагностика туляремии имеет важнейшее значение в комплексе противоэпидемических мероприятий и складывается из индикации и идентификации возбудителя или его специфических антигенов и определения сывороточных антител у человека и восприимчивых животных [4, 5]. При этом, как правило, на практике предпочтение отдается серологическим и молекулярно-генетическим методам, характеризующимся экспрессностью, высокой специфичностью, чувствительностью¹.

Несмотря на появление новых методов исследования в лабораторной диагностике инфекций, до сих пор остается актуальной реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)², обладающая высокой чувствительностью и простотой постановки [6].

Специалистами ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора разработана технология изготовления и осуществляется производство диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового в жидкой форме «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ» (срок годности 12 месяцев). Препарат допущен к обращению на территории Российской Федерации приказом Росздравнадзора³.

Основной и существенный недостаток эритроцитарных диагностикумов в жидкой форме связан со сложностью соблюдения условий хранения при транспортировке этих препаратов на значительные расстояния, при несоблюдении температурного режима возможна полная потеря биологической активности диагностикума. В связи с этим возникла необходимость в разработке условий стабилизации эритроцитарных диагностикумов. Наиболее доступным и перспективным методом является лиофильное высушивание, направленное на максимальное удаление свободной и частично связанной влаги. Сублимированные препараты сохраняют

первоначальные свойства в течение длительного периода хранения и становятся более устойчивыми к факторам внешнего воздействия, возникающим при их транспортировке конечному потребителю [7–9].

За последние несколько лет были проведены многочисленные исследования, которые показали, что этапы замораживания и сушки в процессе лиофилизации могут повлиять на структуру и функцию белков, что приводит к потере их активности и устойчивости [10–12]. Применение сред высушивания позволяет защитить диагностикумы при замораживании и лиофилизации. Следовательно, выбор состава защитных сред в оптимальной концентрации и выбор соответствующих параметров рабочего процесса во время лиофилизации имеют решающее значение для стабилизации белковых препаратов. Защитная среда должна иметь мелкопористую, достаточно плотную структуру, обязательно быть гидрофильной и характеризоваться невысокой концентрацией компонентов, так как в случае невыполнения этих условий увеличивается время процесса лиофилизации, а повышенный уровень остаточной влажности может снизить растворимость препарата.

Цель работы – разработка защитной среды высушивания и режима лиофилизации для стабилизации диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- осуществить подбор режима (условий) лиофильного высушивания и состава эффективных защитных сред, не влияющих на исходные свойства диагностического препарата;
- получить экспериментально-производственные серии лиофилизированной формы диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового и провести верификацию характеристик препарата после лиофилизации. Методом ускоренного исследования стабильности определить срок годности лиофилизированного эритроцитарного диагностикума;
- изучить долговременную стабильность функциональных характеристик (в соответствии со сроком годности) лиофилизированной формы диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового и стабильность

¹ Курчева С.А. Разработка биотехнологии производства иммунобиологических препаратов для диагностики туляремии и индикации ее возбудителя: дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь; 2011.

² Жарникова И.В. Методологические подходы и разработка биотехнологии иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных особо опасных заболеваний и детекции их возбудителей: дис. ... д-ра биол. наук. Ставрополь; 2004.

³ Регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый жидкий» («РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ») по ТУ 9388-023-01897080-2010 от 29.01.2014 № ФСР 2011/10271.

препарата при хранении в различных температурных режимах.

Материалы и методы

Материалы

Декстран (ApplChem, Германия); сахароза (Sigma-Aldrich, США); трегалоза 100% (Swanson, США); желатин (HiMedia Laboratories, Индия); твин 80 (Sigma-Aldrich, США); азид натрия (Molekula, Германия); хлорид натрия (ООО «ТД Малиновое Озеро», Россия); тиомочевина (Shandong Efirm Biochemistry and Environmental Protection Co., Ltd., Китай); питательная среда для культивирования и выделения туляреимного микроба сухая (FT-агар) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия); агар Альбими (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия); питательный агар для культивирования микроорганизмов, готовый к применению (агар Хоттингера) (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия); средство «Прогресс» по ТУ 2383-018-52662802-2002 с изм. № 1 (ООО «АМС Медиа», Россия); сыворотка диагностическая туляреимная сухая для реакции агглютинации по ТУ 8852-003-01898090-2010 (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия); натрия гидроокись (ООО «НПФ Невский химик», Россия); хлороформ очищенный (ПАО «Химпром», Россия); формалин (ООО ОХК «Щекиноазот», Россия); агар микробиологический (ООО «ЭКОлаб-Диагностика», Россия); вода дистиллированная (изготовлена по ГОСТ Р 58144-2018); набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляреимный иммуноглобулиновый жидкий («РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ») (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия).

При выполнении работы использовали: 50% взвесь формализированных эритроцитов барана (серии 1–18), прошедших внутренний контроль на гомогенность и отсутствие склонности к спонтанному склеиванию [13]; экспериментальные серии IgG (фракционированные из туляреимных сывороток каприловым методом), полученные в научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

При контроле специфичности и чувствительности лиофилизированного диагностикума использовали штаммы гомологичных (*Francisella tularensis holarctica* 15 НИИЭГ, *F. tularensis holarctica* Miura, *F. tularensis nearctica* Schu, *F. tularensis mediaasiatica* 55) и гетерологичных (*Brucella abortus* 544, *B. melitensis* 16-M, *B. suis* 1330, *Yersinia enterocolitica* 178, 383) микроорганизмов, находящиеся в рабочей коллекции научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Штаммы микроорганизмов обладали типичными культуральными, морфологическими, тинкториальными и другими биологическими свойствами. При работе руководствовались санитарными правилами и нормами⁴.

Перед постановкой РНГА подготавливали взвеси микроорганизмов в концентрации 1×10^8 м.к./мл с использованием отраслевого стандартного образца мутности бактериальных взвесей СОС 42-48-85⁵.

Оборудование и расходные материалы

Весы технические ALC 2100 d2 (ACCULAB, США); весы лабораторные электронные OHAUS Pioneer (OHAUS, КНР); микроскоп биологический Meiji Techno MT6000 (Meiji Techno, Япония); шкаф сушильный вакуумный ШСВ-45к (ОАО «Казанский завод медицинской аппаратуры», Россия); низкотемпературный стол (Elcold, Дания); рНметр Sartorius PB-11 (Sartorius, Германия); термостат электрический суховоздушный ТС-1/20 (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия); холодильник LCv 4010-24B-001 (Liebherr, Австрия); лиофильная сушка Alpha 2-4 LSCplus (Martin Christ, Германия); центрифуга SIGMA 6-K15 (Sigma Laborzentrifugen, Германия); настольный орбитальный шейкер с открытым типом платформы MaxQ2000 (Thermo Scientific, США); планшет полимерный иммунологический 72 лунки (ООО «ПФК Современные технологии», Россия); планшет полимерный для иммунологических реакций круглодонный 96-луночный (ОАО «Фирма Медполимер», Россия).

Методы

Сенсибилизация эритроцитов. Перед сенсибилизацией взвесь формализированных эритроцитов разводили 0,9% раствором хлорида натрия до концентрации 20%. Сенсибилизацию эритро-

⁴ СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4).

⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

цитов иммуноглобулинами класса G проводили в присутствии 2% раствора средства «Прогресс» при температуре 45 °С, pH 5,0 в течение 12 ч.

Контроль параметров эритроцитарного диагностикума. Контроль характеристик диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового лиофилизированного проводили по следующим параметрам.

Внешний вид. Пористая масса коричневого цвета, уплотненная в таблетку.

После растворения (в течение 1 мин) – гомогенная взвесь коричневого цвета. После отстаивания образуются два слоя: надосадов – прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость и осадок – плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании.

Определение потери в массе при высушивании. Контроль проводили весовым методом⁶. Потеря в массе при высушивании не должна превышать 3%.

Растворимость. В течение 1 мин содержимое ампулы с диагностикумом эритроцитарным туляремийным иммуноглобулиновым лиофилизированным должно полностью растворяться в 4,0 мл 0,9% раствора хлорида натрия.

Чувствительность. Диагностикум должен выявлять *F. tularensis* в концентрации $3,12 \times 10^6$ м.к./мл при постановке реакции непрямой гемагглютинации макрометодом и $6,25 \times 10^6$ м.к./мл при постановке реакции микрометодом.

Специфичность. При постановке РНГА со штаммами гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1,0 \times 10^8$ м.к./мл должно определяться отсутствие агглютинации.

Исследования чувствительности и специфичности проводили в РНГА микро- и макрометодом по стандартной методике⁷.

В ходе изучения стабильности препарата определяли сроки годности и возможные условия хранения диагностикума. Использовали регламентированные нормативными документами методы⁸ – исследование стабильности в реальном времени (долговременная стабильность) и ускоренное исследование стабильности.

Метод ускоренного исследования стабильности: образцы выдерживали при температу-

рах, превышающих температуру его хранения в процессе обращения: при температуре 27 ± 1 °С в течение 116 сут с контрольными испытаниями каждые 15 сут, при 37 ± 1 °С в течение 47 сут с контрольными испытаниями каждые 10 сут.

Температура экспериментального хранения ($t_{\text{э}}$) должна превышать температуру хранения ($t_{\text{хр}}$) не менее чем на 10 °С.

Сроки экспериментального хранения в зависимости от температурного интервала рассчитывали в соответствии с ОФС 1.1.0009.18⁹. Срок годности (С) рассчитывали по формуле зависимости Вант-Гоффа (1):

$$C = K \times C_{\text{э}}, \quad (1)$$

где K – коэффициент соответствия; $C_{\text{э}}$ – экспериментальный срок годности, сут.

Исследования долговременной стабильности: образцы хранили при регламентированной температуре от 2 до 8 °С, а также в условиях повышенных и пониженных температур при 30 ± 2 °С и минус 18 °С соответственно. При этом контрольные исследования проводили каждые шесть месяцев в течение первого года хранения и затем ежегодно на протяжении последующего периода испытаний.

Статистический анализ. Обработку и статистический анализ данных проводили с использованием языка программирования R для статистической обработки данных (версия 4.0.2). Анализ групповых различий проводили с использованием критерия Фишера. Значения представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Критическим уровнем статистической значимости различий установлено значение $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Подбор состава защитных сред для лиофилизации диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового

При составлении композиции защитных сред необходимо использовать несколько разных наполнителей для обеспечения разных или даже противоположных защитных функций. Вслед-

⁶ Общая фармакопейная статья 1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁷ Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. М.: ЗАО «Шико»; 2013.

⁸ ГОСТ Р ИСО 23640-2015. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*. М.: Стандартинформ; 2015.

Общая фармакопейная статья 1.1.0009.18 Стабильность и сроки годности лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁹ Общая фармакопейная статья 1.1.0009.18 Стабильность и сроки годности лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

ствие этого в экспериментальной работе нами были использованы различные ингредиенты как наиболее перспективные составляющие разрабатываемых сред. Поверхностно-активные вещества (ПАВ) использовали для снижения денатурации белков во время замораживания за счет уменьшения границы раздела лед-вода [14], а также для упрощения постановки реакции (исключения специальной разводящей жидкости). Углеводы за счет связывания с поверхностью биологического материала защищают препарат от повреждений при высыхании [15–17]. Так, углеводы с более высокой молекулярной массой обладают меньшим защитным эффектом, поскольку имеют меньше свободных гидроксильных групп, доступных для взаимодействия с белком [18, 19]. Поэтому в качестве эффективных лиопротекторов использовали дисахариды, такие как трегалоза и сахароза. Некоторыми исследователями было обнаружено, что добавление сахарозы к препаратам при лиофилизации приводит к сдвигу температуры плавления в сторону увеличения, обеспечивая таким образом эффективную защиту препарата [20, 21]. Для лиофилизации в составе защитных сред также успешно применяются коллоиды (желатин, агар, пептон, молоко и сыворотки). Как показали исследования, желатин обладает сильным защитным действием, что связано со способностью формировать при замораживании-высушивании аморфную фазу с низкой молекулярной подвижностью [22]. Из других коллоидов нужно отметить поливинилпирролидон и полиглюкин (6% раствор декстрана в физиологическом растворе). В качестве антиоксиданта в некоторые составы была добавлена тиомочевина [23]. Азид натрия использовали как консервант и антисептик.

При выполнении экспериментальных работ было изготовлено пять защитных сред для лиофилизации диагностикума следующего состава:

- состав 1 – желатин, тиомочевина, трегалоза;
- состав 2 – желатин, тиомочевина, сахароза;
- состав 3 – декстран;
- состав 4 – сахароза;
- состав 5 – тиомочевина, трегалоза, декстран.

Составы защитных сред делили на две группы, в первую (№ 1/1, 2/1, 3/1, 4/1, 5/1) добавляли: твин 80 – 0,06 г на рассчитанный объем, азид натрия до 0,01% и доводили pH растворов до 7,4 с помощью 5% раствора NaOH; во вторую группу (№ 1/2, 2/2, 3/2, 4/2, 5/2) добавляли только азид натрия в той же концентрации с доведением pH до 7,4. Ингредиентный состав разрабатываемых защитных сред, указан в таблице 1.

Далее сконструированные защитные среды смешивали с диагностикумом эритроцитарным

туляреминым иммуноглобулиновым. Объемное соотношение защитной среды к диагностикуму составляло 9:1. К предварительно полученным сенсibilизированным формализованным эритроцитам, осажденным центрифугированием (3000 об/мин, 5 мин), при постоянном перемешивании добавляли свежеприготовленные растворы сред высушивания. Для подготовки к последующей лиофилизации диагностикум суспендировали в защитной среде до концентрации 10% и разливали в ампулы по 1 мл.

Параметры этапов лиофилизации диагностикума эритроцитарного туляреминого иммуноглобулинового

Все стадии процесса лиофилизации – замораживание, сублимация, досушивание, герметизация – являются обязательными, и от правильно подобранных параметров всех этапов зависит получение стабильных препаратов без потери их специфической активности.

Начальный этап сублимационного высушивания – замораживание материала. Препараты замораживали в морозильной камере в течение 16–18 ч при температуре минус 40 °С для дальнейшего высушивания в лиофильной установке. Следует отметить, что диагностикум перед замораживанием должен находиться в защитных средах высушивания во взвешенном состоянии.

Замороженный препарат перегружали в вакуумную камеру сублимационной установки для проведения стадии первичной сублимации (первичной сушки). Стадия первичной сублимации инициируется возникновением вакуума в камере при постепенном нагреве замороженной матрицы в объеме, достаточном для сублимации льда. В течение этого периода необходимо установить правильный баланс между объемом подающегося тепла (теплопередачей) и сублимацией воды (массообменом), чтобы во время сушки не происходило чрезмерного перегрева замороженного материала и возникновения побочных явлений, таких как обратное плавление, вспучивание или разрушение (коллапс).

Стадия десорбции (вторичная сушка) начинается после сублимации льда и проходит при температуре выше нуля и более низком давлении для извлечения связанной влаги. На данном этапе должно быть обеспечено достижение определенных значений остаточной влажности лиофилизата, при которых препарат сохраняет стабильность.

В ходе экспериментов были апробированы следующие протоколы сушки: «умеренный» – 24±2 ч, «ускоренный» – 13±1 ч. Учитывая

Таблица 1. Ингредиентный состав защитных сред для диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового
Table 1. Ingredient composition of protective media for the erythrocyte diagnostic preparation of tularaemic immunoglobulin

Ингредиент <i>Ingredient</i>	Состав защитных сред <i>Composition of protective media</i>									
	Состав 1/1 <i>Composition 1/1</i>	Состав 2/1 <i>Composition 2/1</i>	Состав 3/1 <i>Composition 3/1</i>	Состав 4/1 <i>Composition 4/1</i>	Состав 5/1 <i>Composition 5/1</i>	Состав 1/2 <i>Composition 1/2</i>	Состав 2/2 <i>Composition 2/2</i>	Состав 3/2 <i>Composition 3/2</i>	Состав 4/2 <i>Composition 4/2</i>	Состав 5/2 <i>Composition 5/2</i>
	(количество грамм на 100 мл объема) <i>(in g/100 mL)</i>									
Желатин <i>Gelatin</i>	1,0	1,0	–	–	–	1,0	1,0	–	–	–
Тиомочевина <i>Thiourea</i>	1,0	1,0	–	–	1,0	1,0	1,0	–	–	1,0
Трегалоза <i>Trehalose</i>	8	–	–	–	4	8	–	–	–	4
Сахароза <i>Sucrose</i>	–	10	–	15	–	–	10	–	15	–
Декстран <i>Dextran</i>	–	–	6	–	6	–	–	6	–	6
Твин 80 <i>Tween 80</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	–	–	–	–	–
Азид натрия <i>Sodium azide</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

то, что с увеличением количества продукта в сублимационной камере возрастают объемы пара, возникающие при сублимации и создающие дополнительные нагрузки на вакуумный насос и конденсатор, при отработке каждого режима в работу брали не более 150 ампул подготовленных эритроцитарных диагностикумов.

Наиболее экономичным и реально применимым на практике признан 12–14-часовой режим высушивания (рис. 1) для обеспечения следующих характеристик:

- замораживание препаратов при температуре минус 40 °С, т.е. достаточно низкой, чтобы избежать оттаивания, и при этом не удлиняющей процесс высушивания;
- сокращение времени удаления не только свободной, но и связанной воды в препарате за счет глубокого вакуума – 15–20 Па;
- плавного (до 25–26 °С) подвода тепла и низкой температуры конденсатора – минус 80–90 °С, для исключения оттаивания и вспенивания препарата при сохранении физико-химических (растворимость, прозрачность, цветность, потеря в массе при высушивании) и иммунобиологических (чувствительность, специфичность) свойств препаратов.

После завершения процесса высушивания препарат извлекали из камеры. Ампулы с препаратом запаивали на газо-кислородной горел-

ке в среде атмосферного воздуха. Так как все биопрепараты в лиофилизированном состоянии обладают высокой степенью гидрофильности, опай ампул с диагностикумом проводили в сухом помещении.

Таким образом, проведенные исследования показали, что соблюдение вышеописанных параметров гарантировало высокое качество высушенных диагностических препаратов.

Контроль экспериментальных серий диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового лиофилизированного

При осуществлении контроля основных характеристик полученных лиофилизатов отбирали пробы из каждой серии для оценки ключевых параметров диагностикума:

- внешний вид высушенного препарата;
- потеря в массе при высушивании;
- растворимость, внешний вид (цвет и прозрачность) восстановленного препарата; внешний вид препарата после оттаивания;
- чувствительность;
- специфичность.

В качестве препарата сравнения при исследовании чувствительности и специфичности лиофильно высушенных диагностикумов использовали «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ».

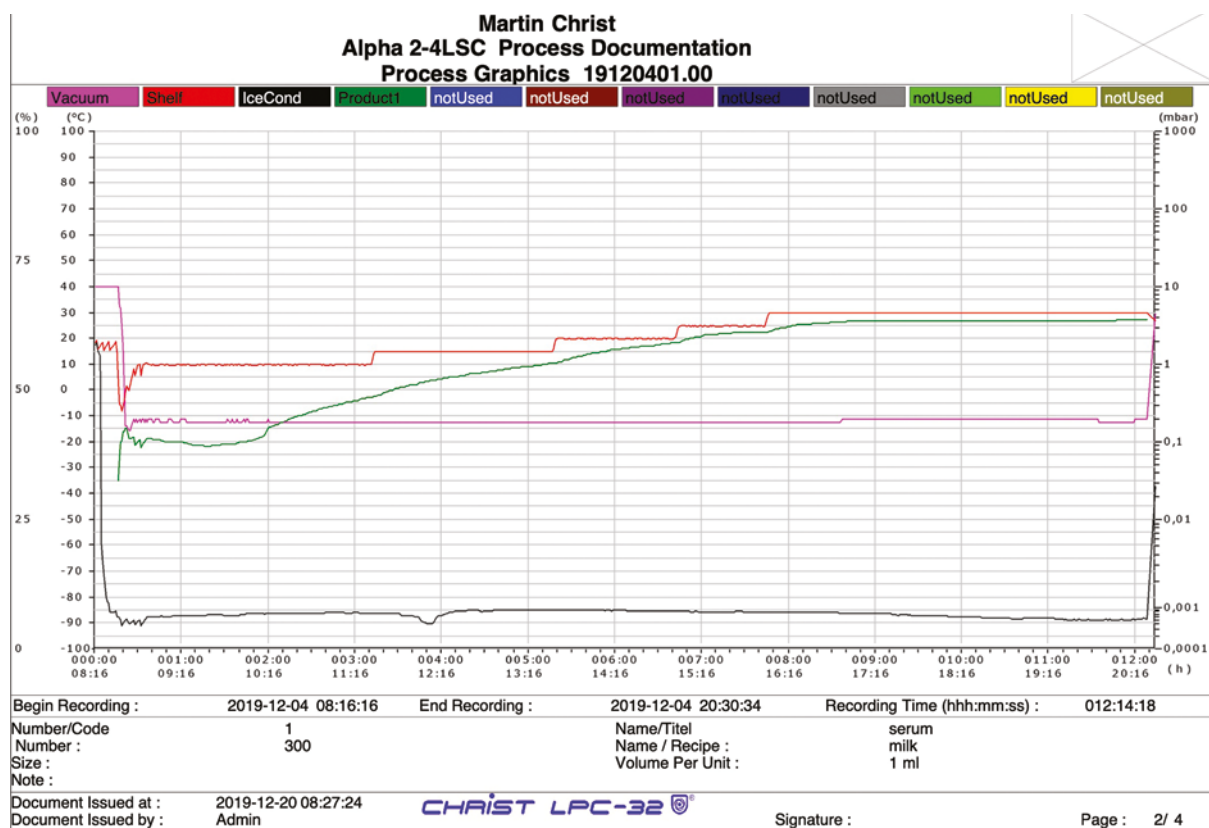


Рис. 1. График лиофилизации диагностикомов эритроцитарных туляреминых иммуноглобулиновых.

Fig. 1. Lyophilisation chart for the erythrocyte diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin.

Установлено, что для всех полученных серий эритроцитарных диагностикомов характерны следующие параметры:

- диагностиком эритроцитарный лиофилизированный имеет вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания;
- потеря в массе при высушивании для всех серий эритроцитарных диагностикомов – $2,5 \pm 0,5\%$;
- такие параметры, как растворимость диагностикомов эритроцитарных лиофилизированных, цвет и прозрачность восстановленного препарата, его внешний вид после оттаивания, а также чувствительность имели различия и представлены в таблице 2;
- специфичность – отсутствие перекрестных реакций при постановке РНГА со штаммами гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1,0 \times 10^8$ м.к./мл.

Наилучшие результаты были получены при использовании в качестве защитных сред составов № 1, 2 и 3 первой группы. Лиофилизаты второй группы при проведении контрольных исследований показали снижение чувствительности диагностикомов эритроцитарных туляреминых иммуноглобулиновых вплоть до ее полной утраты.

После проведения контрольных исследований полученных экспериментальных серий диагностикомов были отобраны образцы серий № 1/1, 2/1, 3/1, имеющие соответствующие представленным требованиям характеристики. При разработке дизайна испытаний стабильности учитывали температуры различных климатических зон, в которых предполагается реализация и использование диагностикомов.

Срок годности устанавливали экспериментально. Метод ускоренного исследования стабильности позволяет рассчитать сроки годности препаратов и сделать прогноз срока годности готового изделия на основании контрольных испытаний в течение хранения при различных температурах.

Для вычисления срока годности использовали формулу (1). Сводные данные представлены в таблице 3.

Все испытываемые серии лиофильно высушенного эритроцитарного диагностикомы стабильно сохраняли качественные характеристики независимо от температуры и временного интервала. Результаты испытаний чувствительности и специфичности показали, что выявление гомологичных штаммов (*F. tularensis holarctica* 15 НИИЭГ, *F. tularensis holarctica* Miura, *F. tularensis*

Таблица 2. Характеристика основных параметров диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового после его лиофилизации

Table 2. Characteristics of the main parameters of the lyophilised erythrocyte diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin

№ серии <i>Batch No.</i>	Характеристика основных параметров <i>Characteristics of the main parameters</i>		
	растворимость ^а <i>solubility^a</i>	внешний вид восстановленного препарата / внешний вид после отстаивания <i>appearance after reconstitution / after settling</i>	чувствительность м.к./мл <i>sensitivity m.c./mL</i>
1/1	1 мин <i>1 min</i>	Гомогенная взвесь коричневого цвета / 2 слоя: надосадок — прозрачная светло-желтого цвета жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Homogeneous brown suspension / 2 layers: a clear, light yellow supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	1,56×10 ⁶
2/1	1 мин <i>1 min</i>	Гомогенная взвесь коричневого цвета / 2 слоя: надосадок — прозрачная бесцветная жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Homogeneous brown suspension / 2 layers: a transparent, colourless supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	1,56×10 ⁶
3/1	30 с <i>30 s</i>	Гомогенная взвесь коричневого цвета / 2 слоя: надосадок — прозрачная бесцветная жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Homogeneous brown suspension / 2 layers: a transparent, colourless supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	1,56×10 ⁶
4/1	1 мин <i>1 min</i>	Гомогенная взвесь коричневого цвета / 2 слоя: надосадок — прозрачная светло-желтого цвета жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Homogeneous brown suspension / 2 layers: a transparent, light yellow supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	1,25×10 ⁷
5/1	3 мин <i>3 min</i>	Наличие конгломератов / 2 слоя: надосадок — прозрачная желтого цвета жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Presence of conglomerates / 2 layers: a transparent, yellow supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	2,5×10 ⁷
Контроль — «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ» <i>Reference—liquid erythrocyte preparation of tularaemia immunoglobulin by Stavropol Anti plague Institute</i>			
6/н <i>none</i>	—	Гомогенная взвесь коричневого цвета / 2 слоя: надосадок — прозрачная светло-желтого цвета жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Homogeneous brown suspension / 2 layers: a transparent, light yellow supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	1,56×10 ⁶

Примечание. «—» — не применимо.

^а Определяли согласно методике, изложенной в разделе «Материалы и методы».

Note. — not applicable.

^а The analytical procedure is described in the “Materials and methods section”.

nearctica Schu, *F. tularensis mediaasiatica* 55) составило 100% независимо от условий хранения образцов, также было отмечено отсутствие перекрестных реакций с гетерологичными штаммами *B. abortus* 544, *B. melitensis* 16-M, *B. suis* 1330, *Y. enterocolitica* 178, *Y. enterocolitica* 383, что подтверждает специфичность диагностикума.

Данные, полученные в испытаниях с использованием метода ускоренного исследования стабильности, были подкреплены результатами исследования долговременной стабильности, подтверждающими стабильность препаратов

в течение всего заявленного срока годности. При этом контрольные исследования проводили каждые шесть месяцев в течение первого года хранения и затем ежегодно на протяжении последующего периода испытаний. Образцы хранили при регламентированной температуре от 2 до 8 °С, а также в условиях повышенных и пониженных температур при 30±2 °С и минус 18 °С соответственно.

При постановке РНГА макрометодом в контролируемых образцах отмечалось полное сохранение первоначальных физико-химических свойств

Таблица 3. Результаты расчета экспериментального срока годности (С) лиофилизированной формы диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового

Table 3. Results of calculation of the experimental shelf life of the lyophilised erythrocyte diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin

Рекомендуемая температура хранения ($t_{\text{хр}}$), °C <i>Recommended storage temperature, °C</i>	Экспериментальная температура хранения ($t_{\text{э}}$), °C <i>Experimental storage temperature, °C</i>	Экспериментальный срок хранения ($C_{\text{э}}$), сут <i>Experimental shelf life, day</i>	Коэффициент соответствия (К) <i>Compliance factor</i>	Срок годности (С), сут <i>Shelf life, days</i>
5±3	27±1	116	6,3	730,8
	37±1	47	15,6	733,2

препарата, его чувствительности и специфичности. Отрицательного влияния вышеуказанных температур на результаты контролируемых показателей не выявлено. По совокупности полученных результатов при исследовании стабильности показателей качества лиофилизированной формы диагностикума показана возможность хранения в течение двух лет (срок наблюдения) при регламентированной температуре, а также в условиях повышенных и пониженных температур.

Проведенные исследования показали, что при получении и изучении лиофилизированных препаратов, приготовленных с использованием разработанных защитных сред высушивания, наилучшие результаты показали защитные среды составов № 1/1, 2/1, 3/1, позволяющие предотвратить агрегацию эритроцитов, сохранить первоначальные свойства диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового в течение заявленного срока годности независимо от температурного режима хранения. Введение в состав представленных защитных сред неионного ПАВ (твин 80) предотвращает денатурацию белков с сохранением активности препарата, а также позволяет исключить из постановки реакции специальную разводящую жидкость.

Выводы

1. В результате исследований наиболее перспективной в использовании признана среда

высушивания для эритроцитарных диагностикумов, состоящая из 6% декстрана, 0,06% твин 80 и азида натрия до 0,01% как наиболее простая в исполнении, содержащая меньшее количество ингредиентов и позволяющая сохранить все физико-химические и иммунобиологические показатели. Отработана рентабельный 12–14-часовой режим лиофилизации.

2. Получены экспериментально-производственные серии лиофилизированной формы диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового. При осуществлении контроля основных характеристик полученных лиофилизатов показано высокое качество высушенных диагностических препаратов с сохранением исходной биологической и иммунологической активности.
3. По совокупности полученных результатов изучения стабильности в реальном времени (долговременная стабильность) и ускоренном исследовании стабильности лиофилизированных форм диагностикума показана возможность хранения в течение двух лет при регламентированной температуре от 2 до 8 °C, а также в условиях повышенных и пониженных температур при 30±2 °C и минус 18 °C соответственно. Отрицательного влияния указанных температур на результаты контролируемых показателей не выявлено.

Литература/References

1. Ираклионova НС, Сысуев ЕБ, Мась ЕС. Природные очаги опасных и особо опасных возбудителей инфекционных заболеваний. Туляремия. *Успехи современного естествознания*. 2013;(9):118–9. [Iraklionova NS, Sysuev EB, Mas ES. Natural foci of dangerous and especially dangerous pathogens of infectious diseases. Tularaemia. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* = *Advances in Current Natural Sciences*. 2013;9:118–9 (In Russ.)]
2. Кудрявцева ТЮ, Попов ВП, Мокриевич АН, Куликалова ЕС, Холин АВ, Мазепа АВ и др. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по туляремии на территории России в 2020 г., прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(1):32–42. [Kudryavtseva TYu, Popov VP, Mokrievich AN, Kulikalova ES, Kholin AV, Mazepa AV, et al. Epizootiological and epidemiological situation on tularaemia in Russia in 2020, the forecast for 2021. *Problemy osobo opasnykh infektsii* = *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(1):32–42 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-32-42>
3. Старцева ОЛ, Курчева СА. Прогнозирование сроков годности иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремийных сухих. *Здоровье населения и среда обитания* – *ZhNCO*. 2019;(2):56–60. [Startseva OL, Kurcheva SA. Shelf life prediction of diagnostic fluorescent tularaemia dry immunoglobulins. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya* – *ZNISO* = *Public Health and Life Environment* – *PH&LE*. 2019;(2):56–60 (In Russ.)]
4. Тюменцева ИС, Афанасьев ЕН, Алиева ЕВ, Курчева СА, Гаркуша ЮЮ. Антигены и антисыворотки

- F. tularensis*: к вопросу иммунодиагностики туляремии. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2012;1:49–52. [Tyumenceva IS, Afanasev EN, Alieva EV, Kurcheva SA, Garkusha YY. Antigens and antisera of *F. tularensis*: on the issue of tularemia immunodiagnosis. *Meditinskiiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*. 2012;1:49–52 (In Russ.)]
5. Жарникова ИВ, Жданова ЕВ, Жарникова ТВ, Старцева ОЛ, Курчева СА, Геогджаян АС и др. Сравнительная характеристика биотехнологии получения эритроцитарных и латексных диагностикумов для выявления возбудителя туляремии. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2019;15(4):27–31. [Zharnikova IV, Zhdanova EV, Zharnikova TV, Startseva OL, Kurcheva SA, Geogjayan AS, et al. Comparative characteristics of biotechnology for the production of erythrocyte and latex diagnosticums to identify the causative agent of tularemia. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2019;15(4):27–31 (In Russ.)]
6. Жарникова ИВ, Ефременко ВИ, Жарникова ТВ, Курчева СА, Кальной СМ, Ефременко ДВ и др. Серологические методы выявления возбудителя туляремии и их оценка. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;(4):32–8. [Zharnikova IV, Efremenko VI, Zharnikova TV, Kurcheva SA, Kalnoj SM, Efremenko DV, et al. Serological methods for detection of the causative agent of tularemia and their evaluation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;(4):32–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-32-38>
7. Кошкидько АГ, Курчева СА, Жарникова ИВ, Старцева ОЛ. Разработка защитной среды высушивания для стабилизации эритроцитарного антигенного диагностикума. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2020;16(4):12–6. [Koshkidko AG, Kurcheva SA, Zharnikova IV, Starceva OL. Development of a protective drying medium to stabilize erythrocyte antigenic tularemia diagnosticum. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2020;16(4):12–6 (In Russ.)]
8. Жученко МА, Пашкова МА, Потапенко ОВ. Лيوфилизация биопрепаратов в двухкамерных шприцах. *Биотехнология*. 2015;(4):79–84. [Zhuchenko MA, Pashkova MA, Potapenko OV. Freeze-drying of biopreparations in dual-chamber syringes. *Biotehnologiya = Russian Journal of Biotechnology*. 2015;(4):79–84 (In Russ.)]
9. Мустафина ЭН, Мустафин ТР, Садыков НС, Юсупов СА. Способы хранения культур *Clostridium botulinum*. *Ученые записки КГAVM им. Н.Э. Баумана*. 2017;229(1):27–30. [Mustafina EN, Mustafin TR, Sadykov NS, Yusupov SA. Ways of storage *Clostridium botulinum*. *Uchenye zapiski KGAVM im. N.E. Bauman = Scientific Notes Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine*. 2017;229(1):27–30 (In Russ.)]
10. Jena S, Krishna Kumar N, Aksan A, Suryanarayanan R. Stability of lyophilized albumin formulations: role of excipient crystallinity and molecular mobility. *Int J Pharm*. 2019;569:118568. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118568>
11. Piskiewicz S, Pielak GJ. Protecting enzymes from stress-induced inactivation. *Biochemistry*. 2019;58(37):3825–33. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00675>
12. Manohar P, Ramesh N, Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. *Sci Rep*. 2019;9(1):15242. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51742-4>
13. Жарникова ИВ, Кошкидько АГ, Курчева СА, Жданова ЕВ, Старцева ОЛ, Тюменцева ИС и др. Способ приготовления эритроцитарного диагностикума иммуноглобулинового туляремийного. Патент Российской Федерации № 2747420; 2021. [Zharnikova IV, Koshkidko AG, Kurcheva SA, Zhdanova EV, Startseva OL, Tyumentseva IS, et al. Method of preparation of erythrocyte immunoglobulin tularemia diagnosticum. Patent of the Russian Federation № 2747420; 2021 (In Russ.)]
14. Chang BS, Kendrick BS, Carpenter JF. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *J Pharm Sci*. 1996;85(12):1325–30. <https://doi.org/10.1021/js960080y>
15. Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchordoguy TJ. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology*. 1990;27:219–31. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90023-W](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90023-W)
16. Prestrelski SJ, Arakawa T, Carpenter JF. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization: II. Structural studies using infrared spectroscopy. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):465–73. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1310>
17. Carpenter JF, Prestrelski SJ, Arakawa T. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization: I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):456–64. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1309>
18. Crowe LM, Reid DS, Crowe JH. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys J*. 1996;71(4):2087–93. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79407-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79407-9)
19. Izutsu K, Yoshioka S, Kojima S. Increased stabilizing effects of amphiphilic excipients on freeze-drying of lactate dehydrogenase (LDH) by dispersion into sugar matrices. *Pharm Res*. 1995;12(6):838–43. <https://doi.org/10.1023/A:1016252802413>
20. Han Y, Jin BS, Lee SB, Sohn Y, Joung JW, Lee JH. Effects of sugar additives on protein stability of recombinant human serum albumin during lyophilization and storage. *Arch Pharm Res*. 2007;30(9):1124–31. <https://doi.org/10.1007/BF02980247>
21. Bolje A, Gobec S. Analytical techniques for structural characterization of proteins in solid pharmaceutical forms: an overview. *Pharmaceutics*. 2021;13(4):534. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040534>
22. Грачева ИВ, Осин АВ. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(3):5–12. [Gracheva IV, Osin AV. Mechanisms of damaging bacteria during lyophilization and protective activity of shielding media. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(3):5–12 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-5-12>
23. Охупкина ВЮ. Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лيوфилизация. *Теоретическая и прикладная экология*. 2009;(4):21–32. [Ochapkina VYu. Methods of microbe cultures maintenance. Part 2. Liophylisation. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya = Theoretical and Applied Ecology*. 2009;(4):21–32 (In Russ.)]

Вклад авторов. С.А. Курчева — идея и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов; обсуждение результатов исследования, формирование концепции статьи, написание текста рукописи, редактирование и дополнение текста рукописи; А.Г. Кошкидько — сбор и анализ данных литературы, выполнение экспериментальных работ по приготовлению сред высушивания, лиофилизации и контролю изготовленных серий препаратов, обработка и обобщение экспериментальных данных, обсуждение результатов исследования; И.В. Жарникова — разработка дизайна исследования, разработка и корректировка протокола лиофильного высушивания, анализ и интерпретация результатов, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; Д.В. Русанова — редактирование текста рукописи, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; А.А. Семирчева — экспериментальные работы по приготовлению сред высушивания, контроль изготовленных серий препаратов; О.Л. Старцева — уточнение дизайна исследований, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; Е.В. Жданова — изготовление эритроцитарных диагностик в жидкой форме; М.М. Курноскина — подготовка рукописи к публикации; И.С. Тюменцева — уточнение дизайна исследований, консультативная помощь в подборе эффективных криопротекторов.

Благодарности. Исследования проводились без спонсорской поддержки.

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

Authors' contribution. S.A. Kurcheva—elaboration of the study idea and design, analysis, interpretation and discussion of the results, development of the concept of the article, writing, editing and supplementation of the text; A.G. Koshkidko—collection and analysis of literature data, preparation of media, lyophilisation and control of the manufactured batches, processing and consolidation of experimental data, discussion of the research results; I.V. Zharnikova—elaboration of the study design; development and correction of the freeze-drying protocol, analysis, interpretation and discussion of the results, editing of the manuscript; D.V. Rusanova—editing and final approval of the manuscript for publication; A.A. Semircheva—preparation of media, control of the manufactured batches; O.L. Startseva—refinement of the study design, discussion of the results, editing of the manuscript; E.V. Zhdanova—production of liquid erythrocyte diagnostic preparations; M.M. Kurnoskina—preparation of the manuscript for publication; I.S. Tyumentseva—refinement of the study design, advisory assistance in the selection of effective cryoprotectors.

Acknowledgements. The study was performed without financial support.

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

Об авторах / Authors

Курчева Светлана Александровна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3564-0791>
kurcheva@yandex.ru

Кошкидько Александра Геннадьевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6617-9504>
koshkidko_ag@snipchi.ru

Жарникова Ирина Викторовна, д-р биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8443-4089>
ivj-biotech@yandex.ru

Русанова Диана Владимировна, канд. мед. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2229-6570>
dianarus2010@rambler.ru

Семирчева Анастасия Александровна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3660-2073>
semircheva_aa@snipchi.ru

Старцева Ольга Леонидовна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5493-5296>
starceva_ol@snipchi.ru

Жданова Елена Владимировна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5360-3786>
jdanova_ev@snipchi.ru

Курноскина Мария Михайловна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8265-5128>
kurnoskina_mm@snipchi.ru

Тюменцева Ирина Степановна, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4391-2195>
tumenceva_is@snipchi.ru

Svetlana A. Kurcheva, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3564-0791>
kurcheva@yandex.ru

Aleksandra G. Koshkidko. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6617-9504>
koshkidko_ag@snipchi.ru

Irina V. Zharnikova, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8443-4089>
ivj-biotech@yandex.ru

Diana V. Rusanova, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2229-6570>
dianarus2010@rambler.ru

Anastasia A. Semircheva. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3660-2073>
semircheva_aa@snipchi.ru

Olga L. Startseva, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5493-5296>
starceva_ol@snipchi.ru

Elena V. Zhdanova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5360-3786>
jdanova_ev@snipchi.ru

Mariya M. Kurnoskina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8265-5128>
kurnoskina_mm@snipchi.ru

Irina S. Tyumentseva, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4391-2195>
tumenceva_is@snipchi.ru

Поступила 07.12.2021

После доработки 22.04.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Received 7 December 2021

Revised 22 April 2022

Accepted 10 June 2022



Влияние материала бюксов на воспроизводимость методики определения потери в массе при высушивании

А.А. Воропаев , О.В. Фадейкина, Т.Н. Ермолаева, Д.С. Давыдов

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

✉ Воропаев Андрей Андреевич; voropaev@expmed.ru

Резюме

Одним из факторов, влияющих на неопределенность измерений остаточной влажности биологических лекарственных препаратов, является накопление электростатического заряда на поверхностях взвешиваемых бюксов и весов, что выражается в низкой воспроизводимости результатов взвешивания. Наиболее простым и экономичным способом решения данной проблемы, по нашему мнению, является использование бюксов из электропроводящих материалов, например металлических. **Цель работы:** оценить влияние материала бюксов на воспроизводимость методики определения потери в массе при высушивании. **Материалы и методы:** модельные образцы для проведения исследований готовили на основе сахарозо-желатиновой среды способом лиофилизации и последующей сорбцией влаги до определенных значений остаточной влажности. Оценку однородности модельных образцов по массе проводили с применением X-карт Шухарта. Определяли потерю в массе при высушивании модельных образцов с использованием стеклянных и металлических бюксов. Статистическую обработку результатов проводили, рассчитывая основные статистические показатели, *t*-критерий Стьюдента, критерий Фишера. **Результаты:** подготовлены и стандартизированы четыре серии модельных образцов с применением карт Шухарта по средней массе. Влияние материала бюксов наиболее сильно проявляется при низкой остаточной влажности модельных образцов (менее 0,5%): относительное стандартное отклонение результатов измерений потери в массе при высушивании получаемых при использовании стеклянных бюксов достигало 76%, при использовании металлических бюксов – 35%. При большей остаточной влажности образцов (2–5%) минимальное относительное стандартное отклонение составляло 15% при использовании стеклянных бюксов и 6% при использовании металлических бюксов. **Выводы:** проведенные исследования позволили оценить влияние материала бюксов на результат определения потери в массе при высушивании: показана более высокая воспроизводимость результатов испытаний с использованием металлических бюксов, что подтверждает возможность их использования при оценке качества биологических лекарственных препаратов по показателю «Потеря в массе при высушивании».

Ключевые слова: потеря в массе при высушивании; остаточная влажность; металлические бюксы; стеклянные бюксы; лиофилизаты; иммунобиологический лекарственный препарат

Для цитирования: Воропаев А.А., Фадейкина О.В., Ермолаева Т.Н., Давыдов Д.С. Влияние материала бюксов на воспроизводимость методики определения потери в массе при высушивании. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):208–217. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-208-217>

Influence of the material of weighing bottles on loss-on-drying reproducibility

A.A. Voropaev ✉, O.V. Fadeikina, T.N. Ermolaeva, D.S. Davydov

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

✉ Andrey A. Voropaev; voropaev@expmed.ru

Abstract

One of the factors influencing the uncertainty of residual moisture measurements in biological medicinal products is the accumulation of electrostatic charge on the surfaces of weighing bottles and laboratory balances, which results in poor weighing reproducibility. The authors believe that the simplest and most economical solution to this problem is to use weighing bottles made of a conductive material, e.g. metal. **The aim of the work** was to evaluate the influence of the material of weighing bottles on the reproducibility of loss-on-drying (LOD) methods. **Materials and methods:** Model samples for the study were prepared from a sucrose-gelatin medium by lyophilisation and subsequent moisture sorption to achieve a certain residual moisture content. The authors assessed the samples' mass uniformity using Shewhart's X-charts, and analysed their residual moisture content using a loss-on-drying procedure with glass and metal weighing bottles. Statistical processing of the results was carried out by calculating the main statistical indicators: Student's *t*-test and Fisher's *F*-test. **Results:** Four batches of model samples were prepared and standardised in terms of average mass using Shewhart's charts. The effect of weighing bottle materials was most pronounced at low residual moisture contents (less than 0.5%), with the relative standard deviation (RSD) values for the results obtained with glass and metal weighing bottles reaching 76% and 35%, respectively. For the samples with a higher residual moisture content (2–5%), the minimum RSDs with glass and metal weighing bottles were 15% and 6%, respectively. **Conclusions:** The study allowed for evaluating the influence of the material of weighing bottles on the results of LOD measurements and demonstrated a higher reproducibility with metal weighing bottles. This confirms the possibility of using metal weighing bottles in quality assessment of biological medicinal products for human use with LOD methods.

Key words: loss on drying; residual moisture; metal weighing bottles; glass weighing bottles; lyophilisates; immunobiological medicinal product

For citation: Voropaev A.A., Fadeikina O.V., Ermolaeva T.N., Davydov D.S. Influence of the material of weighing bottles on loss-on-drying reproducibility. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):208–217. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-208-217>

Введение

Остаточная влажность является одним из важнейших показателей качества биологических препаратов для медицинского применения в твердых лекарственных формах. От содержания влаги в образце зависит стабильность свойств лекарственного препарата, его активность и срок годности [1]. В целях оценки остаточной влажности в лиофилизатах требования Государственной фармакопеи Российской Феде-

рации предусматривают определение показателя «Потери в массе при высушивании»¹. Под данным понятием подразумевают потерю в массе за счет гигроскопической влаги и летучих веществ, которую определяют в веществе при высушивании до постоянной массы либо в течение времени, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации. Согласно методике для биологических лекарственных препаратов² при проведении испытаний точную

¹ Общая фармакопейная статья 1.4.1.0031.18 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

² Общая фармакопейная статья 1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

навеску испытуемого образца массой 0,15–0,20 г помещают в весовой стаканчик (бюкс) и высушивают с открытой крышкой в шкафу вакуум-сушильном при температуре 60 ± 1 °С и остаточном давлении, не превышающем 0,667 кПа (5 мм рт. ст.), в течение 3 ч. Открытый бюкс вместе с крышкой помещают в эксикатор для охлаждения на 40 мин, после чего закрывают крышкой и взвешивают, оценивая разницу полученного результата с исходной массой образца.

Воспроизведение методики оценки потери в массе при высушивании предполагает наличие значительного количества факторов, которые могут влиять на воспроизводимость результатов. К числу основных факторов, влияющих на правильность и прецизионность методики, относятся высокая гигроскопичность большинства исследуемых материалов; малые массы навесок исследуемых образцов; в некоторых случаях — незначительное, близкое к допустимой погрешности взвешивания весов, фактическое остаточное содержание влаги в образцах.

Также оказывают влияние факторы внешней среды в помещениях, где проводится испытание. Одним из таких факторов является накопление электростатического заряда на поверхностях взвешиваемых бюксов из неэлектропроводного материала, например стеклянных, и элементов корпуса весов. По закону Кулона сила взаимодействия точечных электрических зарядов, при условии разности знаков, является силой притяжения, которая может быть интерпретирована как изменение массы (Δm) при взвешивании согласно формуле (1)³:

$$\Delta m = \frac{1}{g} \left(k_e \frac{Q_1 Q_2}{r^2} \right), \quad (1)$$

где g — гравитационная постоянная, $\text{м}^3 \cdot \text{с}^{-2} \cdot \text{кг}^{-1}$; k_e — постоянная величина; Q_1 — заряд первого объекта, Кл; Q_2 — заряд второго объекта, Кл; r — расстояние между объектами, м.

При накоплении электростатического потенциала заряды, возникающие на поверхностях, формируют притягивающую силу (рис. 1), что выражается в изменении показаний весов и приводит к низкой воспроизводимости результатов взвешивания. Осложняющим обстоятельством является то, что данный фактор, в отличие от других условий среды, таких как температура, влажность, интенсивность движения воздуха и пр., сложен для выявления, мониторинга и нейтрализации. Есть несколько

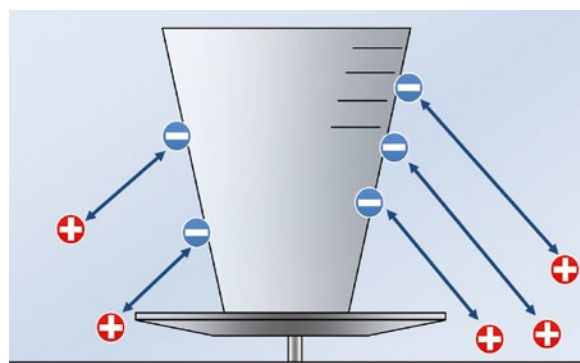


Рис. 1. Воздействие электростатического заряда, влияющего на результаты взвешивания.

Fig. 1. Effect of electrostatic charge on weighing results.

вариантов устранения влияния статического электричества на результаты взвешиваний: использование антистатических пистолетов, клетки Фарадея, весов со встроенным ионизаторами и др. [2]. При отсутствии такого дополнительного оборудования одним из самых простых и экономичных способов решения данной проблемы является использование бюксов из электропроводящих материалов, на которых электростатический заряд не накапливается. Наиболее подходящими для этих целей являются металлические бюксы (рис. 2).

Цель работы — оценить влияние материала бюксов на воспроизводимость методики определения потери в массе при высушивании.

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

- изготовить и стандартизировать по массе лиофилизированные модельные образцы



Рис. 2. Стеклянный и алюминиевые бюксы для проведения испытаний по показателю «Потеря в массе при высушивании».

Fig. 2. Glass and aluminium weighing bottles for loss-on-drying tests.

³ Electrostatic charges and their effects on weighing. <https://www.mt.com/de/en/home/library/collections/laboratory-weighing/electrostatic-and-weighing.html>

для определения потери в массе при высушивании;

- провести исследования промежуточной прецизионности методики определения потери в массе при высушивании с использованием стеклянных и металлических бюксов.

Материалы и методы

Материалы:

- сахароза (Merck, кат. № 1.07653, сер. K48546153);
- желатин (Merck, кат. № 1.04070, сер. VM918570);
- флаконы для лиофилизации стандарта R2 (Wheaton, США);
- бюксы стеклянные (стаканчик весовой) высотой 35 мм, диаметром 25 мм, ГОСТ 25336-82 (Россия);
- бюксы лабораторные алюминиевые высотой 30 мм, диаметром 25 мм, ТУ 25-11-1271-76 (Россия).

Оборудование:

- морозильник MDF-193AT (Panasonic Healthcare Co., Ltd, Япония);
- лиофильный аппарат M.S.R 18 (Usifroid, Франция);
- вакуум-сушильный шкаф VD 23 (Binder, Германия);
- весы специальные класса 1 BP-221S («Сартorius», Россия);
- термостат ТС-1/80 СПУ (СКТБ СПУ, Россия);
- термогидрометр 608-H1 (Testo AG, Германия).

Методы

Подготовка образцов. Для создания модельных образцов использовали сахарозо-желатиновую среду, содержащую 10% сахарозы и 1% желатина по массе. Данная среда является стандартной средой лиофильного высушивания биологических лекарственных препаратов для медицинского применения. По 1,0 мл данной среды разливали в пронумерованные флаконы для лиофилизации. Проводили лиофилизацию, десорбцию влаги, контролируемую сорбцию влаги и определение массы содержимого флакона для контроля модельных образцов.

Режим лиофилизации. Образцы замораживали в течение 4 ч при температуре минус 70 °С

в морозильнике. После замораживания образцы переносили в лиофильный аппарат и высушивали 24 ч в вакууме 0,2–0,3 Па.

Режим десорбции влаги. Для получения образцов с минимальными значениями остаточной влажности проводили дополнительную десорбцию влаги в течение 3 ч в вакуум-сушильном шкафу при температуре 60 °С и вакууме 4 гПа, используя кальция хлорид безводный в качестве влагопоглотителя. По описанной процедуре были приготовлены четыре серии лиофилизированных образцов.

Сорбция влаги. Образцы помещали в термостат с установленной температурой 50 °С. На дно термостата предварительно помещали лоток с водой для увеличения влажности до 80–90%. Температуру и влажность оценивали с использованием термогидрометра.

Оценка однородности полученных модельных образцов. Однородность образцов оценивали по массе содержимого флаконов. Построение и оценку контрольных карт проводили в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015⁴.

Статистическая обработка результатов. Рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение (*RSD*), дисперсию, коэффициент корреляции. Выбор применяемых статистических критериев осуществляли с учетом ОФС.1.1.0013.15⁵. Для оценки статистической значимости различий средних значений остаточной влажности, полученных с использованием разных видов бюксов, применяли *t*-критерий Стьюдента для двух независимых выборок. Для оценки дисперсии результатов использовали критерий Фишера [3]. Расчеты проводили с помощью программы Microsoft Excel 2016.

Определение потери в массе при высушивании. Испытания проводили согласно ОФС.1.2.1.0010.15⁶ (методика определения потери в массе при высушивании в иммунобиологических лекарственных препаратах).

Результаты и обсуждение

Для проведения исследований предварительно получали модельные образцы, отвечающие следующим критериям.

- 1) Состав модельных образцов должен соответствовать составу среды высушивания

⁴ ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

⁵ Общая фармакопейная статья 1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁶ Общая фармакопейная статья 1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

лиофилизированных иммунобиологических препаратов.

- 2) Остаточная влажность модельных образцов должна находиться в диапазоне от 0 до 5%.
- 3) Вариабельность остаточной влажности внутри серии должна быть минимальной.

Для приготовления модельных образцов была выбрана сахарозо-желатиновая лиопротективная среда, содержащая 10% сахарозы и 1% желатина по массе. Такой состав широко используется при производстве лиофилизированных вакцин, а также обеспечении условий для длительной сохранности образцов микроорганизмов [1, 4, 5].

Известно, что при лиофилизации вследствие «эффекта краевого флакона» остаточная влажность содержимого каждого из флаконов может существенно отличаться от средних значений для всей партии в целом, что зависит от их расположения в аппарате для высушивания. Это связано с неравномерным теплопереносом в камерах лиофильных аппаратов и вследствие этого с разной скоростью сублимации влаги [6, 7]. Чтобы избавиться от данного эффекта и приготовить образцы с небольшой вариабельностью по остаточной влажности, их высушивали до минимально возможного в заданных условиях количества несвязанной воды, проводя дополнительную десорбцию. Затем в образцах увеличивали содержание влаги, используя гигроскопичность лиофилизированных материалов и их способность к сорбции атмосферной влаги. Показано, что при этом процесс сорбции имеет линейный характер на начальном периоде увлажнения, а скорость сорбции влаги зависит от температуры и относительной влажности воздуха⁷. Способ накопления примесей в модельных образцах с помощью воздействия экстремальных условий рекомендован Государственной фармакопеей Российской Федерации в ОФС.1.1.0012.15⁸.

Сорбция влаги лиофилизированными образцами

Факторами, влияющими на скорость сорбции, являются природа материала, его пространственная структура, температура и относительная влажность. Для ускорения процесса сорбции использовали максимально приемлемые для обеспечения сохранности образцов повышенную температуру и влажность. Для определения скорости сорбции влаги проводили

предварительный эксперимент по воздействию экстремальных условий. Леофилизированные образцы устанавливали в термостат при температуре 50 °С и относительной влажности 90%. Далее каждые 20 мин отбирали образцы, в которых определяли потерю в массе при высушивании. Результат представлен на рисунке 3. Процесс сорбции в данных условиях имеет линейную зависимость: изменение остаточной влажности происходило приблизительно на 1% каждые 20 мин. Поэтому для получения серий модельных образцов с определенной остаточной влажностью флаконы с лиофилизатом подвергали воздействию экстремальных условий в течение 20, 40, 60 мин и на одну серию не воздействовали, чтобы получить минимальное содержание влаги. Таким способом были получены четыре серии модельных образцов: первая – без воздействия экстремальных условий, вторая – 20 мин, третья – 40 мин и четвертая – 60 мин воздействия экстремальных условий.

Контроль однородности модельных образцов по массе

Для достижения однородности модельных образцов проводили контроль по массе: взвешивали пустые флаконы; флаконы, заполненные жидкой сахарозо-желатиновой средой до лиофилизации; флаконы после лиофилизации и сорбции влаги. Массу содержимого рассчитывали как разность массы флакона с содержимым и пустого флакона. Используя данные рассчитанной массы, проводили построение контрольной карты Шухарта в соответствии с ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015⁹. Тип карты – контрольная карта индивидуальных значений (X-карта) с оценкой контрольных границ. По результатам анализа исключали из работы все флаконы, масса содержимого которых выходила за контрольные границы (значение, отмеченное красным маркером на рисунке 4), и повторяли процедуру построения карты Шухарта и визуальной оценки до тех пор, пока все значения не укладывались в пределы контрольных границ. Таким способом добивались однородности по массе модельных образцов как до лиофилизации, так и после лиофилизации и сорбции влаги. Пример X-карты для серии 1 до и после удаления исключенных образцов приведен на рисунке 4.

Характеристики серий модельных образцов по средней массе приведены в таблице 1.

⁷ Позин М.Е., Зинюк Р.Ю. Физико-химические основы неорганической технологии: Учебное пособие для вузов. Химия; 1985.

⁸ Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁹ ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

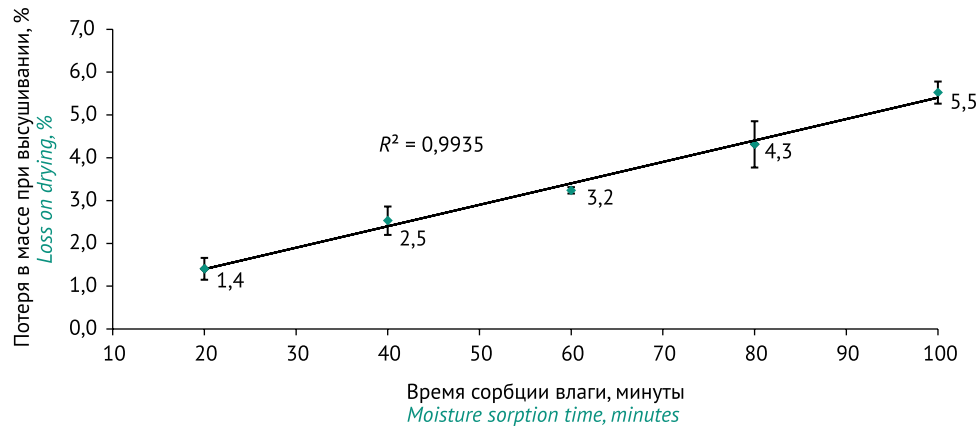


Рис. 3. Зависимость результатов определения потери в массе при высушивании от времени нахождения модельных образцов в экстремальных условиях при температуре 50 °С и относительной влажности 90%.

Fig. 3. Loss-on-drying results as a function of the time of model samples exposure to extreme conditions of the temperature of 50 °C and relative humidity of 90%.



Рис. 4. X-карты, построенные по значениям массы модельного образца первой серии после лиофилизации: А – все данные по серии образцов; В – контрольная карта после удаления образцов, выходящих за контрольные границы. UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы; CL – центральная линия.

Fig. 4. X-charts plotted against the values of mass of the model samples from the first batch after lyophilisation, showing all the values obtained for the batch (A) and the values after exclusion of the samples beyond the control limits (B). UCL and LCL—upper and lower control limits; CL—central line.

Таблица 1. Средняя масса содержимого флаконов серий модельных образцов
Table 1. Average mass of vial contents in model sample batches

№ серии образцов Sample batch No.	Характеристика серий модельных образцов Characteristics of model sample batches				Количество подготов- ленных модельных образцов, шт. Number of model samples prepared, units
	до лиофилизации before lyophilisation		после лиофилизации и сорбции влаги after lyophilisation and moisture sorption		
	средняя масса, г Average mass, g	RSD, %	средняя масса, г Average mass, g	RSD, %	
1	1,0363	0,5	0,1223	1,0	79
2	1,0323	0,3	0,1284	1,5	72
3	1,0394	0,5	0,1176	0,6	46
4	1,0440	0,8	0,1195	0,9	38

Примечание. RSD – относительное стандартное отклонение.
Note. RSD—relative standard deviation.

Значение относительного стандартного отклонения массы содержимого флаконов модельных образцов (после лиофилизации и сорбции влаги), характеризующее степень неоднородности по средней массе подготовленных образцов, находилось в пределах от 0,6 до 1,5%.

Определение воспроизводимости (промежуточной прецизионности) результатов определения потери в массе при высушивании с использованием стеклянных и металлических бюксов

Воспроизводимость результатов определения потери в массе при высушивании оценивали по промежуточной прецизионности в условиях вариации факторов (оператор, время), формирующих разброс результатов измерений, но с использованием идентичных серий модельных образцов и одной методики. Определение потери в массе при высушивании выполняли два оператора. В условиях повторяемости каждый оператор за один цикл в один день проводил по три повторных измерения для каждого типа бюксов каждой серии модельных образцов. Испытания проводили два дня последовательно. Результаты определений представлены в таблице 2.

При анализе результатов испытаний для каждой серии образцов отмечается, что среднее значение показателя, полученное с использованием стеклянных бюксов, выше, чем при использовании металлических (алюминиевых), что может быть объяснено наличием электростатического заряда на стеклянных бюксах. При этом анализ с применением t -критерия Стьюдента для двух независимых выборок показал, что статистически достоверные различия между результатами, полученными с использованием стеклянных и металлических бюксов, отсутствуют. Для всех серий значения

t -критерия Стьюдента, рассчитанного по экспериментальным данным ($t_1=1,05$; $t_2=1,85$; $t_3=0,44$; $t_4=1,19$) были меньше критического значения $t_{кр}=2,074$ ($df=22$; $\alpha=0,05$) при достигнутом уровне значимости p более 0,05. При этом стандартное отклонение результатов определения потери в массе при высушивании, полученных при использовании стеклянных бюксов, выше, чем при использовании металлических.

Результаты оценки промежуточной прецизионности определения потери в массе при высушивании представлены в таблице 3.

Из анализа представленных данных следует, что влияние материала бюксов наиболее сильно проявляется при низкой остаточной влажности исследуемого образца. Для серий модельных образцов с остаточной влажностью менее 2% различие дисперсий, характеризующих разброс результатов измерений при использовании металлических бюксов, статистически значимо: значение критерия Фишера для серий 1 и 2, соответственно $F_{эксп1}=8,55$ и $F_{эксп2}=7,45$, превышает табличное значение $F_{табл}=4,5$. Следовательно, при проведении испытаний по показателю «Потеря в массе при высушивании» для препаратов с низкой (менее 2%) остаточной влажностью предпочтительнее использовать металлические бюксы.

При остаточной влажности образцов 3–5% различие дисперсий статистически не значимо: значение критерия Фишера $F_{эксп3}=2,25$ и $F_{эксп4}=2,39$ (для серий 3 и 4 соответственно) меньше табличного значения $F_{табл}=4,5$. Это означает, что точность измерений с применением разных видов бюксов сопоставима. При этом относительное стандартное отклонение для металлических бюксов значительно меньше, что также позволяет рекомендовать к использованию металлические бюксы вместо стеклянных.

Таблица 2. Результаты определения потери в массе при высушивании с использованием стеклянных и металлических бюксов
Table 2. Results of loss-on-drying measurements using glass and metal weighing bottles

Серия образцов Sample batch	Бюксы Weighing bottles	Аналитик Operator	День Day	Среднее значение ± стандартное отклонение, % (Xn=3) Mean±Standard Deviation, % (Xn=3)	Среднее значение ± стандартное отклонение, % (Xn=12) Mean±Standard Deviation, % (Xn=12)	t _{эсп} -критерий Стьюдента (p) Student t-values, t _{exp} (p)
1	Стеклянные Glass	1	1	0,50±0,35	0,41±0,31	t ₁ =1,05 (p=0,303818) различие статистически незначимо no statistically significant difference
			2	0,59±0,10		
		2	1	0,24±0,49		
			2	0,33±0,23		
	Металлические Metal	1	1	0,46±0,05	0,31±0,11	
			2	0,30±0,04		
		2	1	0,24±0,10		
			2	0,24±0,04		
2	Стеклянные Glass	1	1	1,80±0,12	1,90±0,28	t ₂ =1,86 (p=0,075106) различие статистически незначимо no statistically significant difference
			2	2,03±0,39		
		2	1	1,91±0,41		
			2	1,84±0,24		
	Металлические Metal	1	1	1,75±0,03	1,74±0,10	
			2	1,73±0,13		
		2	1	1,77±0,06		
			2	1,72±0,19		
3	Стеклянные Glass	1	1	3,95±0,64	3,58±0,57	t ₃ =0,46 (p=0,661244) различие статистически незначимо no statistically significant difference
			2	3,56±0,33		
		2	1	3,71±0,37		
			2	3,08±0,73		
	Металлические Metal	1	1	3,18±0,64	3,49±0,38	
			2	3,47±0,20		
		2	1	3,62±0,07		
			2	3,70±0,35		
4	Стеклянные Glass	1	1	4,96±0,55	4,90±0,91	t ₄ =1,18 (p=0,246914) различие статистически незначимо no statistically significant difference
			2	3,86±1,02		
		2	1	5,31±0,86		
			2	5,49±0,24		
	Металлические Metal	1	1	3,83±0,70	4,53±0,59	
			2	4,92±0,02		
		2	1	4,82±0,42		
			2	4,56±0,38		

Примечание. Табличное значение $t_{\text{кр}}=2,074$ ($df=22$; $\alpha=0,05$).

Note. Tabular t-value, $t_{\text{critical}}=2.074$ ($df=22$; $\alpha=0.05$).

Таблица 3. Оценка промежуточной прецизионности определения потери в массе при высушивании с использованием стеклянных и металлических бюксов**Table 3.** Evaluation of the intermediate precision of loss-on-drying measurements using glass and metal weighing bottles

Серия образцов <i>Sample batch</i>	Бюксы <i>Weighing bottles</i>	<i>RSD, %</i>	Дисперсия <i>Variance</i>	Значение критерия Фишера ($F_{\text{эксп}}$) <i>Experimental F-value</i>	Табличное значение критерия Фишера ($F_{\text{табл}}$) (уровень значимости $\alpha=0,01$) <i>Tabular F-value (significance level $\alpha=0.01$)</i>
1	Стеклянные <i>Glass</i>	76	0,09803	8,55	4,5
	Металлические <i>Metal</i>	35	0,01146		
2	Стеклянные <i>Glass</i>	15	0,08011	7,45	4,5
	Металлические <i>Metal</i>	6	0,01076		
3	Стеклянные <i>Glass</i>	16	0,32732	2,25	4,5
	Металлические <i>Metal</i>	11	0,14547		
4	Стеклянные <i>Glass</i>	19	0,82537	2,39	4,5
	Металлические <i>Metal</i>	13	0,34679		

Примечание. *RSD* – относительное стандартное отклонение.
 Note. *RSD* – relative standard deviation.

В целом для всех серий модельных образцов относительное стандартное отклонение, характеризующее промежуточную прецизионность (разброс) результатов измерений потери в массе, при высушивании с использованием металлических бюксов существенно меньше, чем с использованием стеклянных бюксов. Например, при остаточной влажности испытуемых образцов менее 0,5%, разброс значений (*RSD*), получаемых при использовании стеклянных бюксов, достигает 76%. В то же время для металлических бюксов *RSD* составляет 35%. Для серий с остаточной влажностью 2–5%: минимальное значение *RSD* составило 15% для стеклянных бюксов, а для металлических бюксов – 6%, что свидетельствует о принципиально более высокой точности проведения испытаний. Отметим, что для низких концентраций определяемых веществ (примесей) рекомендованные критерии приемлемости значения *RSD* составляют 25–30%¹⁰ [8].

Кроме того, во время работы аналитиками было отмечено, что при использовании стеклянных бюксов время взвешивания кратно увеличивается, так как стабилизация значений на весах происходит продолжительное время.

Таким образом, использование металлических бюксов является очень простым и эконо-

мичным способом повысить воспроизводимость результатов для определения потери в массе при высушивании при оценке качества лекарственных препаратов, уменьшая тем самым неопределенность результатов испытаний.

Заключение

Для всех серий модельных образцов промежуточная прецизионность (*RSD*) методики определения потери в массе при высушивании, характеризующая разброс результатов измерений, полученных с использованием металлических бюксов, значительно меньше, чем для результатов измерений, полученных с использованием стеклянных бюксов, что подтверждает преимущество использования металлических бюксов.

Статистически значимые различия результатов оценки потери в массе при высушивании, полученных с использованием стеклянных и металлических бюксов, не обнаружены при уровне значимости $\alpha=0,05$.

Результаты исследования подтверждают возможность использования металлических бюксов при оценке качества биологических лекарственных препаратов для медицинского применения по показателю «Потеря в массе при высушивании».

¹⁰ Эрмер Й, Миллер ДХ. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик, 1-е изд. Пер. с англ. Группа компаний ВИАЛЕК; 2013.

Литература/References

1. Rey L, May JC, Eds. *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. (3rd ed.). CRC Press; 2010. <https://doi.org/10.3109/9781439825761>
2. Popa-Burke I, Novick S, Mantilla M, McGrath K. Analysis of compound weighing precision in drug discovery. *J Biomol Screen*. 2013;18(3):331–40. <https://doi.org/10.1177/1087057112461152>
3. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998. [Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994]
4. Thorat BN, Sett A, Mujumbar AS. Drying of vaccines and biomolecules. *Drying Technology*. 2022;40(3):461–83. <https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1825293>
5. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003;46(3):205–29. [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(03)00046-4)
6. Ramdhatla S, Pikal MJ. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze-drying, I: Atypical radiation and the edge vial effect. *AAPS PharmSciTech*. 2003;4:22–31. <https://doi.org/10.1208/pt040214>
7. Pikal MJ, Bogner R, Mudhivarathi V, Sharma P, Sane P. Freeze-drying process development and scale-up: scale-up of edge vial versus center vial heat transfer coefficients, Kv. *J Pharm Sci*. 2016;105(11):3333–43. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.07.027>
8. Эпштейн НА. Определение внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) при валидации методик в фармации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(1):106–17. [Epshtein NA. Intermediate precision determination at validation of methods in pharmacy. *Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv = Drug Development & Registration*. 2016;(1):106–17 (In Russ.)]

Вклад авторов. А.А. Ворopaев — идея, концепция и дизайн исследования, проведение экспериментальных исследований, написание текста рукописи; О.В. Фадейкина — обобщение, анализ и статистическая обработка экспериментальных данных, критический пересмотр содержания рукописи; Т.Н. Ермолаева — проведение экспериментальных исследований; Д.С. Давыдов — консультативная помощь в анализе результатов и оценке состояния проблемы, окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

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

Authors' contribution. A.A. Voropaev—elaboration of the study idea, concept and design, conducting of the experimental research, drafting of the manuscript; O.V. Fadeikina—consolidation, analysis and statistical processing of the experimental data, critical revision of the manuscript; T.N. Ermolaeva—conducting of the experimental research; D.S. Davydov—advisory assistance in assessing of the state of the art and analysis of the study results, final approval of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project № 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

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

Об авторах / Authors

Ворopaев Андрей Андреевич. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5786-9159>
voropaev@expmed.ru

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
Fadeikina@expmed.ru

Ермолаева Татьяна Николаевна. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0960-7194>
Ermolaeva@expmed.ru

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1768-1362>
Davidov@expmed.ru

Andrey A. Voropaev. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5786-9159>
voropaev@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
Fadeikina@expmed.ru

Tatiana N. Ermolaeva. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0960-7194>
Ermolaeva@expmed.ru

Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1768-1362>
Davidov@expmed.ru

Поступила 21.12.2021

После доработки 02.06.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Received 21 December 2021

Revised 2 June 2022

Accepted 10 June 2022



Рекомендации по аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков

О.Б. Устинникова^{1,✉}, Р.А. Волкова¹, А.А. Мовсисянц¹, 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

✉ Устинникова Ольга Борисовна; ustinnikova@expmed.ru

Резюме

Наличие стандартных образцов для оценки подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков является неперенным условием оценки качества биотехнологических лекарственных средств, полученных на их основе. Актуальность разработки и аттестации данных стандартных образцов обусловлена, с одной стороны, отсутствием международных или фармакопейных стандартных образцов для ряда новых или сравнительно недавно зарегистрированных белков, с другой стороны — нарушением логической цепочки обеспечения биофармацевтической индустрии Российской Федерации международными стандартными образцами. При этом нормативные международные и отечественные документы содержат общие требования к процедуре аттестации стандартных образцов и не отражают специфику стандартных образцов для оценки подлинности структуры биотехнологических лекарственных средств, зависящую от технологии получения конкретной терапевтически активной молекулы. Цель работы — представление рекомендаций к процедуре разработки и порядку аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков. В настоящих рекомендациях определены 4 основных этапа разработки и аттестации стандартных образцов: этап 1 — разработка требований к стандартному образцу, обоснование выбора материала для стандартного образца, формы выпуска, разработка спецификации и оценка качества; этап 2 — выбор методики и установление величины аттестованной характеристики; этап 3 — исследование стабильности и установление срока годности стандартного образца; этап 4 — разработка сопроводительной документации. Рассмотрены особенности наполнения данных этапов с учетом специфики рекомбинантных терапевтических белков и формата применения стандартных образцов. Настоящие рекомендации разработаны на основании многолетнего опыта работы сотрудников ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в области экспертизы и стандартизации биотехнологических лекарственных препаратов. На основе рекомендаций возможно создание индивидуальных программ аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры конкретного белка. Данный подход позволит систематизировать процесс разработки стандартных образцов, обеспечит прослеживаемость и доступность информации. Стандартные образцы, аттестованные в соответствии с настоящими рекомендациями, могут рассматриваться как первичные в случае необходимости.

Ключевые слова: стандартные образцы; подлинность; аттестация; рекомбинантные терапевтические белки; структура

Для цитирования: Устинникова О.Б., Волкова Р.А., Мовсисянц А.А., Меркулов В.А., Бондарев В.П. Рекомендации по аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):218–225. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-218-225>

Recommendations on the certification of reference standards for structure identification of recombinant therapeutic proteins

O.B. Ustinnikova^{1,✉}, R.A. Volkova¹, A.A. Movsesyants¹, 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

✉ Olga B. Ustinnikova; ustinnikova@expmed.ru

Abstract

Reference standards for structure identification of recombinant therapeutic proteins are essential for quality assessment of recombinant protein-based biotechnological medicinal products. The development and certification of such reference standards hold special relevance because of, firstly, the absence of international, national or compendial reference standards for a number of new or recently approved proteins and, secondly, the disruption of supply chains providing the biopharmaceutical industry of the Russian Federation with international reference standards. Moreover, international and national regulatory documents contain only general requirements for the procedure of reference standards certification but not the considerations specific to the standards for biotechnologicals' structure identification, which vary with the production technologies for each individual active moiety. The aim of this work was to provide recommendations on the procedure for the development and certification of reference standards used to identify the structure of recombinant therapeutic proteins. These recommendations define 4 main stages of the procedure: stage 1 covers the development of requirements for the reference standard, including the justification of material and formulation choices, the elaboration of quality specifications, and the assessment of quality; stage 2 comprises the selection of analytical procedures and the establishment of the values for the certified parameters; stage 3 includes stability studies and shelf-life setting; and stage 4 involves the development of documentation for the reference standard. The paper dwells upon the scope of the stages, taking into account the specific considerations for recombinant therapeutic proteins and the use of reference standards. The recommendations are based upon the extensive experience in biotechnologicals testing and standardisation of the employees of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. These recommendations can provide a base for the establishment of protein-specific certification programmes for reference standards used in structure identification. This approach will allow for systematisation of the process for standards development and ensure the traceability of information and the validity of results. The reference standards certified in accordance with these recommendations can be considered primary standards, if necessary.

Key words: reference standards; identification; certification; recombinant therapeutic proteins; structure

For citation: Ustinnikova O.B., Volkova R.A., Movsesyants A.A., Merkulov V.A., Bondarev V.P. Recommendations on the certification of reference standards for structure identification of recombinant

therapeutic proteins. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):218–225. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-218-225>

Введение

Отличительной особенностью биотехнологических лекарственных средств является необходимость подтверждения их подлинности не только на уровне специфической биологической активности, но и на уровне структуры молекулы основного действующего вещества.

Для рутинного подтверждения подлинности структуры каждой вновь получаемой серии продукта в качестве основного метода большинство производителей применяют метод пептидного картирования с УФ-ВЭЖХ детектированием продуктов ферментативного гидролиза белка и метод картирования гликанов (определения профиля гликанов) с флуоресцентным ВЭЖХ детектированием ферментативно отщепленных меченых гликанов¹.

Данные методы предполагают необходимость использования стандартного образца сравнения (СО).

Использование для пептидного картирования и определения профиля гликанов высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС), безусловно, является перспективным и более технологичным подходом, не требующим наличия СО. Однако сегодня данный метод только начинает находить широкое применение в рутинном анализе в связи с высокой стоимостью оборудования, особенностями эксплуатации и необходимостью наличия высококвалифицированных кадров.

Таким образом, оценка результатов рутинного подтверждения подлинности структуры каждой вновь получаемой серии продукта осуществляется путем сравнения пептидных карт/профилей гликанов испытуемого и стандартного образцов. Поскольку для новых, а также ряда сравнитель-

но недавно зарегистрированных белков отсутствуют международные или фармакопейные СО, актуальной задачей становится разработка первичных СО для подтверждения структуры.

Кроме того, в настоящее время, при отсутствии стабильного обеспечения российской биофармацевтической индустрии международными СО, необходимо наличие отечественных фармакопейных СО и/или СО предприятий, позволяющих оценивать качество вновь выпускаемых серий биотехнологических белков в части подтверждения подлинности структуры.

В настоящее время нормативные международные и отечественные документы содержат общие требования к процедуре аттестации СО и не отражают специфику биологических лекарственных средств, которая требует индивидуального подхода, зависящего от природы биологического объекта [1–4]. Принципиальные требования к характеристике СО для биотехнологических лекарственных средств отражены в Государственной фармакопее Российской Федерации, во всех ведущих фармакопеях мира и документах Евразийского экономического союза². Необходимость представления сведений о СО обозначена в Федеральном законе Российской Федерации «Об обращении лекарственных средств»³. Однако данные документы носят общий характер и не конкретизируют ни особенности требований к аттестации СО для подтверждения подлинности структуры молекулы рекомбинантных терапевтических белков, ни формат наполнения регистрационного досье в части сведений о подобных СО.

При этом очевидно, что качество СО сравнения и полнота его характеристики в значительной мере определяют объективность оценки важнейших показателей качества биотехноло-

¹ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0007.15 Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Глава 1. Оценка качества биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов рекомбинантной ДНК. В: Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. М.: Полиграф-плюс; 2014.

01/2010:20255 Peptide mapping. European Pharmacopoeia 10.8.

Biotechnology-derived articles–peptide mapping. USP 43–NF 38.

01/2011:20259 Glycan analysis of glycoproteins. European Pharmacopoeia 10.8.

² Общая фармакопейная статья 1.1.0007.18 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

British Pharmacopoeia chemical reference substances (BPCRS); 2022. <https://www.pharmacopoeia.com/reference-standards>

Pharmaceutical Reference Standards. 11th International Symposium, 3–4 September 2012, Strasbourg, France; 2012.

Ph. Eur. Reference Standards: Purpose and use; 2022. <https://www.edqm.eu/en/ph-eur-reference-standards-purpose-and-use>

<11> USP Reference Standards. United States Pharmacopeia, Issue 1. USP 43–NF 38.

07/2018:51200 Reference standards. European Pharmacopoeia 10.8.

³ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

гического терапевтического белка: подлинности и чистоты.

Цель работы — представление рекомендаций к процедуре разработки и порядку аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков.

Основная часть

Процедура разработки СО для подтверждения структуры рекомбинантного белка, а также порядок его аттестации зависят от ожидаемого статуса СО (фармакопейный стандартный образец — ФСО или стандартный образец предприятия — СОПр), сложности структуры белковой молекулы (наличия нескольких аминокислотных цепей, гликозилирования, направленного модифицирования и т. д.), состава и формы выпуска фармацевтической субстанции.

Тем более что посттрансляционные модификации белковой молекулы, а также профиль направленной модификации белка, например конъюгирования (если применимо), как правило, индивидуальны для каждой технологии⁴. При этом для направленно модифицированных белков, помимо полной характеристики целевого белка, необходима оценка характеристик модифицирующего агента и конечного конъюгата. Для модифицирующего агента необходима оценка всех показателей качества, предусмотренная нормативным документом (при наличии).

Характеристика модифицированного белка должна включать:

- степень модификации;
- требования к позиционным изомерам;
- сведения о конформационной структуре, включая общий размер молекулы; количественное определение свободного, неконъюгированного белка;
- остаточные количества свободного агента;
- молярное отношение агента к белку (если применимо).

Для испытаний могут использоваться следующие физико-химические методы исследования: ядерный магнитный резонанс, химический или ферментативный гидролиз конъюгата с последующим анализом пептидных фрагментов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, в том числе с масс-спектрометрическим детектированием и др.⁵

В целом аттестацию СО для подтверждения подлинности структуры рекомбинантного белка можно представить в виде 4 основных этапов. При этом наполнение каждого из этапов процедуры аттестации будет зависеть от:

- ожидаемого статуса СО: ФСО или СОПр;
- наличия международного/фармакопейного образца структуры;
- назначения СО (оценка первичной структуры, посттрансляционных модификаций, характеристика направленно модифицированной молекулы);
- сложности структуры белковой молекулы: наличия одной или нескольких аминокислотных цепей, гликозилирования, направленного модифицирования/конъюгации (ПЭГ, Fc-фрагмент и т.д.);
- состава и формы выпуска фармацевтической субстанции: наличие стабилизаторов — белков/аминокислот; концентрации белка; упаковки.

Этап 1. Разработка требований к СО. Обоснование выбора материала СО, формы выпуска, оценки качества

Поскольку подлинность структуры молекулы рекомбинантного терапевтического белка в большинстве случаев оценивают на стадии активной фармацевтической субстанции, логично рассматривать серию данной субстанции в качестве кандидата в СО сравнения. Однако спецификация на субстанцию, которая предназначена для дальнейшего использования в соответствии с регламентом производства, может

⁴ Глава 5.1. Производство и контроль качества биотехнологических лекарственных препаратов, полученных по технологии рекомбинантной ДНК. Т. 3. Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств. Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза. М.: Ремедиум; 2017.

Глава 6. Спецификации. Методы испытаний и критерии приемлемости биотехнологических (биологических) препаратов. Т. 3. Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств. Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза. М.: Ремедиум; 2017.

Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (EMA/CHMP/BWP/49348/2005). EMA; 2006.

Гармонизированное трехстороннее руководство ICH. Спецификации: Методы испытаний и критерии приемлемости биотехнологических/биологических препаратов. Q6B. 1999.

ICH Q6B Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products (CPMP/ICH/365/96), 1999.

⁵ Guidance on the description of composition of pegylated (conjugated) proteins in the SPC (EMA/CMP/BWP/3068/03). EMA; 2003. <https://goo.gl/GUC2Le>

быть неприемлема для серии субстанции, предназначенной для использования в качестве СО. Так, например, возможна корректировка формы выпуска — вместо замороженного продукта большого объема целесообразно рассмотреть возможность производства лиофилизированного продукта, разлитого в ампулы или флаконы в объеме, удобном для применения.

Также, исходя из условий конкретной методики, используемой для подтверждения подлинности структуры, возможно изменение концентрации белка в субстанции, предназначенной для использования в качестве СО. С экономической точки зрения целесообразно уменьшение данной концентрации до значений, приемлемых для получения достоверных результатов. На этом этапе логично предусмотреть возможность применения СО структуры для оценки подлинности, чистоты или количественного определения другими физико-химическими методами.

Ряд субстанций может содержать белковые стабилизаторы (например, человеческий сывороточный альбумин), что неприемлемо при оценке структуры белка методом пептидного картирования. В этом случае в качестве кандидата в СО необходимо рассматривать очищенный белок, отобранный на производственной стадии до добавления стабилизатора. В данном случае для сохранения стабильности раствора белка возможно изменение pH раствора и/или добавление иных стабилизаторов, не оказывающих неспецифического влияния на результаты оценки подлинности структуры молекулы белка.

Вместе с тем ряд показателей качества, указанных в спецификации на субстанцию для производства лекарственного препарата, могут оказаться не актуальны для СО. Например, может быть целесообразно не включать в спецификацию на СО такие показатели, как стерильность, пирогенность, содержание посторонних примесей, например HBsAg, остаточной ДНК штамма продуцента и остаточных белков клеток хозяина, других остаточных веществ, не имеющих специфического влияния на процедуру применения СО и т.д., поскольку эти показатели оцениваются производителем материала СО, а разрабатываемый продукт не предназначен для введения людям.

Основным показателем при разработке спецификации на СО должна быть «Подлин-

ность», для оценки которой необходимо предусмотреть:

- оценку структуры молекулы с покрытием известной аминокислотной последовательности не менее 95%;
- идентификацию значимых фрагментов молекулы: N-концевой последовательности, дисульфидных связей, замен аминокислотных остатков, сайтов гликозилирования/пегилирования/конъюгации и т.д.;
- установление гликопрофиля и состава гликанов, оценка полученного гликопрофиля относительно известного, установление возможных отличий и оценка их стабильности в серийном производстве.

Таким образом, процедура разработки СО для оценки подлинности структуры молекулы рекомбинантного терапевтического белка, состоит в:

- обоснованном выборе материала для СО, в качестве которого, в зависимости от конкретного белка и технологии его получения, может быть использован готовый лекарственный препарат, нерасфасованный готовый продукт (балк), субстанция, очищенный белок (продукт промежуточной стадии производства);
- обоснованном выборе формы выпуска (объем розлива; концентрация белка; физическое состояние — замороженный раствор/лиофилизат; изменения состава — pH и/или стабилизаторы);
- разработке спецификации на СО, где за основу может быть взята характеристика действующего вещества, установленная при разработке биотерапевтического белка, и спецификация на активную фармацевтическую субстанцию. При формировании спецификации на СО все изменения исходной спецификации должны быть обусловлены изменениями, необходимость которых продиктована назначением и процедурой применения СО [5–8].

Этап 2. Выбор методики и установление величины аттестованной характеристики

Для аттестации СО структуры необходимо использовать валидированную (аттестованную) методику⁶, применение которой для оценки подлинности структуры белка будет регламентировано в нормативной документации на конкретный продукт. При валидации данной методики

⁶ Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. СПб: ВНИИМ им. Д.И. Менделеева; 2002.

ГОСТ Р 8.871–2014. Стандартные образцы предприятий и отраслей. Общие требования.
ГОСТ Р 8.563–2009. Методики (методы) измерений.

необходимо более полно оценить стабильность пептидной карты и карты гликанов, определить критические условия ее получения (особенности ферментативного гидролиза, активность фермента, этапы отщепления и мечения гликанов и т.д.).

Необходимо оценить специфичность пептидной карты и карты гликанов, на основании, например, масс-спектрометрического анализа, обосновать выбор и состав характеристических пиков:

- соответствие пика простому пептиду либо их смеси;
- отсутствие среди пептидов неспецифических продуктов гидролиза;
- наличие подтвержденных участков аминокислотной последовательности (масс-спектрометрическое исследование);
- установление критериев стабильности и разрешения пиков;
- локализация соответствующих пептидов в известной аминокислотной последовательности;
- установление референсных пиков гликанов;
- масс-спектрометрическая характеристика структуры гликанов, соответствующих референсным пикам.

В качестве величины аттестованной характеристики может быть рекомендовано установление диапазонов времен удерживания характеристических пиков в условиях воспроизведения валидированной методики. Для этого рекомендуется:

- получение не менее 5 пептидных/гликановых карт СО в условиях промежуточной прецизионности для СОПр и не менее 10 карт в условиях воспроизводимости для ФСО;
- установление аттестованной величины в виде абсолютного (1 пик) и относительных времен удерживания характеристических пиков, рассчитанных как ± 2 СКО или ± 3 СКО от среднего времени в зависимости от прецизионности методики и условий получения выборки;
- если доступно и применимо: сравнительный анализ пептидных карт и карт гликанов с международным или фармакопейным СО (например, CRS EDQM) и/или оригинальным препаратом.

Этап 3. Исследование стабильности и установление срока годности СО

Срок годности СО устанавливают в реальном времени на основании мониторинга стабильно-

сти пептидных/гликановых карт, при этом анализируют результаты соответствия пептидных и гликановых профилей установленным диапазонам времен удерживания характеристических пиков и общего профиля хроматограмм⁷.

Этап 4. Разработка сопроводительной документации (паспорт, инструкция по применению, макет упаковки)

Документацию разрабатывают в установленном порядке на основе результатов применения СО для контроля соответствующей продукции⁸. Для ФСО следует руководствоваться рекомендациями ВОЗ⁹. Для СОПр целесообразно использование методических рекомендаций «Порядок проведения аттестации стандартных образцов предприятия, применяющихся при производстве и контроле биологических лекарственных средств».

Обязательной частью инструкции по применению является подробное описание процедуры методики с указанием точных характеристик критичных реагентов, где в случае прогнозируемой возможной коммерческой недоступности критичных реагентов целесообразно предусмотреть альтернативный формат использования СО в качестве образца сравнения при вынужденном изменении процедуры методики при условии ее валидации.

Заключение

Настоящие рекомендации разработаны на основании многолетнего опыта ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в области экспертизы и стандартизации биотехнологических лекарственных препаратов. Аттестация ФСО и/или СОПр, предназначенных для подтверждения подлинности рекомбинантных терапевтических белков, в соответствии с разработанным порядком аттестации позволяет унифицировать данную процедуру для разных производителей и разных рекомбинантных белков. На основании настоящих рекомендаций могут быть разработаны индивидуальные программы аттестации СО для подтверждения подлинности структуры конкретного белка. Обоснования принятия решений по наполнению каждого из этапов и их выполнение позволяют систематизировать процесс разработки СО и обеспечивают прослеживаемость

⁷ ICH Q5C Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/138/95), 1996.

ГОСТ 8.315–2019. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения.

⁸ ГОСТ Р 8.691–2010. Стандартные образцы материалов (веществ). Содержание паспортов и этикеток.

⁹ Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards, Annex 2, Technical Report Series No 932. WHO Expert Committee on biological standardization. Geneva; 2004.

и доступность информации. СО подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков (ФСО и СОПр), аттестованные в соответствии с разработанным

порядком аттестации, могут рассматриваться как первичные в случае отсутствия возможности использования международных СО соответствующего белка.

Литература/References

1. Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;(2):28–32. [Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeykina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparation. *Vedomosti nauchnogo centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya* = *Scientific Center for Expertise of Medical Application Products Bulletin*. 2013;(2):28–32 (In Russ.)]
2. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(4):229–36. [Volkova RA, Fadeykina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, OlefirYuV, Merkulov VA, et al. Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation of biological products. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(4):229–36 (In Russ.)]
3. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. [Fadeykina OV, Volkova RA. Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal* = *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(8):44–50 (In Russ.)] <http://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50>
4. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Устинникова ОБ, Саканян ЕИ, Меркулов ВА, Мовсисянц АА и др. Современные проблемы стандартных образцов лекарственных средств в Российской Федерации. *Фармация*. 2020;69(2):5–11. [Volkova RA, Fadeykina OV, Ustinnikova OB, Sakanyan EI, Merkulov VA, Movsesyants AA, et al. Current problems with the standard samples of medicines in the Russian Federation. *Farmaciya* = *Pharmacy*. 2020;69(2):5–11 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-02-01>
5. Голощапова ЕО, Рунова ОБ, Устинникова ОБ. Рекомбинантные интерфероны бета-1а и бета-1b: особенности структуры белка и проблемные вопросы подтверждения ее подлинности. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(8):61–4. [Goloshchapova EO, Runova OB, Ustinnikova OB. Recombinant human interferons beta-1a and beta-1b: protein structural features and problematic issues of identity confirmation. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal* = *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(8):61–4 (In Russ.)] <http://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-8-61-64>
6. Шведова ЕВ, Устинникова ОБ, Рунова ОБ, Волкова РА, Бондарев ВП, Смолов МА и др. Разработка порядка аттестации стандартного образца рекомбинантного активированного фактора свертывания крови VII для подтверждения подлинности методом пептидного картирования. *Гематология и трансфузиология*. 2018;63(4):334–42. [Shvedova EV, Ustinnikova OB, Rounova OB, Volkova RA, Bondarev VP, Smolov MA, et al. The development of industry standard sample qualification procedure of recombinant activated blood clotting factor VII for proving of identity by peptide mapping method. *Gematologiya i transfuziologiya* = *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2018;63(4):334–42 (In Russ.)] <https://doi.org/10.25837/HAT.2019.68.74.002>
7. Устинникова ОБ, Рунова ОБ, Мовсисянц АА, Шукуров РР, Смолов МА, Хамитов РА. Оценка профиля N-гликозилирования молекулы рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa. *Молекулярная медицина*. 2020;18(4):50–5. [Ustinnikova OB, Rounova OB, Movsesyants AA, Shukurov RR, Smolov MA, Khamitov RA. Evaluation of N-glycosylation profile of recombinant blood coagulation factor VIIa molecule. *Molekulyarnaya medicina* = *Molecular Medicine*. 2020;18(4):50–5 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/24999490-2020-04-08>
8. Устинникова ОБ, Голощапова ЕО, Рунова ОБ, Коротков МГ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартного образца метиониновой формы интерферона альфа-2b для подтверждения подлинности методом пептидного картирования. *Медицинская иммунология*. 2018;20(4):543–50. [Ustinnikova OB, Goloshchapova EO, Runova OB, Korotkov MG, Volkova RA. Development of a qualification procedure for methionine form of interferon alfa-2b standard to confirm its authenticity by means of a peptide mapping method. *Medicinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*. 2018;20(4):543–50 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-4-543-550>

Вклад авторов. **О.Б. Устинникова** — определение основного направления исследования, разработка и обоснование концепции, обобщение материалов и написание текста рукописи; **Р.А. Волкова** — критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; **А.А. Мовсесянц** — критическое обсуждение текста рукописи; **В.А. Меркулов** — окончательное утверждение рукописи для публикации; **В.П. Бондарев** — критическое обсуждение и доработка текста рукописи.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 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». А.А. Мовсесянц является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contributions. **O.B. Ustinnikova**—planning of the main research direction, development and justification of the study concept, collection of the material and writing of the text; **R.A. Volkova**—critical revision and editing of the manuscript; **A.A. Movsesyants**—critical revision of the manuscript; **V.A. Merkulov**—final approval of the manuscript for publication; **V.P. Bondarev**—critical revision and correction of the manuscript.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Conflict of interest. V.A. Merkulov is the Editor-in-Chief of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. V.P. Bondarev is the Deputy Editor-in-Chief of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. A.A. Movsesyants is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Устинникова Ольга Борисовна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>
Ustinnikova@expmed.ru

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук. ORCID:
<https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>
Volkova@expmed.ru

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
Movsesyants@expmed.ru

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>
Merkulov@expmed.ru

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>
Bondarev@expmed.ru

Olga B. Ustinnikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>
Ustinnikova@expmed.ru

Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>
Volkova@expmed.ru

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
Movsesyants@expmed.ru

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID:
<http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>
Merkulov@expmed.ru

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID:
<http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>
Bondarev@expmed.ru

Поступила 26.04.2022

После доработки 11.05.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Received 26 April 2022

Revised 11 May 2022

Accepted 10 June 2022

Ретракция статьи: Лиджиева А.А., Смолярчук Е.А., Ельцова Е.А. Биоаналоги – преимущества и перспективы

Retraction of the article: Lidzhiyeva A.A., Smolyarchuk E.A., Eltsova E.A. Biosimilars – advantages and prospects

Статья Лиджиева А.А., Смолярчук Е.А., Ельцова Е.А. Биоаналоги – преимущества и перспективы. *Биопрепараты*. 2015;(3):21–24. <https://www.biopreparations.ru/jour/article/view/18/519> ретрагирована (отозвана) в связи с выявлением дублирующей публикации Ельцова Е.А., Раменская Г.В., Смолярчук Е.А., Бушманова А.В. Биосимиляры – препараты будущего. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2015;(1):12–15.

Инициатор ретракции – редакция журнала «*БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*». Протокол заседания редакционной коллегии № 2 от 10.06.2022.



ISSN 2221-996X



9 772221 996004