

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

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume	№ / No.
22	3
2022	

www.biopreparations.ru

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

**ТОМ 22, № 3,
ИЮЛЬ – СЕНТЯБРЬ 2022**

**VOLUME 22, NO. 3,
JULY–SEPTEMBER 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.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 1,182.

The journal's two-year RSCI impact factor is 1,182.

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 (Оболенск, 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)

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГУП «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)

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

Лукасова 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

29.09.2022

Дата выхода в свет

01.10.2022

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

Д.Т. Леви, Р.И. Луданный, Ю.И. Обухов,
А.А. Савина, А.А. Алесина, Н.В. Александрова

**Порядок приготовления, аттестации и хранения
посевной серии вакцинного штамма**

Mycobacterium bovis BCG-I (Russia)232

Н.С. Вильданова, Е.С. Кормщикова, Е.Н. Калинина,
К.А. Воробьев, И.В. Парамонов, Э.Ю. Кудашева

**Этапы стандартизации препаратов антирезусного
иммуноглобулина человека по показателю качества**

«Специфическая активность»241

М.В. Абрамцева, Е.О. Неманова, Н.С. Алехина

Перспективные направления разработки

вакцинных препаратов для профилактики шигеллеза249

Оригинальные статьи

Е.В. Шведова, С.А. Лешина, Э.Ю. Кудашева,
И.В. Борисевич, В.А. Меркулов, Д.В. Шведов

**Разработка критериев приемлемости оценки результатов
количественного определения анти-D-антител IgG**

в препаратах иммуноглобулина человека

антирезус Rh₀(D) иммуноферментным методом266

С.С. Тимонова, К.А. Смолова, И.А. Кирик, М.С. Пантюшенко,
Р.Л. Анисимов, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадэ

**Оптимизация условий культивирования клона-продуцента,
коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-**

генерирующий фермент, с целью повышения выхода

фермента арилсульфатазы В279

А.Е. Гуляев, З.Т. Шульгау, Ш.Д. Сергазы, Н.В. Юрина,
А.М. Горячкин, С.С. Богачев, А.С. Проскурина

Ранозаживляющее и противовоспалительное действие

рекомбинантного ангиогенина человека293

Т.А. Кузнецова, Т.П. Смолина, Е.В. Персиянова, Л.А. Иванушко,
А.С. Сильченко, С.П. Ермакова, Н.Н. Беседнова

**Влияние ферментативно деполимеризованного фукоидана
на эффекторные функции клеток врожденного**

и адаптивного иммунитета308

О.Н. Колесникова, В.Е. Трегубова, О.Б. Устинникова,
А.А. Мовсесянц

Оценка сопоставимости результатов определения

тиомерсала колориметрическим методом и методом

атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара

в сорбированных иммунобиологических

лекарственных препаратах318

С.М. Суханова, З.Е. Бердникова, О.В. Фадейкина,
Е.М. Петручук, А.С. Тихонова

Анализ стабильности стандартного образца

тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230,

используемого при испытании на присутствие микоплазм

биологических лекарственных препаратов331

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 Secretary

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)

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 September 2022

Date of publication

1 October 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

D.T. Levi, R.I. Ludannyy, Yu.I. Obukhov, A.A. Savina,
A.A. Alesina, N.V. Aleksandrova

**Procedure for preparation, certification, and storage of a seed
lot of the *Mycobacterium bovis* BCG-I (Russia) vaccine strain 232**

N.S. Vildanova, E.S. Kormshchikova, E.N. Kalinina,
K.A. Vorobiev, I.V. Paramonov, E.Yu. Kudasheva

**Human anti-D immunoglobulin preparations: potency
standardisation milestones 241**

M.V. Abramtseva, E.O. Nemanova, N.S. Alekhina

**Promising directions for vaccine development
to prevent shigellosis 249**

Original Articles

E.V. Shvedova, S.A. Leshina, E.Yu. Kudasheva,
I.V. Borisevich, V.A. Merkulov, D.V. Shvedov

**Development of acceptance criteria for the results
of anti-D IgG quantification in human anti-D (Rh₀)
immunoglobulin preparations by enzyme immunoassay 266**

S.S. Timonova, K.A. Smolova, I.A. Kirik, M.S. Pantyushenko,
R.L. Anisimov, R.A. Khamitov, A.A. Piskunov, V.N. Bade

**Optimisation of culture conditions for a producer clone
coexpressing arylsulfatase B and a formylglycine-generating
enzyme in order to increase the yield of arylsulfatase B 279**

A.E. Gulyayev, Z.T. Shulgau, Sh.D. Sergazy, N.V. Yurina,
A.M. Goryachkin, S.S. Bogachev, A.S. Proskurina

**Wound healing and anti-inflammatory effects
of recombinant human angiogenin 293**

T.A. Kuznetsova, T.P. Smolina, E.V. Persiyanova,
L.A. Ivanushko, A.S. Silchenko, S.P. Ermakova, N.N. Besednova

**Effects of enzymatically depolymerised fucoidan
on effector functions of innate and adaptive immunity cells 308**

O.N. Kolesnikova, V.E. Tregubova,
O.B. Ustinnikova, A.A. Movsesyants

**Comparability assessment of the results
of thiomersal quantification in adsorbed immunobiological
medicinal products by colourimetry and by cold vapor
atomic absorption spectrometry 318**

S.M. Sukhanova, Z.E. Berdnikova, O.V. Fadeikina,
E.M. Petruchuk, A.S. Tikhonova

**Stability analysis of the reference standard
of *Mycoplasma arginini* strain G230 used for testing
biologicals for mycoplasmas 331**



Порядок приготовления, аттестации и хранения посевной серии вакцинного штамма *Mycobacterium bovis* BCG-I (Russia)

Д.Т. Леви^{1,✉}, Р.И. Луданный², Ю.И. Обухов¹, А.А. Савина¹, А.А. Алесина¹,
Н.В. Александрова¹

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 Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер» Министерства здравоохранения Московской области, ул. Дубки, д. 7, Мытищи, п. Здравница, Московская обл., 141132, Российская Федерация

✉ Леви Диана Тимофеевна; Levi@expmed.ru

Резюме

До настоящего времени единственным препаратом для массовой активной профилактики туберкулеза среди детей на территории Российской Федерации остается вакцина туберкулезная (БЦЖ). Изготовление промышленных серий вакцины БЦЖ проводят в рамках системы «посевной серии» (seed-lot system), которая регламентирует изготовление вводимой в гражданский оборот вакцины из единой серии посевного материала — лиофилизата *Mycobacterium bovis* BCG. Оценка посевного материала вакцины БЦЖ по показателям качества в отечественных и зарубежных документах представлена в виде отдельных небольших разделов, содержащих краткое описание и/или перечисление показателей и методов контроля. Объединить информацию о получении, аттестации и хранении посевного материала (посевной серии) для производства отечественной вакцины БЦЖ является актуальной задачей. Цель работы — провести сравнительную оценку основных характеристик и методов контроля посевного материала отечественного субштамма *M. bovis* BCG-I (Russia), изложенных в национальных и международных требованиях к вакцинам БЦЖ. Обобщены данные литературы по истории появления субштаммов *M. bovis* BCG, вариативности их характеристик, представлена краткая история происхождения отечественного субштамма BCG-I. Рассмотрены методы контроля, указанные в национальных и международных требованиях к посевному материалу вакцины БЦЖ. Показана практическая возможность провести индикацию субштамма *M. bovis* BCG-I (Russia) с последующим определением генетических свойств, характеризующих его геномную стабильность. Приведены результаты сравнительного анализа данных о стабильности лиофилизатов посевных серий *M. bovis* BCG-I (Russia). Особое внимание уделено биологическим методам контроля посевной серии: определению остаточной вирулентности, включая приживаемость, и иммунобиологическому методу контроля БЦЖ на отсутствие генов, ответственных за выработку антигенов вирулентности (кожные пробы на животных с препаратом Диаскинтест®). Сделан вывод о том, что контроль стабильности генетических и биологических свойств на протяжении всего периода производства и хранения посевной серии позволяет получать вакцину БЦЖ, соответствующую всем требованиям нормативной документации.

Ключевые слова: вакцина БЦЖ; посевная серия; субштамм; система посевных серий (seed-lot system); стабильность генома

Для цитирования: Леви Д.Т., Луданный Р.И., Обухов Ю.И., Савина А.А., Алесина А.А., Александрова Н.В. Порядок приготовления, аттестации и хранения посевной серии вакцинного штамма *Mycobacterium bovis* BCG-I (Russia). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):232–240. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-431>

Procedure for preparation, certification, and storage of a seed lot of the *Mycobacterium bovis* BCG-I (Russia) vaccine strain

D.T. Levi¹✉, R.I. Ludanny², Yu.I. Obukhov¹, A.A. Savina¹, A.A. Alesina¹, N.V. Aleksandrova¹

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

² Moscow Regional Clinical Tuberculosis Dispensary, 7 Dubki St., Zdravitsa, Mytishchi, Moscow region 141132, Russian Federation

✉ Diana T. Levi; Levi@expmed.ru

Abstract

To date, the Bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine has been the only medicinal product for active mass childhood immunisation against tuberculosis in the Russian Federation. Industrial-scale batches of the BCG vaccine are manufactured using a seed-lot system, which provides for producing the vaccine for civil circulation from a single batch of seed material, a lyophilisate of *Mycobacterium bovis* BCG. National and international documents touch upon the evaluation of BCG vaccine seed material in terms of its quality attributes in small separate sections containing brief descriptions and/or lists of attributes and control methods. It is relevant to bring together the information on receipt, certification, and storage of the inoculum (the seed lot) for production of the Russian BCG vaccine. The aim of the study was a comparative assessment of the main characteristics of and control methods for the inoculum of the Russian vaccine strain, *M. bovis* BCG-I, set out in the national and international requirements for BCG vaccines. The article summarises literature data on the history of BCG substrains and the variability of their characteristics and presents a brief account of the origin of the Russian BCG-I substrain. It considers the control methods specified in the national and international requirements for the inoculum for the BCG vaccine. The study demonstrated the practical possibility of identifying BCG down to the substrain level with subsequent determination of genetic properties that characterise genomic stability of the substrain. The article presents the results of the comparative analysis of data on stability of lyophilisates of *M. bovis* BCG-I seed lots (Russia). Particular attention is paid to biological methods for controlling the seed lot (determination of residual virulence, including BCG survival) and the immunobiological method for controlling BCG for the absence of the genes responsible for virulence antigen expression (animal skin tests with Diaskintest®). The authors concluded that the control of stability of genetic and biological properties throughout the entire period of seed lot production and storage makes it possible to obtain BCG vaccines that meet all the regulatory requirements.

Key words: BCG vaccine; seed lot; substrain; seed-lot system; genome stability

For citation: Levi D.T., Ludanny R.I., Obukhov Yu.I., Savina A.A., Alesina A.A., Aleksandrova N.V. Procedure for preparation, certification, and storage of a seed lot of the *Mycobacterium bovis* BCG-I (Russia) vaccine strain. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):232–240. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-431>

Введение

Впервые у нас в стране вакцину БЦЖ лиофилизировали в 1943 г., что позволило стабилизировать ее свойства и стандартизовать условия проведения контрольных испытаний [1]. Посевная серия (ПС) для изготовления вакцины БЦЖ для внутрикожного введения была лиофилизирована в 1963 г. Эта ПС служила стандартным исходным материалом для получения промышленных серий вакцины БЦЖ в течение 8 лет и лиофилизатов двух очередных ПС (ПС 359 «ш»/1966 г. и ПС 361 «ш»/1992 г.).

С 2008 г. для изготовления вакцины БЦЖ применяется серия 368 «щ» (приготовлена в 2006 г. из ПС 359 «ш»). Номер серии – это очередной номер пассажа (пересева), буква по алфавиту – очередной пересев на питательную среду с бычьей желчью. Таким образом, ПС 368 «щ» – это 368 пассаж *M. bovis* BCG-I, из которых 27 пассажей проведены на среде с бычьей желчью.

В ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России исследовали идентичность и стабильность образцов промышленных серий *M. bovis* BCG-I (Russia), лиофилизированных в 1948, 1950, 1952 и 1954 г., и 4 посевных серий, лиофилизированных в 1971–2006 гг. [2]. В тестах *in vivo* в экспериментах на животных (выживаемость на мышах, остаточная вирулентность и защитное действие на морских свинках) не было обнаружено значимых различий между образцами этих посевных серий. Не выявлены различия и по результатам микробиологических тестов *in vitro*. Полученные результаты подтверждают высокую стабильность изученных свойств субштамма *M. bovis* BCG-I (Russia).

Проведены также исследования методом локус-специфичной ПЦР [3] с использованием 6 праймеров, предоставленных Национальным институтом биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, Великобритания) для международных испытаний дочерних штаммов (субштаммов) BCG. Для оценки длины получаемых в результате амплификации фрагментов применяли маркеры молекулярной массы (50 п.н. или 100 п.н.) и образцы вакцин БЦЖ на основе *M. bovis* BCG-Pasteur 1173p2 (lot 5) и *M. bovis* BCG-Moreau RJ как референтные. В исследовании с серией *M. bovis* BCG-Moreau RJ получены 5 фрагментов амплификации, а *M. bovis* BCG-Pasteur 1173P2 – только 4 таких фрагмента. При ПЦР-анализе продуктов амплификации лиофилизатов ряда отечественных серий вакцины и 4 ПС *M. bovis* BCG-I показано, что паттерны ПЦР-продуктов всех испытуемых образцов были идентичны между собой [2].

Цель работы – провести сравнительную оценку основных характеристик и методов контроля посевного материала отечественного субштамма *M. bovis* BCG-I (Russia), изложенных в национальных и в международных требованиях к вакцинам БЦЖ.

Характеристика субштамма *M. bovis* BCG-I

M. bovis штамм BCG (Bacillus Calmette–Guérin) получен авторами A. Calmette и C. Guérin в 1921 г. в результате 230 пассажей культуры *M. bovis*. Штамм (с рекомендациями по составу среды выращивания, условиям накопления бактериальной массы, длительности культивирования и т. д.) авторы предоставляли всем лабораториям, заинтересованным в приготовлении вакцины против туберкулеза. Производственные лаборатории в процессе изготовления препарата вносили ряд изменений в разработанную авторами технологию культивирования *M. bovis* BCG. Как результат через 25–30 лет появилось несколько субштаммов BCG, которые различались между собой по ряду фенотипических признаков и генетических свойств [4]. Название каждого субштамма включало: род/вид/название штамма с обозначением географического места его получения и/или цифровой код. Например, *M. bovis* BCG Danish 1331, *M. bovis* BCG Tokyo 172 и др.

Генетическая основа аттенуации штамма длительное время не была известна. Только в 1996 г. после публикации данных G.G. Mahairas с соавт. [5], применивших метод геномной гибридизации, стало ясно, что у всех субштаммов BCG отсутствуют одна из трех или все три так называемые области ДНК-различия (DNA region of difference, RD).

В последующем использование большого спектра молекулярно-генетических методов подтвердило, что структурные изменения произошли на геномном уровне. Эти исследования позволили выявить принципиальные отличия субштаммов от стандартного исходного материала, полученного A. Calmette и C. Guérin [6–11] в прошлом веке. Генетическая вариабельность субштаммов BCG определяется крупными геномными различиями, такими как: делетированные участки (RD), однонуклеотидные полиморфизмы и крупные полиморфные участки, а также инсерции, как, например, известная в настоящее время вставка IS6110.

M. Behr [12], оценивая поэтапно отдельные генетические локусы и кластеры генов субштаммов и анализируя происхождение и генетическую вариабельность по количеству копий

IS6110 и наличию/отсутствию mpt64, установил, что наименьшее количество хромосомных делеций имеет кластер *M. bovis* BCG: Japan, Moreau, Russia, отнесенный к наиболее «ранней группе» штаммов *M. bovis* BCG.

Штамм *M. bovis* BCG, полученный Л.А. Тарасевичем в 1924 г. от А. Calmette и С. Guérin, культивировали в России на плотной картофельной среде Павловского. По рекомендации авторов для предупреждения реверсии вирулентности штамма культуру дважды в год пересекали на среду Павловского, приготовленную с добавлением бычьей желчи.

Результаты работ G.G. Mahairas с соавт. [5] и M. Behr с соавт. [12] актуализировали изучение причин генетической вариативности субштаммов *M. bovis* BCG. На совещании ВОЗ по вопросам вакцины БЦЖ (Лондон, декабрь 2003) [13] было подчеркнуто, что доказательства молекулярно-генетической изменчивости, выявленной в субштаммах BCG, неоспоримы, а существующие рекомендации ВОЗ к вакцине БЦЖ устарели и подлежат пересмотру. Показана необходимость использования в процессе производства и контроля препарата молекулярно-генетических методов. Внедрение в производство вакцины системы «посевной серии» («seed-lot system») и лиофилизация ПС способствовали принятию мер, направленных на изменение методологии для стабилизации генетических свойств субштаммов. Количество официально принятых ВОЗ субштаммов *M. bovis* BCG фактически сократилось до пяти: BCG-I (Russia), Tokyo 172-1, Danish 1331, Moreau RDJ и Pasteur 1173-P2. На основе этих субштаммов в мире производят 90% применяемых (лицензированных) вакцин.

Если существование различий между субштаммами в настоящее время принято всеми исследователями, то о преимуществе какого-либо из них нет единого мнения [14, 15]. Этот вопрос пока не имеет решения из-за отсутствия единых методов контроля, а также различий в количестве лиц, вакцинированных препаратами, приготовленными из разных субштаммов. Актуальность оценки вариативности субштаммов *M. bovis* BCG для политики иммунизации остается недостаточно ясной, несмотря на большое количество исследований [5].

В течение последнего десятилетия уделено значительное внимание изучению генома ПС *M. bovis* BCG-I (Russia) [16–19]: полногеномное секвенирование с последующим анализом структуры генома, оценкой его генетической вариативности и структурных перестроек, которые могут свидетельствовать о его генетической нестабильности. Проведен также фрагментар-

ный анализ, анализ tandemных повторов и дупликаций (variable number of tandem repeats, VNTR), сполиготипирование (spacer oligonucleotide type, spoligotype) и изучение инсерционного элемента IS6110. Результаты исследований позволили установить длину единственной кольцевой хромосомы *M. bovis* BCG-I (Russia), протяженность которой составляла 4370706 п.н. В ходе исследования также дополнительно было установлено наличие делетированного региона RD1 (гены Rv3871–Rv3879c) и дублированного участка DU2 – в геноме ПС *M. bovis* BCG-I, включающего в себя кластер из 20 генов (Rv3299c–Rv3317). Также стоит отметить, что подобные размеры генома имеют ранние субштаммы *M. bovis* BCG – Tokyo и Moreau, которые также включены в группу DU2-1 в силу наличия двух повторяющихся элементов IS6110 в области гена *phoP*. Кроме того, дополнительный анализ VNTR локусов [16, 17] показал специфический для генома ПС *M. bovis* BCG-I профиль, что позволяет дифференцировать его от других субштаммов.

По данным Р. Луданного с соавт. [17, 18], расчет генетической дистанции между штаммами, полногеномные последовательности которых размещены в генетическом банке данных, показал наиболее высокий процент гомологии (96,5%) между российским и японским субштаммами *M. bovis* BCG-I.

В работе О. Narvskaya с соавт. [19] представлены данные проведенного в Санкт-Петербурге в 2016 г. сравнительного исследования полногеномного секвенирования российского субштамма *M. bovis* BCG-I и клинических изолятов, выделенных от детей с тяжелыми осложнениями (остеиты) на введение вакцины БЦЖ. Показано, что длительное существование БЦЖ в организме вакцинированного не оказывало влияния на генетические свойства этих микобактерий. По мнению авторов, выявленная вариативность в профилях экспрессии генов не нарушает стабильность генома субштамма BCG-I. Все девять клинических изолятов были устойчивы к пиразинамиду из-за мутаций в гене *recA*, обеспечивающих высокую *in vivo* резистентность у *M. bovis*.

По мнению Р.М. Keller с соавт. [20], ген *recA*, являющийся ключевым элементом гомологичной рекомбинации, играющий значительную роль в эволюции генома микобактерий, в субштамме *M. bovis* BCG-I (Russia) поврежден. Эта мутация привела к смещению рамки считывания, что, возможно, способствовало генетической стабильности российского субштамма. Однако другие авторы [16, 19] не подтвердили эти данные.

На предприятии НПО «Микроген» проведено полногеномное секвенирование и последующий

сравнительный анализ образцов посевной серии *M. bovis* BCG-I 368 «щ» на всех стадиях получения вакцины. В результате исследования подтверждена подлинность и показана стабильность генома посевной серии от первого высева из исходной ампулы с ПС до готового продукта [21].

В настоящее время, развитие и распространение молекулярно-генетических методов в лабораторной практике позволяет не только идентифицировать субштамм, но и контролировать стабильность его свойств при хранении. Так, при сравнительном исследовании полногеномной копии субштамма *M. bovis* BCG SL222 Sofia, производной (9 генерация) от субштамма *M. bovis* BCG-I Russia (лиофилизация 1971 г.), были обнаружены все характерные генетические особенности, присущие российскому субштамму BCG-I [22, 23], в частности протяженная делеция RD1. Различия в длинах кольцевых хромосом штаммов оказались минимальны: L = 4370705 п.н. [CP_013741, Россия] и L = 4370706 п.н. [CP_064405, София]. Также не нашлось значимых различий в GC-составе, а установленные генетические изменения, отличающие оба штамма, также минимальны (4 SNP) и не превышают 5%. Исследования T. Stefanova [22], S. Panaiotov с соавт. [23] подтвердили, что, несмотря на многолетнюю, более чем 50-летнюю, историю культивирования, субштамм *M. bovis* BCG-I и его производное *M. bovis* BCG SL222 Sofia генетически стабильны. Сравнительный анализ двух полногеномных копий — BCG-I, seed-lot 368 «щ», Russia [CP_CP013741] и BCG SL222, Sofia [CP_064405] не показал высокий уровень различий.

Описанные одонуклеотидные генетические изменения и небольшие структурные перестройки не превышают, согласно проведенным нами расчетам, 5%. С нашей точки зрения, с учетом того, что фенотипические изменения минимальны и не превышают 5%, строго говорить о выделении болгарского субштамма BCG SL222, Sofia [CP_064405] в отдельный субштамм, возможно, преждевременно. При этом авторы также указывают, что некоторые крупные делеции и инсерции подлежат уточнению, а характер изменений не влияет на фенотипические свойства. Структурные изменения в настоящее время авторами уточняются.

Получение посевной серии субштамма *M. bovis* BCG-I

Очередную посевную серию *M. bovis* BCG-I изготавливают из наиболее ранней посевной серии.

В технологической схеме приготовления посевной серии выделяют следующие этапы:

- высев из ампул с лиофилизатом посевного материала *M. bovis* BCG-I на картофельную среду Павловского (как правило, используется наиболее ранний исходный посевной материал);
- пересев на картофельную среду Павловского;
- накопление культуры *M. bovis* BCG-I – пересев на поверхность жидкой питательной среды ВКЛ (в названии среды указана аббревиатура фамилий исследователей – Вакенгут А.М., Козловская С.Л., Лещинская Е.Н.).

Образующиеся в процессе роста на поверхности питательной среды пленки культуры *M. bovis* BCG-I собирают, гомогенизируют, центрифугируют, разводят до необходимой концентрации, разливают в ампулы, лиофилизируют. Полученная серия *M. bovis* BCG-I после подтверждения на соответствие предусмотренным для ее аттестации тестам является посевной серией для приготовления вакцины БЦЖ.

От точности выполнения всех операций, составляющих технологический процесс, зависит качество конечного продукта [24, 25]. Так, производственный посев БЦЖ проводят в стандартных колбах установленной емкости с одинаковым объемом и составом питательной среды при определенном объеме внесенного инокулята. Такой валидированный подход позволяет стандартизировать условия накопления бактериальной массы в каждой емкости за счет одинаковой площади поверхности роста пленки и аэрации, а также завершать культивирование одномоментно во всех емкостях в конце логарифмической фазы роста, когда клетки наиболее устойчивы к процессам гомогенизации и лиофилизации¹.

ПС должна иметь историю происхождения и соответствовать международным и национальным требованиям — это одно из основных условий получения качественного препарата Вакцина туберкулезная (БЦЖ).

Хранят посевной материал при температуре не выше минус 18 °С. Для изготовления промышленных серий вакцины БЦЖ необходимое количество ампул лиофилизата ПС передают 1–2 раза в год предприятию-изготовителю.

Методы контроля посевной серии

Международные и национальные требования имеют рекомендательный характер, оставляя детали проведения каждого из испытаний на рассмотрение национальных органов надзора. Методы контроля каждая страна, производящая вакцину, использует согласно национальным требованиям.

¹ Obayashi Y. Dried BCG vaccine. WHO monograph series, No. 28. Geneva, 1955.

Отечественные требования к посевному материалу представлены в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV)² в виде списка регламентированных показателей с указанием методов контроля. Перечень соответствует Международным требованиям – руководствам ВОЗ³.

Кроме того, только в ГФ РФ XIV включен инновационный иммунобиологический тест с отечественным препаратом Диаскинтест® на специфическую безопасность ПС [26]. Диаскинтест® – рекомбинантный белок, содержащий два связанных между собой антигена – ESAT6 и CFP10, характерных для вирулентных штаммов микобактерий туберкулеза. Данные антигены отсутствуют в вакцинном штамме *M. bovis* BCG, поэтому Диаскинтест® вызывает иммунную реакцию только у морских свинок, сенсибилизированных микобактериями туберкулеза. У сенсибилизированных БЦЖ животных ответные реакции на Диаскинтест® должны отсутствовать.

Согласно отечественным документам на препарат и на посевной материал вакцины БЦЖ требования предъявляются к следующим показателям качества.

Подлинность

Оценивается характерный рост колоний, морфология бактерий; проводятся молекулярно-генетические испытания.

Специфическая активность (жизнеспособность)

Испытания ПС по этому показателю проводят ежегодно. Используют валидированный метод, предложенный ВОЗ⁴. Метод является «золотым стандартом» при контроле вакцины туберкулезной БЦЖ. Оценивают специфическую активность по показателю жизнеспособности при параллельном испытании с действующим ФСО 3.2.00420 «Стандартный образец вакцины туберкулезной (БЦЖ) сухой» (далее ФСО). Через 26–30 сут культивирования трех разведенных посевного материала и стандарта определяют число колоний БЦЖ, выросших на плотной среде Левенштейна–Йенсена. Рассчитывают число КОЕ в 1 мг бактериальной массы.

Следует отметить, что показатели общего количества бактерий и числа выросших коло-

ний при посеве (КОЕ) не могут быть единичными для вакцин, приготовленных из различных субштаммов, и/или вакцин, различающихся по технологии и методам изготовления⁵. Существенное различие в методах и сроках культивирования субштаммов BCG, объеме и составе питательных сред в разных производственных учреждениях в странах в значительной мере влияют на выход бактериальной массы, устойчивости ее к лиофильному высушиванию, числу жизнеспособных клеток в препарате. Имеют значение размеры клеток микобактерий. Так, размер клеток японского субштамма *M. bovis* BCG (*M. bovis* BCG Tokyo 172-1) значительно меньше размера клеток датского и российского субштаммов, поэтому в 1 мг *M. bovis* BCG Tokyo 172-1 число микобактерий значительно больше, чем в 1 мг бактериальной массы других субштаммов. Все перечисленные факторы могут по совокупности обусловить различия в показателях.

Отсутствие посторонних бактерий и грибов

Испытание проводят методом прямого посева.

Специфическая безопасность

1) Тест на отсутствие вирулентных микобактерий. Вирулентные микобактерии должны отсутствовать.

Испытание проводят биологическим методом: на 10 морских свинок, каждой из которых подкожно вводят по 1,0 мл суспензии, содержащей 5 мг лиофилизата ПС в растворе натрия хлорида 0,9%. Наблюдают за животными в течение 6 недель (к концу срока наблюдения должны оставаться живыми не менее 9 животных). При макроскопическом и микроскопическом исследованиях внутренних органов у всех животных не должно быть признаков туберкулезной инфекции.

2) Иммунобиологический метод. Тест на отсутствие в ПС на основе вакцинного штамма *M. bovis* BCG-I генных участков, ответственных за выработку антигенов ESAT6 и CFP10. Испытание проводят иммунобиологическим методом: находящимся под испытанием на специфическую безопасность 6 морским свинкам за сутки до окончания исследования ставят внутрикожные пробы

² Фармакопейная статья 3.3.1.0018.15 Вакцина туберкулезная БЦЖ живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ Annex 3. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-second report. (WHO technical report series; no. 979). WHO; 2013.

⁴ Designs for *in vitro* assays of BCG products. Appendix 1, 2, 3. WHO/TB/Techn. Guide/6; 1965.

⁵ Annex 3. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-second report. (WHO technical report series; no. 979). WHO; 2013.

с 2 ТЕ очищенного туберкулина и с 0,2 мкг препарата Диаскинтест® (аллергена туберкулезного рекомбинантного в стандартном разведении). Ответные реакции учитывают через 24 ч. Реакции на туберкулин должны быть положительными, а на Диаскинтест® – отрицательными, что свидетельствует об отсутствии способности испытуемого образца индуцировать гиперчувствительность замедленного типа к антигенам ESAT6 и CFP10, которые имеются только в вирулентных микобактериях.

Тест на кожную реактогенность

Испытание проводят на 6 морских свинках весом не менее 250 г. В рандомизированном исследовании вводят внутрикожно по 0,1 мл суспензии (1 мг/мл) посевного материала и ее разведения в 10 и 100 раз и ФСО в таких же разведениях. Наблюдают за животными не менее 4 недель. Не должно быть статистически значимых различий в размерах реакций на испытуемые препараты.

Протективные свойства

Испытание проводят в биологическом тесте (на морских свинках). Группе животных (не менее 10 животных массой 250–300 г) вводят ПС. Контрольную группу составляют интактные животные.

Через 2–3 мес. всем животным вводят подкожно в левую паховую область 14-суточную культуру 3 генерации вирулентного штамма *M. tuberculosis*. Животные всех групп подвергаются эвтаназии после гибели от генерализованного туберкулеза 1–2 морских свинок контрольной группы. Поражение внутренних органов и лимфатических узлов оценивают визуально, принимая тотальное поражение за 100%⁶.

Метод подкожного заражения используют при отсутствии установки для аэрогенного заражения.

Контроль проводят параллельно с Международным референс препаратом или с ФСО вакцины БЦЖ.

Остаточная вирулентность (приживаемость)

Остаточная вирулентность может быть оценена:

- 1) на белых мышах при введении суспензии ПС в хвостовую вену (контроль степени размноже-

ния микобактерий во внутренних органах животного в отдельные временные промежутки);

- 2) на морских свинках (по степени поражения на месте подкожного введения суспензии ПС; по степени распространения поражений во внутренних органах животного).

Выбор метода введения суспензии зависит от вида животного.

Для характеристики динамики размножения микобактерий *in vivo* применяют так называемый индекс поражения (выраженное в логарифмах количество клеток микобактерий в селезенке, легких, печени, костной ткани) в каждый срок наблюдения относительно количества микобактерий, высеванных из органов через 24 ч после иммунизации.

Заключение

ВОЗ рекомендует использовать в качестве исходного материала посевную серию, приготовленную на основе определенного, согласованного национальным органом контроля, *M. bovis* субштамм BCG. В настоящее время в практике производства российской вакцины БЦЖ основой для изготовления препаратов (БЦЖ, БЦЖ-М и Имурон-вак) является посевная серия 368 «щ» (2006 г.). Результаты исследований образцов посевной серии 368 «щ» субштамма *M. bovis* BCG-I (Russia) методами мультиплексной ПЦР и полногеномного секвенирования, периодически выполняемых на этапах производства вакцины БЦЖ, подтверждают подлинность и стабильность материала. Не отмечено изменений и протективных свойств при сопоставлении по этому показателю всех посевных серий, применявшихся для производства отечественной вакцины БЦЖ в течение более 60 лет. В 2021–2022 гг. в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России проведена очередная переаттестация ПС 368 «щ» (1966 г.). Подтверждена стабильность серии по всем показателям, включая остаточную вирулентность и протективные свойства штамма в опытах *in vivo*.

Таким образом, контроль стабильности генетических и биологических свойств на протяжении всего периода производства и хранения посевной серии вакцины БЦЖ обеспечивает получение качественного стабильного по своим свойствам препарата вакцины БЦЖ, соответствующего всем требованиям нормативной документации.

Литература/References

1. Вакенгут АМ, Доликов КЕ, Лещинская ЕН. Способ приготовления сухой вакцины БЦЖ. Авторское

свидетельство № 66674; 1946. [Wakengut AM, Dolikov KE, Leshchinskaya EN. Method of preparing

⁶ Нахимсон ЛИ. Экспериментальное изучение препаратов для противотуберкулезной вакцинации: дис. ... д-ра мед. наук. М.; 1953.

- dry BCG vaccine. Certificate of authorship No. 66674; 1946 (In Russ.)]
2. Леви ДТ, Обухов ЮИ, Александрова НВ, Волкова РА, Эльберт ЕВ, Альварес Фигероа МВ и др. Оценка подлинности и стабильности вакцины БЦЖ методом мультиплексной ПЦР. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(1):49–54. [Levi DT, Obukhov Yul, Aleksandrova NV, Volkova RA, Elbert EV, Alvarez Figueroa MV, et al. Identity and stability assessment of BCG vaccine by multiplex PCR. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(1):49–54 (In Russ.)]
 3. Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA. Identification of sub-strains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine*. 2001;19:2146–51. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00369-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00369-8)
 4. Dubos RJ, Pierce CH. Differential characteristics *in vitro* and *in vivo* of several substrains of BCG. IV. Immunizing effectiveness. *Am Rev Tuberc*. 1956;74(5):699–717.
 5. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996;178(5):1274–82. <https://doi.org/10.1128/jb.178.5.1274-1282.1996>
 6. Abdallah AM, Behr MA. Evolution and Strain Variation in BCG. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1019:155–69.
 7. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. 1999;284(5419):1520–3. <https://doi.org/10.1126/science.284.5419.1520>
 8. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(13):5596–601. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700869104>
 9. Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol*. 1999;32(3):643–55. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01383.x>
 10. Mostowy S, Tsolaki AG, Small PM, Behr MA. The *in vitro* evolution of BCG vaccines. *Vaccine*. 2003;21(27–30):4270–4. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00484-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00484-5)
 11. Salamon H, Kato-Maeda M, Small PM, Drenkow J, Gingeras TR. Detection of deleted genomic DNA using a semiautomated computational analysis of GeneChip data. *Genome Res*. 2000;10(12):2044–54. <https://doi.org/10.1101/gr-gr-1529r>
 12. Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine*. 1999;17(7-8):915–22. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00277-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00277-1)
 13. Corbel MJ, Fruth U, Griffiths E, Knezevic I. Report on a WHO consultation on the characterisation of BCG strains, Imperial College, London 15–16 December 2003. *Vaccine*. 2004;22(21–22):2675–80. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.050>
 14. Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine*. 2009;27(11):1710–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.034>
 15. Brewer TF, Colditz GA. Relationship between Bacille Calmette–Guérin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 1995;20(1):126–35. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.1.126>
 16. Sotnikova EA, Shitikov EA, Malakhova MV, Kostyukova ES, Ilina EN, Atrasheuskaya AV, et al. Complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* strain BCG-I (Russia). *Genome Announc*. 2016;4(2):e00182-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00182-16>
 17. Ludannyy R, Alvarez Figueroa M, Levi D, Markelov M, Dedkov V, Aleksandrova N, Shipulin G. Whole-genome sequence of *Mycobacterium bovis* BCG-1 (Russia). *Genome Announc*. 2015;3(6):e01320-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01320-15>
 18. Луданный РИ, Маркелов МЛ, Дедков ВГ, Шипулин ГА, Леви ДТ, Александрова НВ. Сравнительная геномика вакцинного штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia). В: *Сборник научных трудов к 50-летию Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора*. М.: ООО «Издательство «Династия»; 2013. С. 181–182. [Ludannyy RI, Markelov ML, Dedkov VG, Shipulin GA, Levi DT, Aleksandrova NV. Comparative genomics of *M. bovis* BCG-1 (Russia) vaccine strain. In: *Collection of Scientific Papers for the 50th Anniversary of the Central Research Institute for Epidemiology of Rospotrebnadzor*. Moscow: Dynasty Publishing House; 2013. P. 181–182 (In Russ.)]
 19. Narvskaya O, Starkova D, Levi D, Alexandrova N, Molchanov V, Chernyaeva E, et al. First insight into the whole-genome sequence variations in *Mycobacterium bovis* BCG-1 (Russia) vaccine seed lots and their progeny clinical isolates from children with BCG-induced adverse events. *BMC Genomics*. 2020;21(1):567. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06973-5>
 20. Keller PM, Böttger EC, Sander P. Tuberculosis vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Russia is a natural recA mutant. *BMC Microbiol*. 2008;8(1):120. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-120>
 21. Отрашевская ЕВ, Винокурова ВН, Шитиков ЕА, Сотникова ЕА, Перевышина ТА, Колченко СА и др. Изучение генетической стабильности суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) в процессе производства вакцины БЦЖ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;2:58–67. [Otrashevskaya EV, Vinokurova VN, Shilikov EA, Sotnikova EA, Perevyshina TA, Kolchenko SA, et al. *M. bovis* BCG-1 (Russia) sub-strain genome stability investigation within the entire production process. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;2:58–67 (In Russ.)] <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-2-58-67>
 22. Stefanova T. Genetic stability of BCG production in Bulgaria. *Probl Infect Parasit Dis*. 2015;43:30–5.

23. Panaiotov S, Hodzhev Y, Tolchikov V, Tsafarova B, Mihailov A, Stefanova T. Complete genome sequence, genome stability and phylogeny of the vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG SL222 Sofia. *Vaccines*. 2021;9(3):237. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030237>
24. Guallar-Garrido S, Almiñana-Rapún F, Campo-Pérez V, Torrents E, Luquin M, Julián E. BCG substrains change their outermost surface as a function of growth media. *Vaccines*. 2022;10(1):40. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010040>
25. Prados-Rosales R, Carreño LJ, Weinrick B, Batista-Gonzalez A, Glatman-Freedman A, Xu J, et al. The type of growth medium affects the presence of a mycobacterial capsule and is associated with differences in protective efficacy of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 2016;214:426–37. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw153>
26. Леви ДТ, Рухамина МЛ. Доклинические исследования препарата «Диаскинест®». В кн.: *Кожная проба с препаратом «Диаскинест» — новые возможности идентификации туберкулезной инфекции*. Пальцев МА, ред. М.: Медицина; 2010. С. 65–88. [Levi DT, Ruhamina ML. Preclinical studies of Diaskintest®. In: *Skin test with Diaskintest: new opportunities for the identification of tuberculosis infection*. Paltsev MA, ed. Moscow: Meditsina; 2010. P. 65–88 (In Russ.)]

Вклад авторов. Д.Т. Леви — разработка дизайна исследования, обработка и анализ данных литературы и нормативной документации, написание и критическое обсуждение текста рукописи; Р.И. Луданный — написание текста рукописи, относящегося к вопросам молекулярно-генетических особенностей и стабильности субштаммов *M. bovis* BCG, научное редактирование текста рукописи; Ю.И. Обухов — критическое обсуждение и научное редактирование текста рукописи; А.А. Савина — сбор и обработка данных литературы; А.А. Алесина — сбор и обработка данных литературы; Н.В. Александрова — анализ данных литературы, написание и критическое обсуждение текста рукописи, определение структуры статьи.

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. Д.Т. Леви является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contributions. D.T. Levi—elaboration of the study design, processing and analysis of literature and regulatory data, writing and critical discussion of the text of the manuscript; R.I. Ludannyy—writing of the text of the manuscript on molecular and genetic features and stability of *M. bovis* BCG substrains, scientific editing of the text of the manuscript; Yu.I. Obukhov—critical discussion and scientific editing of the text of the manuscript; A.A. Savina—collection and processing of literature data; A.A. Alesina—collection and processing of literature data; N.V. Aleksandrova—analysis of literature data, writing and critical discussion of the text of the manuscript, outlining of the article.

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. D.T. Levi is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0783-9282>
Levi@expmed.ru

Луданный Руслан Игоревич, канд. биол. наук.
ORCID: 0000-0002-8094-855X
ludannuri@mokptd.ru

Обухов Юрий Иванович. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7729-9800>
Obukhov@expmed.ru

Савина Анна Александровна. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2134-9159>
savina@expmed.ru

Алесина Анна Алексеевна.
alesina@expmed.ru

Александрова Наталья Владимировна, канд. мед. наук. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1069-8065>
aleksandrovaNV@expmed.ru

Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0783-9282>
Levi@expmed.ru

Ruslan I. Ludannyy, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: 0000-0002-8094-855X
ludannuri@mokptd.ru

Yuriy I. Obukhov. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7729-9800>
Obukhov@expmed.ru

Anna A. Savina. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2134-9159>
savina@expmed.ru

Anna A. Alesina.
alesina@expmed.ru

Natalia V. Aleksandrova, Cand. Sci. (Med.).
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1069-8065>
aleksandrovaNV@expmed.ru

Поступила 23.11.2021

После доработки 17.05.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Online first 30.08.2022

Received 23 November 2021

Revised 17 May 2022

Accepted 10 June 2022

Online first 30 August 2022

УДК 615.37:615.07

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-241-248>

Обзорная статья | Review article



Этапы стандартизации препаратов антирезусного иммуноглобулина человека по показателю качества «Специфическая активность»

Н.С. Вильданова^{1,✉}, Е.С. Кормщикова¹, Е.Н. Калинина¹, К.А. Воробьев¹,
И.В. Парамонов¹, Э.Ю. Кудашева²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», ул. Красноармейская, д. 72, г. Киров, 610027, Российская Федерация

² 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

✉ Вильданова Наталия Сергеевна; vildanova@niigpk.ru

Резюме

Препараты антирезусного иммуноглобулина человека, получаемые из иммунной плазмы крови человека, являются востребованными и высокоэффективными средствами специфической анти-D профилактики перинатальных осложнений и при лечении первичной иммунной тромбоцитопении. Эффективность предотвращения иммунного ответа напрямую зависит от дозы введенного действующего вещества препарата. Для повышения точности количественного определения анти-D антител рекомендовано использование стандартных образцов (СО), аттестованных в международных единицах. Цель работы – анализ основных этапов разработки международного стандартного образца (МСО) для определения специфической активности антирезусного иммуноглобулина человека и обоснование необходимости создания отечественного СО содержания антирезус Rh₀(D) антител. В статье описаны процесс создания первого и последующих МСО, процедура установления эквивалента международных единиц для выражения концентрации антирезус Rh₀(D) антител, приведены характеристики сырья и продуктов, а также методы определения антирезусных антител, используемые при аттестации МСО. Сделан вывод о необходимости разработки и аттестации отечественного СО содержания антирезус Rh₀(D) антител, соответствующего требованиям нормативных актов Российской Федерации в данной области.

Ключевые слова: антирезусный иммуноглобулин человека; специфическая активность; стандартный образец; международный стандартный образец; разработка и аттестация стандартного образца

Для цитирования: Вильданова Н.С., Кормщикова Е.С., Калинина Е.Н., Воробьев К.А., Парамонов И.В., Кудашева Э.Ю. Этапы стандартизации препаратов антирезусного иммуноглобулина человека по показателю качества «Специфическая активность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):241–248. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-241-248>

Human anti-D immunoglobulin preparations: potency standardisation milestones

N.S. Vildanova^{1,✉}, E.S. Kormshchikova¹, E.N. Kalinina¹, K.A. Vorobiev¹,
I.V. Paramonov¹, E.Yu. Kudasheva²

¹ Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, 72 Krasnoarmeyskaya St., Kirov 610027, Russian Federation

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

✉ Nataliya S. Vildanova; vildanova@niigpk.ru

Abstract

Human anti-D immunoglobulin preparations derived from human immune plasma are much needed and highly effective for specific anti-D prevention of perinatal complications and treatment of primary immune thrombocytopenia. The effectiveness of immune suppression is a direct function of the active ingredient dose received with the medicinal product. To improve the accuracy of anti-D antibody quantification, it is recommended to use certified reference materials with values assigned in international units (IUs). The aim of this study was to analyse the main stages in the development of the international standards (ISs) for human anti-D immunoglobulin potency testing and to substantiate the need for a national standard for anti-Rh₀ (anti-D) antibody quantification. The article describes the creation of the first and subsequent ISs, the procedure for establishing the IU equivalent for the anti-Rh₀ (anti-D) antibody concentration, the characteristics of the raw materials and preparations used, and the anti-Rh₀ (anti-D) antibody assay methods applied to certify the ISs. According to the study conclusions, it is necessary to develop and certify a national standard for the content of anti-Rh₀ (anti-D) antibodies that will meet the requirements of the corresponding Russian regulations.

Key words: human anti-D immunoglobulin; potency; reference standard; international standard; reference standard development and certification

For citation: Vildanova N.S., Kormshchikova E.S., Kalinina E.N., Vorobiev K.A., Paramonov I.V., Kudasheva E.Yu. Human anti-D immunoglobulin preparations: potency standardisation milestones. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):241–248. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-241-248>

Введение

Иммуноглобулин человека антирезус Rh₀(D) применяется для проведения специфической анти-D профилактики и на сегодня является одним из самых востребованных препаратов на основе иммунной плазмы крови человека [1–3]. Терапия иммуноглобулином человека антирезус Rh₀(D) осуществляется в целях уменьшения риска резус-иммунизации беременных женщин, заболеваемости новорожденных гемолитической болезнью и перинатальной смертности [1, 2, 4, 5]. Установлено, что введение анти-D иммуноглобулина снижает вероятность развития резус-конфликта примерно в 100 раз¹. Фармакологическое действие данного препарата реализуется за счет антирезус Rh₀(D) антител, спо-

собных нейтрализовать резус-положительные эритроциты плода, попавшие в кровоток матери.

Помимо основного показания к применению, внутривенный антирезусный иммуноглобулин может использоваться как альтернатива иммуноглобулину человека нормальному для внутривенного введения при лечении первичной иммунной тромбоцитопении у пациентов с положительным резус-фактором [6, 7]. Данные препараты необходимы для быстрого увеличения количества тромбоцитов, например при массивных кровотечениях или при подготовке к неотложным хирургическим вмешательствам [6]. Считается, что специфический иммуноглобулин насыщает рецепторы Fc-макрофагов эритроцитами с анти-D антителами.

¹ Письмо Минздрава России от 18.05.2017 № 15-4/10/2-3300 «О направлении клинических рекомендаций «Резус-сенситизация. Гемолитическая болезнь плода».

Это предотвращает разрушение тромбоцитов, покрытых аутоантителами [8].

Клиническая эффективность препаратов антирезусного иммуноглобулина напрямую зависит от количества введенных антител. Неправильно подобранная доза действующего вещества не обеспечит достижения требуемого результата лечения² [9, 10]. В этой связи повышение точности определения концентрации антирезус Rh₀(D) антител играет важную роль в обеспечении качества указанного лекарственного препарата.

Содержание анти-D антител оценивают по количеству образовавшихся иммунных комплексов с D-антигеном на поверхности эритроцитов³ и обозначают термином «Специфическая активность». Число таких комплексов часто сложно измерить в физических величинах, например, в граммах или молях. Поэтому для их выражения используются условные единицы. Первоначально такой условной единицей стал титр антител, то есть наибольшее разведение препарата, при котором наблюдается агглютинация эритроцитов любой интенсивности. Основным недостатком данного способа оценки результатов является высокая дискретность, которая увеличивается с возрастанием концентрации антител в исследуемом образце.

Для обозначения количества основного действующего вещества биологических препаратов эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) рекомендовали исследуемый препарат сравнивать с референсным образцом (стандартом, эталоном) с известным содержанием определяемого компонента [11, 12]. Для объективной оценки концентрации действующего вещества в биологических стандартных образцах (СО) исследование проводят с участием большого числа лабораторий из разных стран, а полученное значение показателя утверждается на международном уровне. Это позволяет выражать специфическую активность лекарственных препаратов в международных единицах (МЕ). Благодаря тому, что анализ проб, контролируемых в разных лабораториях, производится относительно одного и того же референсного образца, повышается правильность и воспроизводимость результатов иммунологических тестов⁴ [13, 14].

Цель работы — анализ основных этапов разработки международного стандартного образца (МСО) для определения специфической активности антирезусного иммуноглобулина человека и обоснование необходимости создания отечественного стандартного образца содержания антирезус Rh₀(D) антител.

Препараты иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D)

В настоящее время в государственный реестр лекарственных средств (ГРЛС) включено 7 препаратов антирезусного иммуноглобулина человека отечественного и зарубежного производства⁵. Рассматриваемые препараты выпускаются в форме растворов для внутривенного и внутримышечного введения и лиофилизата для приготовления раствора для внутримышечного введения. Содержание основного действующего вещества в импортных препаратах варьирует от 625 МЕ/мл (125 мкг/мл) до 3000 МЕ/мл (600 мкг/мл). Специфическая активность препарата, производимого в Российской Федерации, оценивается в титрах реакции агглютинации и составляет 1:1000 или 1:2000 (300 мкг/доза)⁶. В таблице 1 приведена информация о препаратах анти-D иммуноглобулина, включенных в ГРЛС.

Этапы разработки международного стандартного образца

Первый МСО разрабатывался для контроля количества неполных анти-D антител в сыворотке крови в период с 1953 по 1967 г. экспертной комиссией ВОЗ по биологической стандартизации совместно с Национальным институтом медицинских исследований и Международной справочной лабораторией ВОЗ по группам крови [15]. Необходимость создания данного МСО была обусловлена высокой вариабельностью результатов определения титра антител к антигену D в сыворотке крови, которое проводилось методом агглютинации в солевой среде. Результаты тестирования одного и того же образца в разных лабораториях могли различаться в 500 раз. В начале исследований предлагалось получить МСО из сыворотки крови, содержащей полные антирезусные антитела класса М, проявляющие агглютинирующие свойства как в со-

² Guideline on the clinical investigation of human anti-D immunoglobulin for intravenous and/or intramuscular use (EMA/CPMP/BPWG/575/99, rev. 1). EMA; 2007.

³ Кудашева ЭЮ. Совершенствование методических основ стандартизации и медицинского применения иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека: дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2020.

⁴ Там же.

⁵ <https://grls.rosminzdrav.ru>

⁶ Там же.

Таблица 1. Перечень препаратов антирезусного иммуноглобулина человека, включенных в государственный реестр лекарственных средств

Table 1. Human anti-D immunoglobulin preparations listed in the Russian State Register of Medicines

Торговое наименование <i>Trade name</i>	Дозировка <i>Strength</i>	Лекарственная форма <i>Dosage form</i>	Производитель <i>Manufacturer</i>
Резогам® Н <i>Rhesogam® N</i>	750 МЕ/мл (150 мкг/мл) <i>750 IU/mL (150 µg/mL)</i>	Раствор для внутривенного и внутримышечного введения <i>Solution for intravenous and intramuscular administration</i>	СиЭсЭл Беринг АГ, Швейцария <i>CSL Behring AG, Switzerland</i>
Иммуноро Кедрион <i>Immunoro Kedrion</i>	750 МЕ/мл (150 мкг/мл) <i>750 IU/mL (150 µg/mL)</i>	Лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения <i>Lyophilisate for solution for intramuscular administration</i>	Кедрион С.п.А., Италия <i>Kedrion S.p.A., Italy</i>
Резонатив <i>Rhesonativ</i>	625 МЕ/мл (125 мкг/мл) <i>625 IU/mL (125 µg/mL)</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>	Октафарма АБ, Швеция <i>Octapharma AB, Sweden</i>
КамРХО® <i>KamRho®</i>	750 МЕ/мл (150 мкг/мл) <i>750 IU/mL (150 µg/mL)</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>	Камада Лтд, Израиль <i>Kamada Ltd, Israel</i>
Иммуноглобулин человека антирезус Rho (D) <i>Human anti-D Immunoglobulin</i>	1:1000, 1:2000 (300 мкг/доза) <i>(300 µg/dose)</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>	Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Ивановская областная станция переливания крови», Россия <i>Ivanovo Regional Blood Transfusion Station, Regional Budgetary Healthcare Institution, Russia</i>
ГиперРХО®С/Д <i>HyperRHO® S/D</i>	3000 МЕ/мл (600 мкг/мл) <i>3000 IU/mL (600 µg/mL)</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>	Грифолз Терапьютикс ЛЛС, США <i>Grifols Therapeutics LLC, USA</i>
Партобулин СДФ <i>Partobulin SDF</i>	1250 МЕ/мл (250 мкг/мл) <i>1250 IU/mL (250 µg/mL)</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular administration</i>	Бакстер АГ, Австрия <i>Baxter AG, Austria</i>

левой, так и в коллоидной среде. Однако этот дефицитный материал оказался нестабильным. Поэтому было принято решение изготовить МСО на основе неполных анти-D антител класса G, которые вызывают агглютинацию эритроцитов только при некоторых условиях, например при обработке клеток протеолитическими ферментами [15, 16]. После оценки специфичности и титра антител в исходных сыворотках крови, их пулирования и розлива получили 3350 ампул, содержащих по 0,5 мл лиофильно высушенной стерильной сыворотки. Испытания по изучению титра анти-D антител в изготовленных образцах проводили в 29 специализированных лабораториях из 21 страны методом с применением суспензии альбумина (albumin suspension method), методом с замещением альбумина (albumin displacement method), методом с ферментативной обработкой папаином (enzyme treatment method, using papain) и непрямой антиглобулиновым тестом (indirect antiglobulin test). Полученные значения титров варьировали

от 1:4 до 1:2000. Проверка стабильности показала сохранность активности МСО в течение 10 месяцев при температурах хранения минус 10, 4, 20 и 37 °С. Следует отметить, что для выражения концентрации антител в данной сыворотке впервые установлен эквивалент МЕ, за который принята мода обратных значений титров, полученных с применением суспензии альбумина (albumin suspension method), – 64 МЕ/мл. В соответствии с разрешением, выданным Комитетом экспертов ВОЗ по биологической стандартизации в 1968 г., этот материал признан МСО [15]. Утвержденный МСО использовали для оценки содержания анти-D антител в сыворотке и плазме крови лиц, иммунизированных к D-антигену. Оставалась нерешенной задача контроля специфической активности антирезусного иммуноглобулина человека, внедрявшегося в клиническую практику в то время [17].

Для повышения точности количественного определения основного действующего вещества препаратов анти-D иммуноглобулина в 1977 г.

ВОЗ утвержден в качестве МСО лиофильно высушенный концентрат антирезус Rh₀(D) антител, выделенный из иммунной плазмы крови доноров, которому присвоен код 68/419. В международном исследовании по его аттестации принимали участие научные коллективы 17 лабораторий из 11 стран [11]. Анализ содержания антирезус Rh₀(D) антител проводили методами меченая иммуноглобулина радиоактивным йодом, автоматической и ручной гемагглютинацией. Специфическая активность образца 68/419, рассчитанная по отношению к МСО для контроля неполных анти-D антител в сыворотке крови, составила 300 МЕ/мл [11].

В конце 90-х годов XX века обнаружение в МСО ВОЗ рибонуклеиновой кислоты гепатита С привело к прекращению обращения данного образца. В то же время намерение Европейского директора по качеству лекарственных средств (EDQM) разработать биологический эталонный препарат (BRP) Европейской фармакопеи (ЕФ) для анти-D иммуноглобулина привело к сотрудничеству ВОЗ и EDQM для установления «глобального» МСО (ВОЗ и ЕФ) [18]. К этому времени в монографию ЕФ⁷ были включены новые методики количественного определения анти-D антител (конкурентный иммуноферментный анализ (ИФА) и проточная цитофлуориметрия) как альтернатива метода автоматической гемагглютинации [19, 20]. Кандидат в МСО получали смешиванием двух антирезусных иммуноглобулинов человека, произведенных в США компаниями Bayer Corporation и Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. Объединенный препарат разводили до содержания IgG 2% (приблизительная концентрация антирезусных антител 300 МЕ/мл) смесью 0,25 М глицина и 0,068 М натрия хлорида (рН 6,8). Иммуноглобулин разливали в ампулы по 1 мл и лиофильно высушивали. Кандидат во второй МСО, которому присвоен код 01/572⁸, аттестован при участии 25 лабораторий из 15 стран [18]. Для определения антирезус Rh₀(D) антител применяли метод непрямой агглютинации с помощью автоматического анализатора, конкурентный ИФА, проточную цитофлуориметрию и другие методы гемагглютинации. В результате межлабораторных

исследований установлена специфическая активность кандидата в МСО 01/572, которая составила 285 МЕ/мл. В 2003 г. разработанный МСО утвержден Комитетом экспертов ВОЗ по биологической стандартизации как второй МСО анти-D иммуноглобулина и Комиссией ЕФ как первый биологический эталонный препарат для определения специфической активности анти-D иммуноглобулина человека [18].

В 2019 г. разработан третий МСО (код 16/332)⁹. При его аттестации использовали те же методы, что и при утверждении МСО 01/572. В исследовании по аттестации МСО 16/332 была задействована 21 лаборатория из 15 стран [17]. МСО 16/332 представляет собой лиофилизат 2% раствора анти-D иммуноглобулина, стабилизированного 0,25 М глицином и 0,4% натрия хлоридом (рН 6,5). Исходный препарат получен от компании Grifols Therapeutics LLC, США. Концентрация антирезус Rh₀(D) антител в каждой ампуле составила 297 МЕ/мл [17].

Обоснование необходимости разработки стандартного образца содержания антирезус Rh₀(D) антител в Российской Федерации

Ограничения применения МСО для определения специфической активности анти-D иммуноглобулина связаны с необходимостью получения разрешительных документов для его ввоза на территорию Российской Федерации и соблюдения «холодовой цепи» при транспортировке, что значительно увеличивает длительность доставки и, как следствие, стоимость образца. Кроме того, МСО не в полной мере соответствует требованиям отечественной нормативной базы в области разработки СО, согласно которым значение аттестуемой характеристики должно приводиться с указанием неопределенности, установленной в ходе аттестации¹⁰ [14, 21, 22].

В настоящее время в Российской Федерации отсутствует фармакопейный СО содержания антирезус Rh₀(D) антител. Специфическая активность антирезусного иммуноглобулина человека отечественного производства оценивается полуколичественным методом в реакции не-

⁷ 2.7.13 Assay of human anti-D immunoglobulin. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2022.

⁸ WHO International Standard Anti-D Immunoglobulin, NIBSC code: 01/572. Instructions for Use. <https://nibsc.org/documents/ifu/01-572.pdf>

⁹ WHO International Standard Anti-D Immunoglobulin, NIBSC code: 16/332. Instructions for Use. <https://www.nibsc.org/documents/ifu/16-332.pdf>

¹⁰ ГОСТ 8.315-2019 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов.

Общая фармакопейная статья 1.1.0007.18 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 1; 2018.

прямой агглютинации и выражается в титрах¹¹. Решением данной проблемы является создание фармакопейного СО содержания антирезус Rh₀(D) антител. При этом его аттестацию следует проводить по отношению к МСО с использованием методов гемагглютинации, ИФА и проточной цитофлуориметрии. Также для СО должна быть предусмотрена оценка неопределенности аттестованного значения.

Таким образом, актуальность разработки отечественного фармакопейного СО содержания антирезус Rh₀(D) антител в Российской Федерации обусловлена высокой клинической значимостью препаратов антирезусного иммуноглобулина, необходимостью точной оценки специфической активности и обязательной аттестацией СО в соответствии с требованиями нормативных документов Российской Федерации. В настоящее время в ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России» создана и регулярно пополняется база доноров, в плазме крови которых концентрация анти-D антител установлена в титрах и МЕ/мл с использованием метода непрямой агглютинации в гелевых картах, что обеспечивает потребность в сырье для производства фармакопейного СО [23].

Литература/References

1. Оловникова НИ, Николаева ТЛ, Эршлер МА. Иммунопрофилактика резус-иммунизации: перспектива создания моноклонального иммуноглобулина для предупреждения гемолитической болезни новорожденных. *Иммунология*. 2018;39(1):74–80. [Olovnikova NI, Nikolaeva TL, Ershler MA. Immunization of rhesus immunization: the prospect of a monoclonal immunoglobulin to prevent haemolytic disease of the newborn. *Immunologiya = Immunology*. 2018;39(1):74–80 (In Russ.)]
2. Павлова НГ. Анти-D-иммунопрофилактика. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2015;64(3):52–7. [Pavlova NG. Anti-D-immunoprophylaxis. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2015;64(3):52–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17816/IOWD64352-57>
3. Четкин АВ, Данильченко ВВ, Григорьян МШ, Воробей ЛГ, Плоцкий РА. Анализ показателей деятельности службы крови Российской Федерации в 2019 году. *Трансфузиология*. 2020;21(3):200–10. [Chechetkin AV, Danilchenko VV, Grigorjan MS, Vorobey LG, Plotkiy RA. Analysis of activity indicators of the blood service of the Russian Federation in 2019. *Transfusiology*. 2020;21(3):200–10 (In Russ.)]
4. Silver RM. RhD immune globulin: over 50 years of remarkable progress! *BIOG*. 2016;123(8):1347. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.13868>
5. Pegoraro V, Urbinati D, Visser GHA, Di Renzo GC, Zipursky A, Stotler BA, Spitalnik SL. Hemolytic disease of the fetus and newborn due to Rh(D) incompatibility: a preventable disease that still produces significant morbidity and mortality in children. *PLoS One*. 2020;15(7):e0235807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235807>
6. Зотова ИИ, Грицаев СВ, Бессмельцев СС. Первичная иммунная тромбоцитопения. Современный взгляд на патогенез и лечение. *Вестник гематологии*. 2017;13(4):48–64. [Zotova II, Gritsaev SV, Bessmeltsev SS. Primary immune thrombocytopenia. The current understanding of the pathogenesis and treatment. *Vestnik gematologii = The Bulletin of Hematology*. 2017;13(4):48–64 (In Russ.)]
7. Song F, Al-Samkari H. Management of adult patients with immune thrombocytopenia (ITP): a review on current guidance and experience from clinical practice. *J Blood Med*. 2021;12:653–64. <https://doi.org/10.2147/JBM.S259101>
8. Crow AR, Lazarus AH. The mechanisms of action of intravenous immunoglobulin and polyclonal anti-D immunoglobulin in the amelioration of immune thrombocytopenic purpura: what do we really know? *Transfus Med Rev*. 2008;22(2):103–16. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2007.12.001>

¹¹ Кудашева Э.Ю. Совершенствование методических основ стандартизации и медицинского применения иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека: дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2020.

Заключение

По результатам проведенного анализа основных этапов стандартизации препаратов антирезусного иммуноглобулина человека показана необходимость создания фармакопейного СО содержания антирезус Rh₀(D) антител. Это связано с высокой востребованностью препарата для анти-D профилактики резус-конфликта при беременности, снижения перинатальной смертности вследствие развития гемолитической болезни плода и новорожденного. Эффективность терапии определяется специфической активностью иммуноглобулина, то есть содержанием антирезус Rh₀(D) антител. Этим обусловлена важность точной количественной оценки указанного показателя качества, что может быть обеспечено использованием СО, аттестованного в МЕ/мл.

Разработка отечественного СО позволит повысить его доступность для российских фармпроизводителей и обеспечить импортозамещение. В настоящее время специалистами ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России» и ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России ведутся исследования по разработке фармакопейного СО содержания антирезус Rh₀(D) антител.

9. Connan K, Kornman L, Savoia H, Palma-Dias R, Rowlands S. IVIG – is it the answer? Maternal administration of immunoglobulin for severe fetal red blood cell alloimmunisation during pregnancy: a case series. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2009;49:612–8. <https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2010.01195.x>
10. Шведова ЕВ, Кудашева ЭЮ, Климов ВИ. Методы оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D): современное состояние проблемы. *Иммунология.* 2020;41(3):256–61. [Shvedova EV, Kudasheva EYu, Klimov VI. Methods for evaluating the specific activity of preparations of human antirhesus Rho(D): current status of the problem. *Immunologiya = Immunology.* 2020;41(3):256–61 (In Russ.)] <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-256-261>
11. Bangham DR, Kirkwood TBL, Wybrow G, Hughes-Jones NC, Gunson HH. International collaborative study of assay of anti-D (anti-Rh) immunoglobulin. *Br J Haematol.* 1978;38(3):407–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1978.tb01061.x>
12. Климов ВИ, Саканян ЕИ, Волкова РА, Фадейкина ОВ, Мовсесянц АА, Лебединская ЕВ, Шестакова АП. Анализ потребностей в стандартных образцах, предназначенных для оценки качества биологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2017;17(2):87–94. [Klimov VI, Sakanyan EI, Volkova RA, Fadeykina OV, Movsesyants AA, Lebedinskaya EV, Shestakova AP. Analysis of the demand for reference standards used in quality evaluation of biologicals. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2017;17(2):87–94 (In Russ.)]
13. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Волкова РА, Климов ВИ, Шемерянкина ТБ, Яшкир ВА. Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал.* 2016;50(4):40–3. [Merkulov VA, Sakanyan EI, Volkova RA, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkiret VA. Pharmacopoeial reference samples and practice of their use in the national system of standardization of medical products. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2016;50(4):258–61] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2016-50-4-40-43>
14. 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, Olefir YuV, Merkulov VA, et al. Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation of biological products. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2016;16(4):229–36 (In Russ.)]
15. Goldsmith KL, Mourant AE, Bangham DR. International standard for anti-Rh (anti-D) incomplete blood-typing serum. *Bull World Health Organ.* 1967;36(3):435–45.
16. Донсков СИ. *Группы крови системы Rhesus: теория и практика.* М.: ВИНТИ РАН; 2005. [Donskov SI. *Rhesus blood groups: theory and practice.* Moscow: VINITI RAN; 2005 (In Russ.)]
17. Fox B, Sharp G, Atkinson E, Roberts G, Rigsby P, Studholme L. The third international standard for anti-D immunoglobulin: international collaborative study to evaluate candidate preparations. *Vox Sang.* 2019;114:740–8. <https://doi.org/10.1111/vox.12822>
18. Thorpe SJ, Sands D, Fox B, Behr-Gross M-E, Schäffner G, Yu MW. A global standard for anti-D immunoglobulin: international collaborative study to evaluate a candidate preparation. *Vox Sang.* 2003;85:313–21. <https://doi.org/10.1111/j.0042-9007.2003.00367.x>
19. Thorpe SJ, Fox B, Turner C, Scott M. Competitive enzyme-linked immunoassay of monoclonal immunoglobulin G anti-D preparations. *Transfus Med.* 2003;13(3):153–60. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3148.2003.00436.x>
20. Schäffner G, Kayser T, Tönjes A, Volkers P. Validation of flow cytometry to quantify the potency of anti-D immunoglobulin preparations. *Vox Sang.* 2003;84(2):129–36. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2003.00267.x>
21. 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):716–21]
22. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Устинникова ОБ, Саканян ЕИ, Меркулов ВА, Мовсесянц 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. *Farmatsiya = Pharmacy.* 2020;69(2):5–11 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-02-01>
23. Вильданова НС, Кормщикова ЕС, Бутина ЕВ, Попонина ЕА, Йовдий АВ, Шерстнев ФС и др. Разработка алгоритма формирования базы доноров плазмы для производства стандартного образца содержания антирезус Rh₀(D) антител IgG. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2021;24(8):13–20. [Vildanova NS, Kormshchikova ES, Butina EV, Poponina EA, Yovdiy AV, Sherstnev FS, et al. Development of an algorithm for formation of a plasma donor base for producing a standard sample of anti-D antibody. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry.* 2021;24(8):13–20 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-08-02>

Вклад авторов. *Н.С. Вильданова* — дизайн статьи, анализ данных литературы, написание текста рукописи; *Е.С. Кормщикова* — анализ данных литературы, доработка текста рукописи; *Е.Н. Калинина* — анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; *К.А. Воробьев* — критическое обсуждение текста рукописи; *И.В. Парамонов* — утверждение окончательной версии статьи; *Э.Ю. Кудашева* — консультативная помощь в оценке состояния проблемы.

Благодарности. Работа выполнена в рамках НИР ФГБУН КНИИГПК ФМБА России «Разработка стандартного образца содержания антирезус Rh₀(D) антител для определения специфической (антирезусной) активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D)» (номер государственной регистрации АААА-А20-120022090028-2) и 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. *N.S. Vildanova*—elaboration of the study design, analysis of literature data, writing of the text of the manuscript; *E.S. Kormshchikova*—analysis of literature data, finalisation of the text of the manuscript; *E.N. Kalinina*—analysis of literature data, editing of the text of the manuscript; *K.A. Vorobiev*—critical revision of the text of the manuscript; *I.V. Paramonov*—approval of the final version of the manuscript for publication; *E.Yu. Kudasheva*—advisory assistance in the assessment of the state of the field.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of the research project Development of a reference standard for anti-Rh₀(anti-D) antibody content intended for potency (anti-rhesus activity) assays of human anti-D immunoglobulin preparations (state registration number АААА-А20-120022090028-2) supported by the Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion and publicly funded research project No. 056-00001-22-00 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

Вильданова Наталия Сергеевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0791-0571>
vildanova@niigpk.ru

Кормщикова Елена Сергеевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8158-8445>
kormschikova@niigpk.ru

Калинина Елена Николаевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9754-5522>
kalininaen@niigpk.ru

Воробьев Константин Анатольевич, д-р биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4386-5835>
vorobiev@niigpk.ru

Парамонов Игорь Владимирович, д-р мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7205-912X>
paramonov@niigpk.ru

Кудашева Эльвира Юрьевна, д-р мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5838-2481>
kudasheva@expmed.ru

Поступила 26.01.2022

После доработки 11.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Nataliya S. Vildanova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0791-0571>
vildanova@niigpk.ru

Elena S. Kormshchikova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8158-8445>
kormschikova@niigpk.ru

Elena N. Kalinina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9754-5522>
kalininaen@niigpk.ru

Konstantin A. Vorobiev, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4386-5835>
vorobiev@niigpk.ru

Igor V. Paramonov, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7205-912X>
paramonov@niigpk.ru

Elvira Yu. Kudasheva, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5838-2481>
kudasheva@expmed.ru

Received 26 January 2022

Revised 11 August 2022

Accepted 26 August 2022

УДК 615.038: 615.371: 615.375

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-249-265>

Обзорная статья | Review article



Перспективные направления разработки вакцинных препаратов для профилактики шигеллеза

М.В. Абрамцева[✉], Е.О. Неманова, Н.С. Алехина

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

✉ Абрамцева Марина Витальевна; Abramtceva@expmed.ru

Резюме

Шигеллез (бактериальная дизентерия) — острое инфекционное заболевание, вызываемое возбудителями *Shigella* spp. семейства *Enterobacteriaceae*, характеризуется наибольшим показателем смертности населения от бактериальных кишечных инфекций. Значительная доля случаев заболевания приходится на детей в возрасте до 5 лет. В 2017 г. штаммы *Shigella* spp. были включены в опубликованный ВОЗ список устойчивых к действию большинства антибиотиков «приоритетных патогенов», представляющих угрозу мировому здравоохранению, что послужило стимулом к разработке новых противомикробных препаратов для терапии шигеллезов. Наряду с созданием антимикробных средств против *Shigella* spp. важную роль в борьбе с шигеллезами играет комплекс превентивных мер, изложенный в программе иммунизации ВОЗ 2030, в который, помимо санитарии, гигиены и потребления чистой воды, входит вакцинация. Разработка вакцины против шигеллеза остается одним из приоритетных направлений программы ВОЗ уже более 20 лет. Цель работы — анализ перспективных направлений разработки вакцинных препаратов против шигеллеза. Проведенный анализ данных литературы показал, что в настоящее время на мировом рынке зарегистрирована только одна вакцина против шигеллеза — российская вакцина Шигеллвак, полисахаридная дизентерийная вакцина против шигелл Зонне. Рассмотрен ряд вакцинных препаратов (цельноклеточные, полисахаридные конъюгированные и неконъюгированные, препараты на основе белковых антигенов и др.), находящихся на различных этапах клинических испытаний. Отмечено, что важным направлением является создание комбинированных мультивалентных препаратов против инфекций, вызываемых *Shigella* spp. и другими кишечными патогенами. Сделан вывод о том, что наиболее перспективными являются разработки субъединичных вакцин на основе Ipa-белков, обеспечивающих перекрестную защиту против *Shigella* spp., а также конъюгированных поливалентных вакцин, предназначенных для детей в возрасте до 5 лет.

Ключевые слова: шигеллез; вакцины против шигеллеза; полисахаридные вакцины; конъюгированные вакцины

Для цитирования: Абрамцева М.В., Неманова Е.О., Алехина Н.С. Перспективные направления разработки вакцинных препаратов для профилактики шигеллеза. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):249–265. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-249-265>

Promising directions for vaccine development to prevent shigellosis

M.V. Abramtseva✉, E.O. Nemanova, N.S. Alekhina

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

✉ Marina V. Abramtseva; Abramtseva@expmed.ru

Abstract

Shigellosis (bacterial dysentery) is an acute infectious disease caused by *Shigella* spp., members of the *Enterobacteriaceae* family. The disease has the highest mortality rate amongst bacterial enteric infections. A considerable proportion of *Shigella* infections occur in children under the age of five. In 2017, WHO included *Shigella* spp. strains into the list of “priority pathogens” that are resistant to most antibiotics and pose a threat to global public health. This provided a stimulus for the development of new antibiotics to treat shigellosis. Apart from the creation of new antimicrobial therapies for *Shigella* infections, an important role in fighting against shigellosis belongs to the preventative measures set out in WHO’s Immunisation Agenda 2030. These include sanitation, hygiene, consumption of clean water, and vaccination. The development of *Shigella* vaccines has been a priority of the WHO programme for more than 20 years. The aim of the study was to analyse promising approaches to *Shigella* vaccine development. According to the analysis of literature, only one vaccine against shigellosis has been approved so far—Shigellvac, the Russian polysaccharide dysentery vaccine against *Shigella sonnei*. This study covers a number of vaccine candidates (whole-cell, polysaccharide, polysaccharide conjugate, protein antigen-based vaccines, etc.) that are at different stages of clinical trials. The importance of researching combination (multivalent) vaccines against *Shigella* spp. and other enteric pathogens is noted. However, the authors consider subunit vaccines based on Ipa proteins, providing broad cross-protection against *Shigella* spp., and conjugate polyvalent vaccines for children under 5 the most promising for further development.

Key words: shigellosis; *Shigella* vaccines; polysaccharide vaccines; conjugate vaccines

For citation: Abramtseva M.V., Nemanova E.O., Alekhina N.S. Promising directions for vaccine development to prevent shigellosis. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):249–265. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-249-265>

Введение

Шигеллез (бактериальная дизентерия) — высококонтагиозное острое антропонозное заболевание инфекционной этиологии, с фекально-оральным механизмом передачи, характеризующееся поражением кишечника, преимущественно дистального отдела (сигмовидная и прямая кишка).

Бактериальная дизентерия регистрируется во всем мире, но распространена преимущественно в развивающихся странах среди населения с неудовлетворительными санитарно-гигиеническими условиями жизни. Повышение качества жизни населения, в том числе и в вопросах санитарии и гигиены, привело к значительному снижению в последние годы общего количества случаев данного заболевания [1].

В эндемичных регионах шигеллез характеризуется наибольшим показателем смертности среди бактериальных кишечных инфекций: 2,9 на 100 тыс. населения всех возрастов и 10,1 на 100 тыс. детей в возрасте младше 5 лет [2].

Особое беспокойство вызывает способность возбудителя шигеллеза вырабатывать устойчивость к антимикробным препаратам в экстремально короткие сроки (в течение одного десятилетия) [3], что существенно усложняет терапию заболевания. В условиях активного распространения антибиотикорезистентных штаммов одним из наиболее эффективных средств контроля заболеваемости бактериальной дизентерией является разработка и применение вакцинных препаратов для профилактики данного заболевания.

Цель работы — анализ перспективных направлений разработки вакцинных препаратов против шигеллеза.

Характеристика заболевания

Возбудителем шигеллеза являются бактерии рода *Shigella* семейства *Enterobacteriaceae*. Впервые возбудитель бактериальной дизентерии был обнаружен и описан в 1891 г. армейским врачом А.В. Григорьевым. Однако название «шигеллы» дано в честь Kiyoshi Shiga (1871–1951), японского врача и микробиолога, выделившего в 1898 г. чистую культуру бактерий, отнесенных в настоящее время к серогруппе *Shigella dysenteriae*, серовар 1.

В последующие годы были описаны шигеллы других видов. В 1900 г. американским микробиологом S. Flexner выделены дизентерийные бактерии *Shigella flexneri*, в 1915 г. датским бактериологом C. Sonne — бактерии *S. sonnei*. В 1917 г. советским бактериологом М.И. Штуццем и немецким бактериологом K.E.F. Schmitz выделена дизентерийная палочка, впоследствии отнесенная к *S. dysenteriae*, серовар 2, в которую также были включены бактерии, выделенные D. Large и O. Sankaran в 1934 г. и A. Sachs в 1943 г. В 1932 г. J. Boyd описал бактерии, которые сформировали группу *S. boydii*. Все эти исследователи в разное время занимались изучением возбудителя, морфологических свойств, патогенеза, клинической симптоматики, диагностики и лечения шигеллеза.

Шигеллы — короткие неподвижные граммотрицательные палочки с закругленными концами, не образующие спор и капсул. Шигеллы имеют сложную антигенную структуру, которая представлена различными по специфичности О-антигенами: от общих для семейства *Enterobacteriaceae* до типоспецифических [4]. Термостабильный соматический О-антиген является компонентом клеточной стенки бактерий и определяет серологическую специфичность шигелл, которая зависит от химического строения боковых полисахаридных цепей липополисахарида. Современная классификация разделяет шигеллы на 4 вида, которые совпадают с соответствующими серогруппами [5]:

- шигелла дизентерии (*Shigella dysenteriae*), серогруппа А, включает 15 серотипов (1–15);
- шигелла Флекснера (*Shigella flexneri*), серогруппа В, включает 19 серотипов и субсеротипов (1a, 1b, 1d, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4av, 4b, 5a, 5b, 6, X, Y и недавно идентифицированные Xv, Yv, 7a, 7b);
- шигелла Бойда (*Shigella boydii*), серогруппа С, включает 20 серотипов;

– шигелла Зонне (*Shigella sonnei*), серогруппа D, — серологически не дифференцируют, 1 серотип.

Приобретенный после заболевания шигеллезом иммунитет носит краткосрочный характер [6] и является строго серотип-специфическим [7].

Согласно мировой статистике, наиболее часто выявляемыми возбудителями бактериальной дизентерии являются: *S. sonnei*, преобладающий в индустриально развитых регионах, и *S. flexneri*, доминирование которого традиционно отмечается в странах Азии, Африки и Латинской Америки с низким уровнем дохода [8].

В Российской Федерации в период с 2005 по 2017 г. в общей структуре лабораторно подтвержденных случаев шигеллеза выявлены возбудители: *S. flexneri* — 53%, *S. sonnei* — 44%, прочие редко встречаемые возбудители — 3% [9]. По итогам 2018 г. на территории Российской Федерации усилилось преобладание серогруппы *S. flexneri* (63,7%), доля *S. sonnei* составила 30,9% [9].

Вспышки шигеллеза, вызванного токсигенным возбудителем *S. dysenteriae*, серотип 1, ставшего причиной пандемий, в том числе зарегистрированных во второй половине XX столетия в Центральной Америке, Азии и Африке [10], в последние 20 лет носят эпизодический характер с небольшим охватом населения: Западная Африка в 1999–2000 гг., Центральная Африка в 2003–2004 г., Индия в 2002 и 2003 гг. В 2008 г. в Швеции была зарегистрирована вспышка завезенного предположительно из Кении *S. dysenteriae* серотип 2 [3].

Распространение *S. boydii* ограничено пределами Индийского субконтинента и охватывает незначительное количество населения [11].

Общее число случаев заболевания шигеллезом различной этиологии по всему миру по состоянию на 2016 г. превысило 269 млн, из них более 212 тыс. — с летальным исходом. Значительную долю в структуре заболевания занимают случаи возникновения шигеллеза у детей младше 5 лет, число которых превысило 74 млн, около 64 тыс. — со смертельным исходом. В целом в период наблюдения с 1990 по 2016 г. общемировой показатель смертности по причине шигеллеза снизился с 6,45 до 2,87 на 100 тыс. населения [1].

Преобладающее число случаев заболевания по-прежнему регистрируют в эндемичных странах Южной Азии, Африке и Латинской Америки [1], однако вспышки шигеллеза возникают и в индустриально развитых странах [12].

В Российской Федерации за последние 15 лет отмечена четкая тенденция к снижению показателя заболеваемости шигеллезами: с 2005 по 2020 г. заболеваемость снизилась

с 42,8 до 2,0 на 100 тыс. населения¹. Доля детей в заболеваемости шигеллезами по Российской Федерации в 2018 г. составила 56%, при этом, наибольший процент составляет возрастная группа от 3 до 13 лет – 35% [9].

Основой лечебных мероприятий при шигеллезе является комплексный подход, включающий антимикробную терапию. Однако возникновение и широкое распространение антибиотикорезистентных штаммов значительно осложняет этиотропную терапию шигеллезов.

Резистентность *Shigella* spp. к антимикробным препаратам обусловлена различными механизмами, в том числе: низкой проницаемостью клеточных мембран, наличием эффективных эффлюксных насосов, присутствием мутаций в генах, а также сверхэкспрессией ферментов, модифицирующих или инактивирующих антимикробный препарат [13].

Детерминанты устойчивости *Shigella* spp. к антимикробным препаратам локализованы на мобильных генетических элементах: плазидах, транспозонах, интегронах [14], горизонтальный перенос которых между представителями семейства *Enterobacteriaceae* способствует широкому распространению мультирезистентных грамотрицательных бактерий по всему миру [15].

Отмечена устойчивость *Shigella* spp. к β -лактамным антибиотикам, цефалоспорином, фосфомицину, аминогликозидам, тетрациклину, фениколам, полимиксинам, ко-тримоксазолу. Установлена возрастающая резистентность к макролидам, устойчивость к хинолонам и пониженная чувствительность к фторхинолонам [13, 16]. В 2017 г. устойчивые к фторхинолонам возбудители шигеллеза вошли в список Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) антибиотикорезистентных патогенов, представляющих угрозу мировому здравоохранению [17].

Основные направления разработки вакцин против шигеллеза

Согласно Программе иммунизации ВОЗ 2030², наиболее эффективным в борьбе с острыми кишечными инфекциями является сочетание таких превентивных мер, как потребление чистой воды, санитария, гигиена и вакцинация. Разработка вакцины для профилактики шигеллеза,

в свою очередь, уже более 20 лет остается приоритетом первой степени в стратегии ВОЗ³.

По мнению ряда авторов, сложности в разработке вакцинных препаратов против шигеллеза связаны, в первую очередь, с отсутствием подходящих биологических моделей и неполным пониманием механизма подавления *Shigella* spp. врожденного и адаптивного иммунного ответа человека [18, 19].

Естественный иммунитет к штаммам *Shigella* spp. основывается в большей степени на иммунном ответе к О-антигенам [20]. В работах конца XX века была продемонстрирована важность наличия выработанных ранее антител к О-антигену в снижении риска заболевания шигеллезом, вызванного *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a [21]. Исследования последних лет значительно расширили представление о механизмах формирования протективного иммунитета, показав, что на снижение риска инфицирования и уменьшение тяжести протекания заболевания оказывает влияние не только присутствие антител к О-полисахаридам, но и антител к белкам инвазинам (Ipa-белкам) *Shigella* spp. [22].

С. Ferreccio с соавт. выявили, что преобладающими серотипами *Shigella* являются *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 6, и показали, что перенесенный шигеллез впоследствии дает 75% защиту от возникновения заболевания, вызванного теми же серотипами, но не вызывает существенную перекрестную защиту от заболевания, вызванного другими серотипами *Shigella* [23], что определило серотип-специфический характер иммунного ответа к *Shigella* spp. и свидетельствовало о необходимости создания поливалентных вакцин.

На основании 1130 изученных случаев шигеллезов, S. Livio с соавт. [24] подтвердили результаты С. Ferreccio с соавт. [23], касающиеся преобладающих серотипов *Shigella* spp. (*S. sonnei*, *S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 6), дополнив их данными о существенной доле *S. flexneri* 3a в заболеваемости шигеллезами. По мнению авторов, комбинирование этих серотипов позволит создать 4-валентную вакцину, обеспечивающую формирование иммунитета к наиболее распространенным штаммам *Shigella* spp.

Первые контролируемые испытания вакцинных кандидатов против шигеллеза были проведены с участием добровольцев еще в 1960-х гг.

¹ Смелов ПА, Никитина СЮ, Агеева ЛИ, Александрова ГА, Голубев НА, Кириллова ГН, ред. Здравоохранение в России. 2021. Статистический сборник. М.: Росстат; 2021.

² Immunisation Agenda 2030: a global strategy to leave no one behind. <https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/strategies/ia2030>

³ WHO preferred product characteristics for vaccines against Shigella. WHO: Geneva, Switzerland; 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240036741>

В качестве кандидатных вакцин были применены препараты на основе аттенуированных штаммов *S. flexneri* 2a [25].

В настоящее время во многих странах мира ведутся разработки различных типов вакцинных препаратов для профилактики шигеллеза, изучается их безопасность и иммуногенность. На проведение этих работ выделяются значительные денежные средства. Данные проекты финансируются международными организациями и национальными институтами стран Европы и США, такими как Национальный институт аллергических и инфекционных болезней (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID), Национальный институт здоровья (National Institutes of Health, NIH), Министерством здравоохранения и социальных служб США (United States Department of Health and Human Services, HHS), Европейской инициативой по вакцинам (European Vaccine Initiative, EVI), Партнерством по клиническим испытаниям в Европе и развивающихся странах (European and Developing Countries Clinical Trials Partnership, EDCTP), Глобальным альянсом по вакцинам и иммунизации (Global Alliance for Vaccines and Immunisation, GAVI) и др.

Основные направления исследований касаются создания: цельноклеточных (живых аттенуированных [26–31], инактивированных [32]), субъединичных полисахаридных (неконъюгированных [33], конъюгированных [34–37]) и белковых вакцинных кандидатов, в том числе препаратов нового поколения: частицы внешних мембран *Shigella* spp., созданных на основе генетически модифицированных бактерий и состоящие из липополисахаридов, белков и растворимых периплазматических компонентов, полученных с помощью технологии GMMA (Generalised Modules for Membrane Antigens) [38, 39]; мультикомпонентный вакцинный комплекс рекомбинантных IpaB- и IpaC-белков и липополисахаридов *Shigella* spp. [40, 41].

Цельноклеточные вакцины

Значительные результаты достигнуты в области разработки цельноклеточных вакцин (табл. 1), в частности живых аттенуированных вакцин, полученных с применением стратегии удаления участка плазмиды вирулентности, содержащего ген *virG* (*icsA*). Препарат на основе аттенуированного штамма WRSS1 *S. sonnei* в ходе клинических исследований (КИ) показал свою безопасность и иммуногенность.

При введении трех доз препарата в концентрации 3×10^6 КОЕ у 100% взрослых (18–45 лет) и 40% детей (5–9 лет) выявлено увеличение титра специфических IgA антител к *S. sonnei* в 4 и более раз [26, 27], однако у детей 12–24 месяцев препарат не вызвал эффективного иммунного ответа⁴. Вакцинные кандидаты нового поколения, WRSS2 и WRSS3, модифицированные путем удаления генов *virG* (*icsA*), *senA*, *senB* и дополнительно для WRSS3 гена *msbB2*, продемонстрировали высокий профиль безопасности и иммуногенности в I фазе КИ с участием лиц 18–45 лет в дозах 10^5 – 10^6 КОЕ [28].

Неконъюгированные полисахаридные вакцины

Наибольший успех достигнут в направлении создания неконъюгированных полисахаридных препаратов против шигеллеза (табл. 2). В Российской Федерации ООО «Гритвак» разработана и в 2002 г. зарегистрирована полисахаридная дизентерийная вакцина против шигелл Зонне, торговое наименование Шигеллвак (Вакцина дизентерийная против шигелл Зонне полисахаридная). Препарат представляет собой высокоочищенный полисахарид, извлеченный из культуры *S. sonnei*. В качестве консерванта в препарате использован фенол.

Вакцина обеспечивает быстрое образование специфических антител в крови и интенсивное нарастание их титра в течение 2–3 недель, что обеспечивает защиту от инфекции в течение одного года.

Отсутствие выраженных общих и местных поствакцинальных реакций и клинических проявлений эндотоксикоза у участников КИ свидетельствуют о благоприятном профиле безопасности. Иммунизация участников КИ препаратом в дозе 50 мкг показала быструю индукцию устойчивого, специфического иммунного ответа к *S. sonnei*. После вакцинации выявлен высокий уровень сероконверсии антител к О-антигену (4-кратное увеличение титра антител) как у взрослых, так и у детей: IgA – 77 и 92%, IgG – 71 и 73%, IgM – 29 и 48% соответственно. Иммунный ответ после вакцинации препаратом Шигеллвак характеризуется значительно выраженной активацией синтеза антител класса IgA, уровень которых в сыворотке крови возрастает в 28 раз. Оценка профилактической эффективности вакцины Шигеллвак была проведена при массовой иммунизации населения основных возрастных групп в рамках Государственных полевых испытаний

⁴ Safety study of live attenuated oral Shigella (WRSS1) vaccine in Bangladeshi adults and children. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01813071>

Таблица 1. Цельноклеточные кандидатные вакцинные препараты для профилактики шигеллеза

Table 1. Whole-cell vaccine candidates for the prevention of shigellosis

Наименование вакцинного препарата <i>Vaccine name</i>	Разработчик <i>Developer</i>	Действующее вещество <i>Active ingredient</i>	Стадия клинических исследований <i>Clinical trial status</i>	Путь введения. Возраст участников клинических исследований <i>Route of administration. Age of trial participants</i>	Источник <i>Reference</i>
WRSS1	Армейский научно-исследовательский институт имени Уолтера Рида, США <i>Walter Reed Army Institute of Research, USA</i>	Штамм <i>S. sonnei</i> , аттенуированный путем удаления гена <i>virG</i> <i>S. sonnei attenuated by deletion of the virG gene</i>	Завершена I фаза КИ (per. № NCT02934178, NCT01813071) <i>Phase I: completed (ClinicalTrials.gov identifiers NCT02934178, NCT01813071)</i>	Перорально. Взрослые 18–39 лет <i>Oral. Adults (18–39 years)</i>	[26, 27] Сноска ⁵ <i>Footnote⁵</i>
WRSs2	Национальный институт аллергических и инфекционных болезней, США <i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases, USA</i>	Штамм <i>S. sonnei</i> , аттенуированный путем удаления генов <i>virG</i> , <i>senA</i> и <i>senB</i> <i>S. sonnei attenuated by deletion of virG, senA, and senB genes</i>	Завершена I фаза КИ вакцин WRSs2 и WRSs3 (per. № NCT01336699). Проведение II фазы испытаний вакцины WRSs2; июль 2022 – январь 2023 (per. № NCT04242264) <i>Phase I (WRSs2 and WRSs3): completed (ClinicalTrials.gov identifier NCT01336699) Phase II (WRSs2): in progress, July 2022 – January 2023 (ClinicalTrials.gov identifier NCT04242264)</i>	Перорально. Взрослые от 18 до 45 лет <i>Oral. Adults (18–45 years)</i>	[28] Сноска ⁶ <i>Footnote⁶</i>
WRSs3		Штамм <i>S. sonnei</i> , аттенуированный путем удаления генов <i>virG</i> , <i>senA</i> , <i>senB</i> , <i>msbB2</i> <i>S. sonnei attenuated by deletion of virG, senA, senB, msbB2 genes</i>			
SC599	Институт Пастера, Франция <i>Institut Pasteur, France</i>	Штамм <i>S. dysenteriae</i> 1, аттенуированный путем удаления генов <i>icsA</i> , <i>ent</i> , <i>fep</i> и <i>stxA</i> <i>S. dysenteriae 1 attenuated by deletion of icsA, ent, fep, and stxA genes</i>	Завершена II фаза КИ (per. № NCT00210288) <i>Phase II: completed (ClinicalTrials.gov identifier NCT00210288)</i>	Перорально. Взрослые от 18 до 50 лет <i>Oral. Adults (18–50 years)</i>	[29] Сноска ⁷ <i>Footnote⁷</i>
WRSd1	Армейский научно-исследовательский институт имени Уолтера Рида, США <i>Walter Reed Army Institute of Research, USA</i>	<i>S. dysenteriae</i> 1 штамм 1617, аттенуированный путем удаления <i>virG(icsA)</i> , <i>stxAB</i> генов <i>S. dysenteriae 1 strain 1617 attenuated by deletion of virG(icsA) and stxAB genes</i>	Завершена I фаза КИ <i>Phase I: completed</i>	Перорально. Взрослые от 18 до 45 лет <i>Oral. Adults (18–45 years)</i>	[30]

⁵ Shigella WRSS1 vaccine trial in Bangladesh. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02934178>⁶ Safety and immunogenicity of two live, attenuated oral Shigella sonnei vaccines: WRSs2 and WRSs3. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01336699>
Phase 2 Shigella vaccine and challenge. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04242264>⁷ Healthy adult volunteer study for two doses of a Shigella vaccine. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00210288>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Наименование вакцинного препарата <i>Vaccine name</i>	Разработчик <i>Developer</i>	Действующее вещество <i>Active ingredient</i>	Стадия клинических исследований <i>Clinical trial status</i>	Путь введения. Возраст участников клинических исследо- ваний <i>Route of administration. Age of trial participants</i>	Источник <i>Reference</i>
Shigella- ETEC CVD (1208S-122)	Мэрилендский универ- ситет, Балтимор, США <i>University of Maryland, Baltimore, USA</i>	Штамм <i>S. flexneri</i> 2a, аттенуиро- ванный путем удаления генов <i>guaBA</i> , <i>sen</i> , <i>set</i> , экспрессиру- ющий антиген CFA/I и тер- молабильный энтеротоксин ETEC <i>S. flexneri 2a attenuated by deletion of guaBA, sen, and set genes, expressing the CFA/I antigen and the heat-labile ETEC enterotoxin</i>	Проведение I фазы КИ; июнь 2022 — декабрь 2024 (рег. № NCT04634513) <i>Phase I: in progress, June 2022 – December 2024 (ClinicalTrials.gov identifier NCT04634513)</i>	Перорально. Взрослые от 18 до 49 лет <i>Oral. Adults (18–49 years)</i>	Сноска ⁸ <i>Footnote⁸</i>
ShigETEC	Evelique Biotechnologies GmbH, Австрия <i>EveliQure Biotechnologies GmbH, Austria</i>	Штамм <i>S. flexneri</i> 2a, аттену- ированный путем удаления генов <i>rfbF</i> , <i>setBA</i> , <i>ipaBC</i> , экспрес- сирующий тер- молабильный энтеротоксин и термостабиль- ный токсин ETEC <i>S. flexneri 2a, attenuated by deletion of rfbF, setBA, and ipaBC genes, expressing two ETEC enterotoxins (heat-labile and heat-stable toxins)</i>	I фаза КИ (начало — сентябрь 2020). На проведение II фазы КИ заключен государ- ственный контракт (№ 75N93020C00048) с Национальным ин- ститутом аллергиче- ских и инфекционных болезней, США <i>Phase I: in progress, started in September 2020; Phase II to be funded by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (contract #75N93020C00048)</i>	Перорально. Взрослые <i>Oral. Adults</i>	[31] Сноска ⁹ <i>Footnote⁹</i>
Sf2aWC	Программа соответ- ствующих технологий в области здравоохране- ния, США <i>Program for Appropriate Technology in Health, USA</i>	<i>S. flexneri</i> 2a штамм 2457T, инактиви- рованный формалином <i>Formalin- inactivated S. flexneri 2a strain 2457T</i>	Завершена I фаза КИ (рег. № NCT01509846). II фаза испытаний (№ NCT03038243) отменена по причине отсутствия финанси- рования <i>Phase I: completed (ClinicalTrials.gov identifier NCT01509846) Phase II: withdrawn for lack of funding (ClinicalTrials.gov identifier NCT03038243)</i>	Перорально. Взрослые от 18 до 45 лет <i>Oral. Adults (18–45 years)</i>	[32] Сноска ¹⁰ <i>Footnote¹⁰</i>

⁸ Shigella CVD 31000: study of responses with Shigella-ETEC vaccine strain CVD 1208S-122. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04634513>

⁹ ShigETECvax. <https://www.euvaccine.eu/diarrheal-diseases/ShigETECvax>

¹⁰ Safety study of inactivated Shigella whole-cell vaccine in adults. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01509846>
Safety, immunogenicity and efficacy study of inactivated whole-cell Shigella flexneri 2a vaccine with and without dmLT in adults. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03038243>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Наименование вакцинного препарата <i>Vaccine name</i>	Разработчик <i>Developer</i>	Действующее вещество <i>Active ingredient</i>	Стадия клинических исследований <i>Clinical trial status</i>	Путь введения. Возраст участников клинических исследований <i>Route of administration. Age of trial participants</i>	Источник <i>Reference</i>
ShigOraVax	Центр исследований инфекционных заболеваний в Замбии, Замбия; Европейская инициатива по вакцинации, Германия; Группа исследований и действий в области здравоохранения, Буркина-Фасо; Лаборатории Хиллемана, Индия; Медицинский центр Лейденского университета, Бельгия; Гетеборгский университет, Швеция <i>Centre for Infectious Disease Research in Zambia, Zambia; European Vaccine Initiative, Germany; Groupe de Recherche Action en Santé, Burkina Faso; Hilleman Laboratories, India; Leiden University Medical Centre, Belgium; University of Gothenburg, Sweden</i>	Инактивированные штаммы <i>S. flexneri</i> (2a, 3a, 6), <i>S. sonnei</i> <i>Inactivated S. flexneri (strains 2a, 3a, 6) and S. sonnei</i>	Завершение I/II фаз КИ (сентябрь 2024), в рамках программы Партнерства по клиническим испытаниям в Европе и развивающихся странах по гранту ЕС № RIA2018V-2308 (per. № NCT04312906) <i>Phase I/II: in progress, due in September 2024, part of the European & Developing Countries Clinical Trials Partnership programme supported by the European Union under grant agreement RIA2018V-2308 (ClinicalTrials.gov identifier NCT04312906)</i>	Перорально. Дети до 5 лет <i>Oral. Children (under 5 years)</i>	Сноска ¹¹ <i>Footnote¹¹</i>

Примечание. КИ — клинические исследования, ЕТЕС — энтеротоксигенные *E. coli*.Note. ETEC—enterotoxigenic *E. coli*.

в эндемичном по дизентерии Зонне регионе. Испытания показали, что уровень заболеваемости шигеллезом в группе лиц, вакцинированных препаратом Шигеллвак, существенно ниже данного показателя в когорте плацебо — 0,55 против 7,89 случаев на 1000 человек. По результатам испытаний коэффициент эффективности препарата Шигеллвак и индекс эффективности составили 92,4 и 14,3% соответственно¹².

Проведение иммунизации вакциной Шигеллвак рекомендуется для лиц, относящихся к группам риска¹³. Профилактические прививки против шигеллеза в Российской Федерации включены в национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям¹⁴.

Ввиду того, что значительная доля заболеваемости шигеллезом вызвана *S. flexneri*, актуальным направлением является разработка вакцины против дизентерии Флекснера.

Успешно прошел III фазу КИ отечественный вакцинный препарат для профилактики дизентерии Флекснера ФЛЕКСВАК® (ООО «Гритвак», Российская Федерация), представляющий собой водный раствор модифицированных липополисахаридов, извлеченных из вирулентной культуры *S. flexneri*. Модификация липополисахаридов заключается в химической детоксикации, позволившей резко снизить токсичность и пирогенность, но не затронувшей О-специфический полисахарид, отвечающий за антиген-

¹¹ The ShigOraVax project. <https://www.shigoravax.org/>
<https://www.euvaccine.eu/diarrheal-diseases/ShigOraVax>
A baseline study in support of clinical evaluation of an oral Shigella vaccine development in Africa. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04312906>

¹² Зверев ВВ, Хаитов РМ, ред. Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. Краткое издание. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014.

¹³ Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Шигеллвак (вакцина дизентерийная против шигелл Зонне полисахаридная); PN002660/01-201119.

¹⁴ Приказ Минздрава России от 06.12.2021 № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок».

ные свойства [42]. В ходе исследований, проведенных на группе добровольцев от 18 до 60 лет, при однократном введении вакцины в дозировке 125 мкг/0,5 мл препарат показал безопасность, высокую иммуногенность и низкую реактогенность¹⁵.

Конъюгированные полисахаридные вакцины

Поскольку около 30% случаев шигеллеза различной этиологии приходится на детей в возрасте до 5 лет [2], разработка вакцин для этой возрастной категории является одной из первоочередных задач. Перспективными в данном отношении могут стать конъюгированные вакцинные препараты (табл. 3).

По данным K.L. Kotloff с соавт. [3], впервые концепция применения полисахаридных вак-

цин, конъюгированных с белковыми носителями, для иммунизации младенцев и детей в возрасте от 2 до 5 лет против инфекций, вызываемых *Shigella* spp. и другими кишечными патогенами, была озвучена J.B. Robbins и R. Schneerson, что привлекло значительный интерес ученых к данному направлению исследований и положило начало этапу разработки конъюгированных вакцинных препаратов против шигеллеза. КИ конъюгированного препарата, полученного путем связывания О-антигена *S. sonnei* с рекомбинантным экзопротеином А *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), показали высокую эффективность у взрослых в возрасте 18–22 года (74%) [43] и детей 3–4 лет (71%) [44], однако среди детей 2–3 лет была продемонстрирована низкая эффективность (36%), при полном ее отсутствии у детей в возрасте 1–2 года [44].

Таблица 2. Неконъюгированные полисахаридные вакцины и вакцинные кандидаты для профилактики шигеллеза
Table 2. Unconjugated polysaccharide vaccines and vaccine candidates for the prevention of shigellosis

Наименование вакцинного препарата <i>Vaccine name</i>	Разработчик <i>Developer</i>	Действующее вещество <i>Active ingredient</i>	Стадия клинических испытаний <i>Clinical trial status</i>	Путь введения. Возраст участников клинических исследований <i>Route of administration. Age of trial participants</i>	Источник <i>Reference</i>
Шигеллвак® <i>Shigellvac®</i>	ООО «Гритвак», Российская Федерация <i>Gritvac OOO, Russia</i>	Низкотоксичный полисахарид <i>S. sonnei</i> , очищенный ферментативными и физико-химическими методами <i>Low-toxicity polysaccharide of S. sonnei, purified by enzymatic and physicochemical methods</i>	Препарат зарегистрирован <i>The vaccine is licensed</i>	Внутримышечно, подкожно. Дети от 3 лет, взрослые <i>Intramuscular, subcutaneous. Children (aged 3 and older), adults</i>	Сноска ¹⁶ <i>Footnote¹⁶</i>
ФЛЕКСВАК® <i>FLEXVAC®</i>	ООО «Гритвак», Российская Федерация <i>Gritvac OOO, Russia</i>	Модифицированные липополисахариды <i>S. flexneri</i> серотипы 2a, 3a, 1b, Y, 6, очищенные ферментативными и физико-химическими методами <i>Modified lipopolysaccharides of S. flexneri serotypes 2a, 3a, 1b, Y, 6, purified by enzymatic and physicochemical methods</i>	Завершена III фаза КИ (Протокол ФКК-III-07/18) <i>Phase III: completed (Protocol FKK-III-07/18)</i>	Подкожно. Взрослые от 18 до 60 лет <i>Subcutaneous. Adults (18–60 years)</i>	[33] Сноска ¹⁷ <i>Footnote¹⁷</i>

Примечание. КИ — клинические исследования.

¹⁵ Протокол ФКК-III-07/18. Открытое несравнительное исследование безопасности и иммуногенности вакцины ФЛЕКСВАК® на добровольцах в возрасте 18–60 лет. 04.04.2019–01.12.2020. Реестр Клинических исследований. <https://clinical.ru/reestr-klinicheskikh-issledovanij/161-04.04.2019.html>

¹⁶ Зверев ВВ, Хаитов РМ, ред. Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. Краткое издание. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Шигеллвак (вакцина дизентерийная против шигелл Зонне полисахаридная); PN002660/01-201119.

¹⁷ Протокол ФКК-III-07/18. Открытое несравнительное исследование безопасности и иммуногенности вакцины ФЛЕКСВАК® на добровольцах в возрасте 18–60 лет. 04.04.2019–01.12.2020. Реестр Клинических исследований. <https://clinical.ru/reestr-klinicheskikh-issledovanij/161-04.04.2019.html>

В сентябре 2019 г. начались КИ (I/II фаза) четырехвалентной конъюгированной вакцины *Shigella*4V с участием лиц в возрасте от 9 мес. до 50 лет¹⁸. Проведение исследований включает два этапа: 1-й этап — оценка безопасности и реактогенности вакцины при иммунизации в первую очередь взрослых, а затем детей и младенцев; 2-й этап — оценка иммуногенности вакцины при иммунизации младенцев в возрасте 9 мес. и определение оптимальной иммунизирующей дозы. Препарат проходит испытания в двух формах: с применением адъюванта и без применения адъюванта. Двухвалентная конъюгированная вакцина ZF0901¹⁹ (Beijing Zhifei Luzhu Biopharmaceutical Co., Ltd, Китай), полученная на основе О-специфических полисахаридов *S. sonnei* и *S. flexneri* 2a, конъюгированных со столбнячным анатоксином, успешно прошла II фазу КИ, продемонстрировав высокую иммуногенность при вакцинации детей в возрасте от 3 мес. до 5 лет при отсутствии серьезных нежелательных явлений [34].

Испытания полисахаридных вакцин против шигеллеза, полученных с применением технологии биоконъюгации, продемонстрировали иммуногенные и протективные свойства данного типа препаратов [35]. В КИ фазы II, проведенных компанией LimmaTech Biologics AG (Швейцария) с участием лиц в возрасте 18–45 лет, показано, что эффективность защиты кандидатной биоконъюгированной вакцины Flexyn2a против тяжелого протекания заболевания составила 72,4% [36]. В КИ (фаза I) другой кандидатной биоконъюгированной вакцины, GVXN SD133 (GlycoVaxun AG, Швейцария), выявлен удовлетворительный профиль безопасности препарата. Установлено, что введение кандидатной вакцины в двух концентрациях (2 мкг и 10 мкг О-полисахарида *Shigella dysenteriae* 1, конъюгированного rEPA) приводит к индукции гуморального иммунного ответа в обеих группах вакцинированных. Статистически значимой разницы между средними геометрическими значениями титров антител классов IgG и IgA двух групп вакцинированных не установлено [37].

Таблица 3. Полисахаридные конъюгированные вакцинные кандидаты для профилактики шигеллеза

Table 3. Polysaccharide conjugate vaccine candidates for the prevention of shigellosis

Наименование вакцинного препарата <i>Vaccine name</i>	Разработчик <i>Developer</i>	Действующее вещество <i>Active ingredient</i>	Стадия клинических испытаний <i>Clinical trial status</i>	Путь введения. Возраст участников клинических исследований <i>Route of administration. Age of trial participants</i>	Источник <i>Reference</i>
<i>Shigella sonnei</i> -rEPA	Национальный институт детского здоровья и развития человека, США <i>Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, USA</i>	О-специфический полисахарид <i>S. sonnei</i> , ковалентно связанный с rEPA <i>S. sonnei O-specific polysaccharide covalently bound to rEPA</i>	Завершена III фаза КИ (per. № NCT00368316) <i>Phase III: completed (ClinicalTrials.gov identifier NCT00368316)</i>	Внутримышечно. Дети от 1 до 4 лет <i>Intramuscular. Children (1–4 years)</i>	[43, 44] Сноска ²⁰ <i>Footnote²⁰</i>
<i>Shigella flexneri</i> 2a-rEPA	Национальный институт детского здоровья и развития человека, США <i>Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, USA</i>	О-специфический полисахарид <i>S. flexneri</i> 2a, ковалентно связанный с rEPA <i>S. flexneri 2a O-specific polysaccharide covalently bound to rEPA</i>	Завершена III фаза КИ (per. № NCT00368316) <i>Phase III: completed (ClinicalTrials.gov identifier NCT00368316)</i>	Внутримышечно. Дети от 1 до 4 лет <i>Intramuscular. Children (1–4 years)</i>	[44] Сноска ²¹ <i>Footnote²¹</i>

¹⁸ Immunogenicity and safety of *S. flexneri* 2a-*S. sonnei* bivalent conjugate vaccine in volunteers aged from 3 months to 5 years old. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04865497>

¹⁹ Там же.

²⁰ Safety, immunogenicity, and efficacy of *Shigella* conjugate vaccines in 1–4 year olds in Israel. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00368316>

²¹ Там же.

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Наименование вакцинного препарата <i>Vaccine name</i>	Разработчик <i>Developer</i>	Действующее вещество <i>Active ingredient</i>	Стадия клиниче- ских испытаний <i>Clinical trial status</i>	Путь введения. Возраст участни- ков клинических исследований <i>Route of administration. Age of trial participants</i>	Источник <i>Reference</i>
1790GAHB (GSK3536852A)	GlaxoSmithKline, Великобритания <i>GlaxoSmithKline, UK</i>	<i>S. sonnei</i> 1790-GMMA комплекс: О-антиген / везикулы наружных мембран <i>S. sonnei</i> 1790-GMMA complex: O-antigen and outer membrane vesicles	Завершены I (№ NCT02017899, NCT02034500, NCT03089879) и II фазы КИ (per. № NCT02676895, NCT03527173) <i>Phase I: completed (ClinicalTrials.gov identifiers NCT02017899, NCT02034500, NCT03089879) Phase II: completed (ClinicalTrials.gov identifiers NCT02676895, NCT03527173)</i>	Внутримышечно. Взрослые от 18 до 45 лет <i>Intramuscular. Adults (18–45 years)</i>	[38] Сноска ²² <i>Footnote²²</i>
SF2a-TT15	Мэрилендский университет, Балтимор, США <i>University of Maryland, Baltimore, USA</i>	Синтетический пен- тадекасахарид, ими- тирующий О-антиген <i>S. flexneri</i> 2a, конъюги- рованный со столбняч- ным анатоксином <i>Synthetic pentadecasaccharide, imitating O-antigen of S. flexneri 2a, conjugated to tetanus toxoid</i>	Заверше- на I фаза КИ (№ NCT02797236). Завершение IIa фазы КИ – сен- тябрь 2022 (per. № NCT04602975) и IIb (per. № NCT04078022) фаз сентябрь 2022 г. <i>Phase I: completed (ClinicalTrials.gov identifier NCT02797236) Phase IIa: in progress, due in September 2022 (ClinicalTrials.gov identifier NCT04602975), Phase IIb: in progress, due in February 2021 (ClinicalTrials.gov identifier NCT04078022)</i>	Внутримышечно. IIa фаза – взрос- лые (18–50 лет), дети (2–5 лет), младенцы (9 мес.). IIb фаза – взрос- лые от 18 до 45 лет <i>Intramuscular. Phase IIa: adults (18–50 years), children (2–5 years), infants (9 months). Phase IIb: adults (18–45 years)</i>	[45] Сноска ²³ <i>Footnote²³</i>

²² A phase 1, dose-escalation study to evaluate a new *Shigella sonnei* vaccine in healthy adults. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02017899>
Evaluate a new *Shigella sonnei* vaccine administered either by intradermal, intranasal, or intramuscular route in healthy adults. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02034500>
A study to evaluate safety and immunogenicity of 1 booster dose of 1790GAHB vaccine in healthy adults primed with 3 doses of 1790GAHB vaccine in study H03_01TP compared to 1 vaccination of 1790GAHB in either subjects who received placebo in the same study or naive subjects not part of H03_01TP study. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03089879>
A study of the safety and immune response of 2 doses of a new *Shigella* vaccine in Kenyan adults. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02676895>
A study to evaluate the efficacy, safety, and immunogenicity of a vaccine designed to protect against infection with *Shigella sonnei* in healthy adults. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03527173>

²³ SF2a-TT15 conjugate vaccine in healthy adult volunteers. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02797236>
A study to investigate the safety and immunogenicity of the SF2a-TT15 synthetic carbohydrate-based conjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a (GlycoShig3). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04602975>
Shigella CVD 30000: study of responses to vaccination with *Shigella* vaccine. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04078022>

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Наименование вакцинного препарата <i>Vaccine name</i>	Разработчик <i>Developer</i>	Действующее вещество <i>Active ingredient</i>	Стадия клиниче- ских испытаний <i>Clinical trial status</i>	Путь введения. Возраст участни- ков клинических исследований <i>Route of administration. Age of trial participants</i>	Источник <i>Reference</i>
Flexyn2a (биоconъюгат) <i>Flexyn2a (bioconjugate)</i>	LimmaTech Biologics AG, Швейцария <i>LimmaTech Biologics AG, Switzerland</i>	О-полисахарид <i>S. flexneri</i> 2a, получен- ный путем экспрессии в <i>E. coli</i> , конъюгиро- ванный с rEPA <i>O-polysaccharide of S. flexneri 2a, expressed in E. coli and conjugated to rEPA</i>	Завершены I и II фазы КИ (рег. № NCT02388009, NCT02646371) <i>Phases I and II: completed (ClinicalTrials.gov identifiers NCT02388009, NCT02646371)</i>	Внутримышечно. Взрослые от 18 до 50 лет <i>Intramuscular. Adults (18–50 years)</i>	[36] Сноска ²⁴ <i>Footnote²⁴</i>
GVXN SD133 (биоconъюгат) <i>GVXN SD133 (bioconjugate)</i>	GlycoVaxyn AG, Швейцария <i>GlycoVaxyn AG, Switzerland</i>	О-полисахарид <i>S. dysenteriae</i> 1, получен- ный путем экспрессии в <i>E. coli</i> , конъюгиро- ванный с rEPA <i>O-polysaccharide of S. dysenteriae 1, expressed in E. coli and conjugated to rEPA</i>	Завершена I фаза КИ (рег. № NCT01069471) <i>Phase I: completed (ClinicalTrials.gov identifier NCT01069471)</i>	Внутримышечно. Взрослые от 18 до 50 лет <i>Intramuscular. Adults (18–50 years)</i>	[37] Сноска ²⁵ <i>Footnote²⁵</i>
ZF0901	Beijing Zhifei Luzhu Biopharmaceutical Co., Ltd, Китай <i>Beijing Zhifei Luzhu Biopharmaceutical Co., Ltd, China</i>	Очищенные О-специ- фичные полисахариды <i>S. sonnei</i> и <i>S. flexneri</i> 2a, конъюгирован- ные со столбнячным анатоксином <i>O-specific polysaccharides of S. flexneri 2a and S. sonnei, purified and conjugated to tetanus toxoid</i>	Завершена II фаза КИ (рег. № NCT04865497) <i>Phase II: completed (ClinicalTrials.gov identifier NCT04865497)</i>	Внутримышечно. Дети от 3 месяцев до 5 лет. <i>Intramuscular. Infants (3–24 months), children (2–5 years)</i>	[34] Сноска ²⁶ <i>Footnote²⁶</i>
Shigella4V	LimmaTech Biologics AG, Швейцария <i>LimmaTech Biologics AG, Switzerland</i>	О-полисахариды <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> 2a, <i>S. flexneri</i> 3a, <i>S. flexneri</i> 6, конъюгированные с rEPA <i>O-polysaccharides of S. sonnei, S. flexneri 2a, S. flexneri 3a, and S. flexneri 6, conjugated to rEPA</i>	Завершение I/II фаз КИ июль 2022 г. (рег. № NCT04056117) <i>Phase I/II: in progress, due in July 2022 (ClinicalTrials.gov identifier NCT04056117)</i>	Внутримышечно. Младенцы 9±1 мес., дети от 2 до 5 лет, взрослые от 18 до 50 лет <i>Intramuscular. Infants (9±1 months), children (2–5 years), and adults (18–50 years)</i>	Сноска ²⁷ <i>Footnote²⁷</i>

Примечание. КИ — клинические исследования, rEPA — рекомбинантный экзопротеин А *P. aeruginosa*.Note. rEPA—recombinant exoproduct A of *P. aeruginosa*.²⁴ Safety and tolerability of a bioconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02388009>
Phase 2b challenge study with the bioconjugate vaccine Flexyn2a. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02646371>²⁵ Safety and reactogenicity of bioconjugate vaccine to prevent Shigella. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01069471>²⁶ Immunogenicity and safety of *S. flexneri* 2a–*S. sonnei* bivalent conjugate vaccine in volunteers aged from 3 months to 5 years old. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04865497>²⁷ A study to determine if a new Shigella vaccine is safe, induces immunity and the best dose among Kenyan infants. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04056117>

Таблица 4. Вакцинные кандидаты для профилактики шигеллеза на основе белковых антигенов
Table 4. Protein antigen-based vaccine candidates for the prevention of shigellosis

Наименование вакцинного препарата <i>Vaccine name</i>	Разработчик <i>Developer</i>	Действующее вещество <i>Active ingredient</i>	Стадия клинических испытаний <i>Clinical trial status</i>	Путь введения. Возраст участников клинических исследований. <i>Route of administration. Age of trial participants.</i>	Источник <i>Reference</i>
Invaplex 50	Командование медицинских исследований и разработок армии США, США <i>U.S. Army Medical Research and Development Command, USA</i>	Макромолекулярный комплекс О-полисахарида <i>S. flexneri</i> 2a штамм 2457T и белков IpaB, IpaC и IpaD <i>A macromolecular complex containing O-polysaccharide of S. flexneri 2a strain 2457T with IpaB, IpaC, and IpaD proteins</i>	Завершена II стадия КИ (рег. № NCT00485134) <i>Phase II: completed (ClinicalTrials.gov identifier NCT00485134)</i>	Интраназально. Взрослые от 18 до 45 лет <i>Intranasal. Adults (18–45 years)</i>	[40] Сноска ²⁸ <i>Footnote²⁸</i>
InvaplexAR	Командование медицинских исследований и разработок армии США, США <i>U.S. Army Medical Research and Development Command, USA</i>	Макромолекулярный комплекс О-полисахарида <i>S. flexneri</i> 2a штамм 2457T и белков IpaB, IpaC <i>A macromolecular complex containing O-polysaccharide of S. flexneri 2a strain 2457T with IpaB and IpaC proteins</i>	Завершена I стадия КИ (рег. № NCT02445963) <i>Phase I: completed (ClinicalTrials.gov identifier NCT02445963)</i>	Интраназально. Взрослые от 18 до 45 лет <i>Intranasal. Adults (18–45 years)</i>	Сноска ²⁹ <i>Footnote²⁹</i>
InvaplexAR-DETOX	Программа соответствующих технологий в области здравоохранения, США <i>Program for Appropriate Technology in Health, USA</i>	Макромолекулярный комплекс деацетилированного О-полисахарида, генетически аттенуированного путем удаления гена <i>msbB</i> мутантного штамма <i>S. flexneri</i> 2a и белков IpaB, IpaC <i>A macromolecular complex containing under-acylated O-polysaccharide of S. flexneri 2a mutant strain, genetically attenuated by deletion of msbB, with IpaB and IpaC proteins</i>	Завершена I стадия КИ (рег. № NCT03869333) <i>Phase I: completed (ClinicalTrials.gov identifier NCT03869333)</i>	Внутримышечно. Взрослые от 18 до 50 лет <i>Intramuscular. Adults (18–50 years)</i>	Сноска ³⁰ <i>Footnote³⁰</i>

Примечание. КИ — клинические исследования.

Вакцинные кандидаты на основе белковых антигенов и комбинированные вакцинные препараты

Одним из перспективных направлений в области разработки вакцинных препаратов, обеспечивающих перекрестную защиту против *Shigella* spp., является создание субъединичных вакцин на основе Ipa-белков или комплекса липополисахаридов *Shigella* spp. и Ipa-белков (табл. 4) [40,

41, 46]. Препарат InvaplexAR-DETOX (PATH, США) на основе О-полисахарида *S. flexneri* 2a и белков IpaB и IpaC в фазе I КИ продемонстрировал высокую иммуногенность и безопасность, отмечена индукция выраженных антительных ответов к трем основным компонентам вакцинного кандидата (О-полисахарид, IpaB и IpaC белки)³¹.

Активно развивается направление поиска новых, наиболее иммуногенных вакцинных

²⁸ *Shigella flexneri* 2a Invaplex 50 vaccine dose finding and assessment of protection. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00485134>

²⁹ Immunogenicity and safety of *S. flexneri* 2a–*S. sonnei* bivalent conjugate vaccine in volunteers aged from 3 months to 5 years old. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04865497>

³⁰ A study to determine if a new *Shigella* vaccine is safe, induces immunity and the best dose among Kenyan infants. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04056117>

³¹ Dose escalating study of intramuscular Invaplex[AR-DETOX]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03869333>

кандидатов на основе белков наружных мембран *Shigella* spp. [39], в том числе с помощью технологий обратной вакцинологии (reverse vaccinology) [47].

Важным направлением является разработка комбинированных вакцин для профилактики шигеллеза и других бактериальных кишечных инфекций. Исследования в области разработки живых аттенуированных вакцин против инфекций, вызываемых *Shigella* spp. и энтеротоксигенными штаммами *E. coli* (ETEC), достигли I–II фаз КИ³² [31]. Живая аттенуированная вакцина против инфекций, вызываемых *S. sonnei* и *Salmonella typhi*, и конъюгированная вакцина против инфекций, вызываемых *Shigella* spp., ETEC, *Campylobacter jejuni*, находятся на этапе доклинических испытаний [48].

Наряду с аспектами безопасности и иммуногенности вакцинных кандидатов, существенную роль в процессе разработки новых препаратов играет фармако-экономическая эффективность их применения. Анализ потенциальной социально-экономической эффективности вакцинации против шигеллеза в 79 странах с высокой эпидемиологической нагрузкой (страны со средним и низким уровнем дохода), произведенный на основании модели, включающей данные по иммунизации детей в возрасте до 5 лет (с эффективностью 60%) и охватывающей период времени в течение 10 лет после ее проведения, показал, что вакцинация может предотвратить более 52% детских смертей, вызванных шигеллезом [49].

Заключение

На фоне непрерывно возрастающей устойчивости *Shigella* spp. к антимикробным препаратам наиболее эффективным способом сдерживания распространения шигеллеза является иммунизация населения. Однако вакцинопрофилактика этой инфекции не носит повсеместный характер. Невзирая на существенные финансовые потоки и усилия значительного количества научных кол-

лективов, направленные на разработку вакцинных препаратов для профилактики шигеллеза, в настоящее время на мировом рынке зарегистрирована только одна вакцина против шигеллеза (производства Российской Федерации).

Анализ перспективных направлений разработки данных препаратов показал, что:

- в настоящее время существует несколько направлений исследований в области создания вакцин против шигеллеза; значительное количество вакцинных кандидатов достигло различных стадий клинических испытаний, показав свою безопасность и высокую иммуногенность, однако на данном этапе преждевременно делать вывод о том, какие типы вакцин наиболее эффективны и безопасны;
- использование полисахаридных антигенов в качестве вакцинных препаратов против шигеллеза приводит к формированию эффективного иммунного ответа, что подтверждено внедрением в практику здравоохранения отечественной шигеллезной полисахаридной вакцины;
- перспективным направлением в создании вакцин против шигеллеза для иммунизации младенцев и детей в возрасте от 2 до 5 лет является разработка полисахаридных вакцин, конъюгированных с белковыми носителями;
- продолжаются исследования в области разработки субъединичных вакцин на основе Ipa-белков и белков наружных мембран *Shigella* spp.; отсутствие серологической специфичности данных белков, позволяет препаратам на основе этих антигенов претендовать на лидирующие позиции в ряду вакцинных кандидатов;
- приоритетным направлением развития вакцинопрофилактики острых кишечных инфекций является разработка комбинированных вакцин, позволяющих увеличить охват населения иммунизацией и эффективно контролировать заболеваемость в эндемичных регионах.

Литература/References

1. Khalil IA, Troeger C, Blacker BF, Rao PC, Brown A, Atherly DE, et al. Morbidity and mortality due to *Shigella* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990–2016. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(11):1229–40. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30475-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30475-4)
2. Troeger C, Blacker BF, Khalil I, Rao PC, Cao S, Zimsen SRM, et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(11):1211–28. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1)
3. Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. Shigellosis. *Lancet.* 2018;391(10122):801–12. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33296-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33296-8)
4. Liu B, Knirel YA, Feng L, Perepelov AV, Senchenko SN, Wang Q, et al. Structure and genetics of *Shigella* O antigens. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(4):627–53. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00114.x>

³² *Shigella* CVD 31000: study of responses with *Shigella*-ETEC vaccine strain CVD 1208S-122. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04634513>

5. Wu Y, Lau HK, Lee T, Lau DK, Payne J. *In silico* serotyping based on whole-genome sequencing improves the accuracy of *Shigella* identification. *Appl Environ Microbiol*. 2019;85(7):e00165-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00165-19>
6. Mattock E, Blocker AJ. How do the virulence factors of *Shigella* work together to cause disease? *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:64. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00064>
7. Barry EM, Pasetti MF, Sztein MB, Fasano A, Kotloff KL, Levine MM. Progress and pitfalls in *Shigella* vaccine research. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(4):245–55. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.12>
8. Shad AA, Shad WA. *Shigella sonnei*: virulence and antibiotic resistance. *Arch Microbiol*. 2021;203:45–58. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02034-3>
9. Черепанова ЕА, Симонова ЕГ, Раичич РР, Линок АВ, Филатов НН. Оценка эпидемиологического риска в системе надзора за актуальными для Российской Федерации острыми кишечными инфекциями. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО*. 2018;(3):23–8. [Cherepanova EA, Simonova EG, Raichich RR, Linok AV, Filatov NN. Assessment of epidemiological risk in the system of surveillance for acute intestinal infections relevant to the Russian Federation. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2018;(3):23–8 (In Russ.)]
10. Njamkepo E, Fawal N, Tran-Dien A, Hawkey J, Strockbine N, Jenkins C, et al. Global phylogeography and evolutionary history of *Shigella dysenteriae* type 1. *Nat Microbiol*. 2016;1:16027. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.27>
11. Baker S, The HC. Recent insights into *Shigella*: a major contributor to the global diarrhoeal disease burden. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31(5):449–54. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000475>
12. Kozyreva VK, Jospin G, Greninger AL, Watt JP, Eisen JA, Chaturvedi V. Recent outbreaks of shigellosis in California caused by two distinct populations of *Shigella sonnei* with either increased virulence or fluoroquinolone resistance. *mSphere*. 2016;1(6):e00344–16. <https://doi.org/10.1128/msphere.00344-16>
13. Ranjbar R, Farahani A. *Shigella*: antibiotic-resistance mechanisms and new horizons for treatment. *Infect Drug Resist*. 2019;12:3137–67. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219755>
14. Soltan Dallal MM, Omid S, Douraghi M, Haghi Ashiani MT, Sharifi Yazdi MK, Okazi A. Molecular analysis of integrons and antimicrobial resistance profile in *Shigella* spp. isolated from acute pediatric diarrhea patients. *GMS Hyg Infect Control*. 2018;13:Doc02. <https://dx.doi.org/10.3205/dgkh000308>
15. Thompson CN, Duy PT, Baker S. The rising dominance of *Shigella sonnei*: an intercontinental shift in the etiology of bacillary dysentery. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):e0003708. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003708>
16. Chung The H, Bodhidatta L, Pham DT, et al. Evolutionary histories and antimicrobial resistance in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* in Southeast Asia. *Commun Biol*. 2021;4:353. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01905-9>
17. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318–27. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
18. Brunner K, Samassa F, Sansonetti PJ, Phalipon A. *Shigella*-mediated immunosuppression in the human gut: subversion extends from innate to adaptive immune responses. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(6):1317–25. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1594132>
19. Cohen D, Muhsen K. Vaccines for enteric diseases. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(6):1205–14. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1611200>
20. Levine MM, Kotloff KL, Barry EM, Pasetti MF, Sztein MB. Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(7):540–53. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1662>
21. Cohen D, Green MS, Block C, Slepon R, Ofek I. Prospective study of the association between serum antibodies to lipopolysaccharide O antigen and the attack rate of shigellosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29(2):386–9. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.2.386-389.1991>
22. Clarkson KA, Frenck RW, Jr, Dickey M, Suvarnapunya AE, Chandrasekaran L, Weerts HP, et al. Immune response characterization after controlled infection with lyophilized *Shigella sonnei* 53G. *mSphere*. 2020;5(5):e00988-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00988-19>
23. Ferreccio C, Prado V, Ojeda A, Cayyazo M, Abrego P, Guers L, Levine MM. Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infections in a poor periurban setting in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol*. 1991;134(6):614–27. <https://doi.org/10.1093/oxford-journals.aje.a116134>
24. Livio S, Strockbine NA, Panchalingam S, Tennant SM, Barry EM, Marohn ME, et al. *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. *Clin Infect Dis*. 2014;59(7):933–41. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu468>
25. DuPont HL, Hornick RB, Snyder MJ, Libonati JP, Formal SB, Gangarosa EJ. Immunity in shigellosis. II. Protection induced by oral live vaccine or primary infection. *J Infect Dis*. 1972;125(1):12–6. <https://doi.org/10.1093/infdis/125.1.12>
26. Sarker P, Mily A, Ara A, Haque F, Maier N, Wierzb TF, et al. Functional antibodies and innate immune responses to WRSS1, a live oral *Shigella sonnei* vaccine candidate, in Bangladeshi adults and children. *J Infect Dis*. 2021;224(12 Suppl 2):S829–39. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab395>
27. Raqib R, Sarker P, Zaman K, Alam NH, Wierzb TF, Maier N, et al. A phase I trial of WRSS1, a *Shigella sonnei* live oral vaccine in Bangladeshi adults and children. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(6):1326–37. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1575165>
28. Venkatesan MM, Ballou C, Barnoy S, McNeal M, El-Khorazaty J, Frenck R, Baqar S. Antibody in Lymphocyte Supernatant (ALS) responses after oral vaccination with live *Shigella sonnei* vaccine candi-

- dates WRSs2 and WRSs3 and correlation with serum antibodies, ASCs, fecal IgA and shedding. *PLoS One*. 2021;16(11):e0259361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259361>
29. Launay O, Sadorge C, Jolly N, Poirier B, Béchet S, van der Vliet D, et al. Safety and immunogenicity of SC599, an oral live attenuated *Shigella dysenteriae* type-1 vaccine in healthy volunteers: results of a Phase 2, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Vaccine*. 2009;27(8):1184–91. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.12.021>
 30. McKenzie R, Venkatesan MM, Wolf MK, Islam D, Grahek S, Jones AM, et al. Safety and immunogenicity of WRSd1, a live attenuated *Shigella dysenteriae* type 1 vaccine candidate. *Vaccine*. 2008;26(26):3291–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.079>
 31. Harutyunyan S, Neuhauser I, Mayer A, Aichinger M, Szijártó V, Nagy G, et al. Characterization of ShigE-TEC, a novel live attenuated combined vaccine against *Shigellae* and ETEC. *Vaccines*. 2020;8(4):689. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040689>
 32. Chakraborty S, Harro C, Denearing B, Bream J, Bauers N, Dally L, et al. Evaluation of the safety, tolerability, and immunogenicity of an oral, inactivated whole-cell *Shigella flexneri* 2a vaccine in healthy adult subjects. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(4):315–25. <https://doi.org/10.1128/CVI.00608-15>
 33. Лёдов ВА, Апарин ПГ. Клинические исследования вакцинного препарата для профилактики дизентерии Флекснера на основе модифицированного липополисахарида *Shigella flexneri* (по результатам I фазы клинических исследований). *Acta Biomedica Scientifica*. 2014;4(98):91–5. [Lyodov VA, Aparin PG. Clinical studies of the vaccine preparation for prevention of Flexner dysentery on the basis of modified *Shigella flexneri* lipopolysaccharide (based on the results of the I phase of clinical trials). *Acta Biomedica Scientifica*. 2014;4(98):91–5 (In Russ.)]
 34. Mo Y, Fang W, Li H, Chen J, Hu X, Wang B, et al. Safety and immunogenicity of a *Shigella* bivalent conjugate vaccine (ZF0901) in 3-month- to 5-year-old children in China. *Vaccines*. 2022;10(1):33. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010033>
 35. Martin P, Alaimo C. The ongoing journey of a *Shigella* bioconjugate vaccine. *Vaccines*. 2022;10(2):212. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020212>
 36. Talaat KR, Alaimo C, Martin P, Bourgeois AL, Dreyer AM, Kaminski RW, et al. Human challenge study with a *Shigella* bioconjugate vaccine: analyses of clinical efficacy and correlate of protection. *EBioMedicine*. 2021;66:103310. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103310>
 37. Hatz CF, Bally B, Rohrer S, Steffen R, Kramme S, Siegrist CA. Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella dysenteriae* type 1 administered to healthy adults: a single blind, partially randomized Phase I study. *Vaccine*. 2015;33(36):4594–601. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.102>
 38. Frenck RW, Jr, Conti V, Ferruzzi P, Ndiaye AGW, Parker S, McNeal MM, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of the *Shigella sonnei* 1790GAHB GMMA candidate vaccine: results from a phase 2b randomized, placebo-controlled challenge study in adults. *EClinicalMedicine*. 2021;39:101076. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101076>
 39. Qasim M, Wrage M, Nüse B, Mattner J. *Shigella* outer membrane vesicles as promising targets for vaccination. *Int J Mol Sci*. 2022;23(2):994. <https://doi.org/10.3390/ijms23020994>
 40. Riddle MS, Kaminski RW, Williams C, Porter C, Baqar S, Kordis A, Gilliland T, et al. Safety and immunogenicity of an intranasal *Shigella flexneri* 2a Invaplex 50 vaccine. *Vaccine*. 2011;29(40):7009–19. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.033>
 41. Turbyfill KR, Clarkson KA, Vortherms AR, Oaks EV, Kaminski RW. Assembly, biochemical characterization, immunogenicity, adjuvanticity, and efficacy of *Shigella* artificial Invaplex. *mSphere*. 2018;3(2):e00583-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00583-17>
 42. Ledov VA, Golovina ME, Markina AA, Knirel YA, L'vov VL, Kovalchuk AL, Aparin PG. Highly homogeneous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. *Vaccine*. 2019;37(8):1062–72. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.067>
 43. Cohen D, Ashkenazi S, Green MS, Gdalevich M, Robin G, Slepon R, et al. Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet*. 1997;349(9046):155–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)06255-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)06255-1)
 44. Passwell JH, Ashkenazi S, Banet-Levi Y, Ramon-Saraf R, Farzam N, Lerner-Geva L, et al. Age-related efficacy of *Shigella* O-specific polysaccharide conjugates in 1–4-year-old Israeli children. *Vaccine*. 2010;28(10):2231–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.12.050>
 45. Cohen D, Atsmon J, Artaud C, Meron-Sudai S, Gougeon ML, Bialik A, et al. Safety and immunogenicity of a synthetic carbohydrate conjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a in healthy adult volunteers: a phase 1, dose-escalating, single-blind, randomised, placebo-controlled study. *Lancet Infect Dis*. 2021;21(4):546–58. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30488-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30488-6)
 46. Seo H, Duan Q, Zhang W. Vaccines against gastroenteritis, current progress and challenges. *Gut Microbes*. 2020;11(6):1486–517. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1770666>
 47. Leow CY, Kazi A, Hisyam Ismail CMK, Chuah C, Lim BH, Leow CH, et al. Reverse vaccinology approach for the identification and characterization of outer membrane proteins of *Shigella flexneri* as potential cellular- and antibody-dependent vaccine candidates. *Clin Exp Vaccine Res*. 2020;9(1):15–25. <https://doi.org/10.7774/cevr.2020.9.1.15>
 48. Walker R, Kaminski RW, Porter C, Choy RKM, White JA, Fleckenstein JM, et al. Vaccines for protecting infants from bacterial causes of diarrheal disease. *Microorganisms*. 2021;9(7):1382. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071382>

49. Anderson JD, Bagamian KH, Muhib F, Baral R, Laytner LA, Amaya M, et al. Potential impact and cost-effectiveness of future ETEC and *Shigella* vac-

cines in 79 low- and lower middle-income countries. *Vaccine X*. 2019;2:100024. <https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2019.100024>

Вклад авторов. *М.В. Абрамцева* — разработка дизайна обзорно-аналитического исследования; анализ и систематизация данных литературы; написание и редактирование текста рукописи; утверждение окончательного варианта статьи для публикации; *Е.О. Неманова* — сбор, анализ и систематизация данных литературы; написание текста рукописи; оформление и редактирование рукописи; *Н.С. Алехина* — сбор, анализ и систематизация данных литературы; оформление 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.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. *M.V. Abramtseva*—elaboration of the concept and design of the analytical review; analysis and systematisation of literature data; writing and editing of the text of the manuscript; approval of the final version of the article for publication; *E.O. Nemanova*—collection, analysis and systematisation of literature data; writing of the text of the manuscript; formatting and editing of the manuscript; *N.S. Alekhina*—collection, analysis and systematisation of literature data; formatting of the manuscript. **Acknowledgments.** 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.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Абрамцева Марина Витальевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0714-1303>
Abramtceva@expmed.ru
Неманова Екатерина Олеговна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2604-6379>
Nemanova@expmed.ru
Алехина Наталья Сергеевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1583-4887>
NAlehina@expmed.ru

Marina V. Abramtseva. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0714-1303>
Abramtceva@expmed.ru
Ekaterina O. Nemanova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2604-6379>
Nemanova@expmed.ru
Natalia S. Alekhina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1583-4887>
NAlehina@expmed.ru

Поступила 28.03.2022
После доработки 06.07.2022
Принята к публикации 26.08.2022

Received 28 March 2022
Revised 6 July 2022
Accepted 26 August 2022

УДК 615.37:615.07

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-266-278>

Научная статья | Scientific article



Разработка критериев приемлемости оценки результатов количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) иммуноферментным методом

Е.В. Шведова^{1,✉}, С.А. Лешина¹, Э.Ю. Кудашева¹, И.В. Борисевич², В.А. Меркулов^{1,3}, Д.В. Шведов¹

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 медико-биологическое агентство, Волоколамское ш., д. 30, Москва, 123182, Российская Федерация

³ 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

✉ Шведова Евгения Владимировна; NovikovaEV@expmed.ru

Резюме

Метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для количественного определения специфических антител (Ат) — анти-D-Ат IgG, в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) (ИГЧА) основан на конкурентном иммунохимическом связывании между анти-D-Ат в препарате ИГЧА и моноклональными анти-D-Ат к эпитопу D-антигена эритроцитов человека фенотипа ccDEE, иммобилизованных на твердой фазе. Приготовление иммуносорбента проводится в условиях лаборатории самостоятельно. При аттестации Международного стандартного образца (МСО) анти-D иммуноглобулина предприняты попытки использования и фенотипа CCDee как наиболее часто встречаемого (16,01%) в сравнении с фенотипом ccDEE (2,16%). Использование фенотипа CCDee возможно при условии соблюдения критериев приемлемости оценки результатов, разработанных при валидации методики. **Цель работы:** разработать критерии приемлемости оценки результатов количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА методом ИФА, в котором для приготовления иммуносорбента, в случае отсутствия эритроцитов фенотипа ccDEE, могут быть использованы эритроциты фенотипа CCDee. **Материалы и методы:** препараты ИГЧА, модельные образцы с известным содержанием анти-D-Ат IgG, МСО анти-D иммуноглобулина, стандартный образец (СО) иммуноглобулина, не содержащий анти-D-Ат IgG, моноклональные анти-D-Ат, эритроциты фенотипов CCDee, ccDEE и ccddee. Определение анти-D-Ат IgG проводили методом конкурентного ИФА. Применяли параметрические и непараметрические методы статистики. **Результаты:** показано, что применение эритроцитов фенотипа CCDee позволяет использовать их для конкурентного иммунохимического связывания с моноклональными анти-D-Ат и анти-D-Ат IgG различных препаратов ИГЧА. Подтверждена пригодность методики с применением фенотипа CCDee по валидационным характеристикам: правильность, промежуточная прецизионность, линейность, селективность, специфичность, устойчивость методики и сопоставимость результатов при использовании эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE.

© Е.В. Шведова, С.А. Лешина, Э.Ю. Кудашева, И.В. Борисевич, В.А. Меркулов, Д.В. Шведов, 2022

Разработаны критерии приемлемости: относительные значения содержания анти-D-Ат IgG в испытуемом образце должны быть в интервале $\pm 20\%$ от номинального значения; коэффициент детерминации (R^2) должен быть не менее 0,9; относительное стандартное отклонение (RSD , %) трех значений оптической плотности для каждой концентрации не должно превышать 20%. **Выводы:** разработанные критерии приемлемости гарантируют достоверность получаемых результатов количественного определения анти-D-Ат IgG методом ИФА, что позволяет их использовать специалистами контрольно-аналитических лабораторий для оценки качества препаратов ИГЧА.

Ключевые слова: критерии приемлемости; иммуноферментный анализ; валидация; препараты иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D); количественное определение анти-D-антител IgG; фенотипы эритроцитов; CCDee; ccDEE; иммуносорбент

Для цитирования: Шведова Е.В., Лешина С.А., Кудашева Э.Ю., Борисевич И.В., Меркулов В.А., Шведов Д.В. Разработка критериев приемлемости оценки результатов количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) иммуноферментным методом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):266–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-266-278>

Development of acceptance criteria for the results of anti-D IgG quantification in human anti-D (Rh₀) immunoglobulin preparations by enzyme immunoassay

E.V. Shvedova^{1,✉}, S.A. Leshina¹, E.Yu. Kudasheva¹, I.V. Borisevich², V.A. Merkulov^{1,3}, D.V. Shvedov¹

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

² Federal Medical Biological Agency, 30 Volokolamskoe Hwy, Moscow 123182, Russian Federation

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Evgeniya V. Shvedova; NovikovaEV@expmed.ru

Abstract

The competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used for the quantification of specific antibodies, anti-D (Rh₀) IgGs, in human anti-D (Rh₀) immunoglobulin preparations relies upon the competition between anti-D antibodies in the preparation and anti-D monoclonal antibodies (mAbs) for immunochemical binding to D-antigen epitopes of the immunosorbent, human erythrocytes of the ccDEE phenotype immobilised on a solid support. The immunosorbent is prepared in-house under laboratory conditions. The certification of the International Standard (IS) for anti-D immunoglobulin included attempts to use the CCDee phenotype, which is more common (16.01%) than the ccDEE phenotype (2.16%). It is possible to use the CCDee phenotype, as long as the user adheres to the acceptance criteria for the results, developed during method validation. **The aim of this study** was to develop the acceptance criteria for the results of anti-D IgG quantification in human anti-D immunoglobulin preparations by the ELISA method that would allow using CCDee erythrocytes to prepare the immunosorbent should there be no erythrocytes of the ccDEE phenotype available. **Materials and methods:** the study used human anti-D immunoglobulin preparations; anti-D IgG-spiked samples; the IS for anti-D immunoglobulin; the reference standard (RS) for anti-D IgG-free immunoglobulin; anti-D mAbs; and erythrocytes of the CCDee, ccDEE, and ccdee phenotypes. The authors quantified anti-D IgG antibodies by the competitive ELISA. The statistical analysis used parametric and nonpar-

ametric tests. **Results:** the study demonstrated the possibility of using CCDee erythrocytes for competitive immunochemical binding with anti-D mAbs and anti-D IgG of various human anti-D immunoglobulin preparations. The suitability of the analytical procedure with the CCDee phenotype was confirmed by validation parameters: trueness, intermediate precision, linearity, selectivity, specificity, and robustness of the method and comparability of the results obtained when using the CCDee and ccDEE phenotypes. The authors developed the acceptance criteria: the relative values of anti-D IgG content in the test sample should range within $\pm 20\%$ of the nominal value; the coefficient of determination (R^2) should be at least 0.9; the relative standard deviation (RSD, %) of three absorbance values for each concentration should not exceed 20%. **Conclusions:** these acceptance criteria guarantee the reliability of assay results of anti-D IgG quantification by the ELISA, which allows them to be used by specialists of control and analytical laboratories to assess the quality of human anti-D immunoglobulin preparations.

Key words: acceptance criteria; enzyme-linked immunosorbent assay; validation; human anti-D (Rh_0) immunoglobulin preparations; anti-D IgG quantification; erythrocyte phenotypes; CCDee; ccDEE; immunosorbent

For citation: Shvedova E.V., Leshina S.A., Kudashева E.Yu., Borisevich I.V., Merkulov V.A., Shvedov D.V. Development of acceptance criteria for the results of anti-D IgG quantification in human anti-D (Rh_0) immunoglobulin preparations by enzyme immunoassay. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):266–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-266-278>

Введение

Препараты иммуноглобулина человека антирезус $Rh_0(D)$ (ИГЧА) – единственные иммунобиологические лекарственные средства для специфической перинатальной профилактики резус-иммунизации женщин с резус-отрицательной принадлежностью крови. Они представляют собой концентраты специфических антител (Ат) – анти-D-Ат IgG, полученные из плазмы крови здоровых доноров, иммунизированных D-антигеном резус-положительных эритроцитов человека [1, 2]. Пассивная иммунизация препаратом ИГЧА предотвращает резус-иммунизацию в более чем в 99% случаев при условии достаточности и своевременности дозы введения [3, 4]. Объем вводимых профилактических доз рассчитывают исходя из количественного содержания анти-D-Ат IgG в препарате, выраженного в международных единицах (МЕ) или в микрограммах (мкг) в 1 мл (1 мкг = 5 МЕ) по отношению к Международному стандартному образцу (МСО) анти-D иммуноглобулина или стандартному образцу (СО), откалиброванному по отношению к МСО¹. Метод прямого кон-

курентного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением моноклональных Ат, используемый зарубежными производителями препаратов ИГЧА, является одним из селективных методов для количественной оценки содержания анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА [5, 6].

В соответствии с монографией Европейской фармакопеи² в качестве антигенов (Аг) при приготовлении иммуносорбента в лабораторных условиях для иммуноферментного метода количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА рекомендовано использовать D-положительные эритроциты 0 группы крови человека, полученные не менее чем от 3 доноров, только фенотипа ccDEE³. Критерии приемлемости оценки результатов не представлены⁴.

В связи с трудностью в получении эритроцитов фенотипа ccDEE, связанными с их меньшей распространенностью в популяции, ранее предпринимались попытки использования эритроцитов фенотипа CCDee для самостоятельного приготовления иммуносорбента [7, 8]. Ранее нами были проведены экспериментальные исследо-

¹ Guideline on the clinical investigation of human anti-D immunoglobulin for intravenous and/or intramuscular use (EMA/CPMP/BPWG/575/99, rev. 1). EMA; 2007. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-investigation-human-anti-d-immunoglobulin-intravenous/intramuscular-use_en.pdf

² 2.7.13. Assay of human anti-D immunoglobulin. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2022.

³ Обозначение фенотипов эритроцитов приведено в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 22.06.2019 № 797 «Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации».

⁴ 2.7.13. Assay of human anti-D immunoglobulin. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2022.

вания по изучению особенностей иммобилизации эритроцитов человека фенотипов CCDee и ccDEE на твердой фазе [9]. Было установлено, что использование эритроцитов фенотипа CCDee как альтернативного фенотипу ccDEE возможно при условии проведения валидационных исследований, направленных на экспериментальное доказательство пригодности фенотипа CCDee для использования при количественном определении анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА.

Цель работы – разработать критерии приемлемости оценки результатов количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА методом ИФА, в котором для приготовления иммуносorbента, в случае отсутствия эритроцитов фенотипа ccDEE, могут быть использованы эритроциты фенотипа CCDee.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) установить валидационные параметры в соответствии с международными правилами и требованиями, предъявляемыми к разработке и валидации количественных биоаналитических методик; 2) провести экспериментальные исследования по валидации методики количественного определения анти-D-Ат IgG методом ИФА по характеристикам: правильность, промежуточная прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость), линейность аналитического диапазона, селективность, специфичность, устойчивость методики и сопоставимость результатов при использовании эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE; 3) оценить полученные результаты на соответствие установленным валидационным параметрам.

Материалы и методы

Материалы:

- препараты ИГЧА: лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения, 150 мкг (750 МЕ) с содержанием в 1 мл восстановленного раствора иммуноглобулинов G не менее 90%, глицина 22,5 мг, натрия хлорида 9,0 мг (препарат № 1); раствор для внутривенного введения, 1500 МЕ (300 мкг)/2 мл с содержанием в 1 мл иммуноглобулинов G не менее 95%, глицина 20,6 мг, натрия хлорида не более 0,250 ммоль и альбумина человека 10 мг (препарат № 2);
- эритроциты человека, полученные не менее чем от 3 доноров, фенотипов CCDee, ccDEE

и ccddee (ID-DiaCell I-II-III 5%, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России) и свежеприготовленные на станции переливания крови (ОБУЗ «Брянская станция переливания крови», Россия);

- СО: МСО анти-D иммуноглобулина (3rd WHO International standard for anti-D Immunoglobulin) с активностью 297 МЕ/ампула (NIBSC code: 16/332, Великобритания)⁵; СО иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG (Y0000540, BRP EDQM, Франция);
- биотинилированные моноклональные анти-D-Ат (Bio-Brad-5, NIBSC code: 02/230, Великобритания);
- конъюгат: авидин/стрептоvidин, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma Aldrich, кат. № E2636, США);
- субстрат: паранитрофенил фосфат (Sigma Aldrich, кат. № 7653, США);
- стоп-реагент: 3 М раствор натрия гидроксида (Sigma Aldrich, кат. № 1310-73-2, США);
- твердая фаза: полистироловые прозрачные 96-луночные микропланшеты с максимальной сорбционной емкостью (650 нг белка/см²) (MaxiSorp, Nunc, кат. № 44-2404-21, США);
- реагенты: папаин (Sigma Aldrich, кат. № P4762), глутаровый альдегид (Sigma Aldrich, кат. № G5882), глюкоза (Sigma Aldrich, кат. № G7528), натрия цитрат (Sigma Aldrich, кат. № S4641), L-цистеин (Sigma Aldrich, кат. № 168149), динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (натрия ЭДТА) (Sigma Aldrich, кат. № E4884), кислота борная (Merck, кат. № 1.00165), бычий сывороточный альбумин (BCA) (Sigma Aldrich, кат. № A7030), 1 М раствор хлористоводородной кислоты (Merck, кат. № 1.09871), калия хлорид (Sigma Aldrich, кат. № 746436), натрия хлорид (Sigma Aldrich, кат. № 13423), калия дигидрофосфат (Sigma Aldrich, кат. № P0662), безводный натрия гидрофосфат (Sigma Aldrich, кат. № 53560), трис-(гидроксиметил)аминометан (Sigma Aldrich, кат. № 3362).

Для проведения экспериментальных работ готовили следующие растворы:

- фосфатно-солевой буферный раствор (ФБР) pH 7,4 (8,0 г/л натрия хлорида, 0,76 г/л безводного натрия гидрофосфата, 0,2 г/л калия хлорида, 0,2 г/л калия дигидрофосфата);
- 10% раствор папаина (1 г папаина растворя-

⁵ International collaborative study to calibrate proposed 3rd WHO International standard for anti-D Immunoglobulin. WHO Expert committee on biological standardization (WHO/BS/2018.2332). [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/bs-documents-\(ecbs\)/2019-documents/bs.2018.2332_3rd_is_anti-d.pdf?sfvrsn=46bc283b_5&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/bs-documents-(ecbs)/2019-documents/bs.2018.2332_3rd_is_anti-d.pdf?sfvrsn=46bc283b_5&download=true)

- ли в ФБР pH 5,4, инкубировали в термостате при 37 °C в течение 30 мин, выдерживали после инкубации 15 мин при комнатной температуре, добавляли 1 мл раствора L-цистеина с концентрацией 48,5 мг/мл и 1 мл натрия ЭДТА с концентрацией 3,7 мг/мл и доводили общий объем до 10 мл ФБР pH 5,4);
- ФБР для иммобилизации эритроцитов pH 7,0 (ФБР pH 7,4 с добавлением 18 г/л глюкозы, 10 г/л натрия цитрата, 0,7 г/л натрия ЭДТА);
 - раствор глutarового альдегида (0,5 г/л глutarового альдегида в ФБР pH 7,4);
 - 2% раствор БСА (20 г/л БСА в ФБР pH 7,4);
 - 10% трис-буферный раствор (ТБР) БСА pH 7,2 (8,0 г натрия хлорида, 0,6 г трис(гидроксиметил)аминометана, 1 г БСА).

Методы

Приготовление иммуносорбента. Отбирали 3 мл эритроцитов в пробирку и проводили их трехкратное отмывание от консервантов и остатков компонентов крови путем добавления 10 мл ФБР (pH 7,4) с последующим центрифугированием при 1200 g в течение 3 мин и удалением супернатанта. Далее эритроциты гидролизировали добавлением к 1 объему эритроцитов 1 объема 10% раствора папаина и последующим инкубированием при температуре 37 °C в течение 10 мин. Затем папаинизированные эритроциты отмывали от продуктов гидролиза, как описано выше. С использованием ФБР для иммобилизации эритроцитов (pH 7,0) готовили 0,2% суспензию папаинизированных отмытых эритроцитов, вносили по 50 мкл суспензии в лунки микропланшета и центрифугировали при 120 g в течение 3 мин при температуре 4 °C. Затем в лунки на 10 мин добавляли по 100 мкл раствора глutarового альдегида, после чего промывали трехкратно добавлением 300 мкл ФБР (pH 7,4). Для исключения неспецифического связывания вносили по 250 мкл 2% раствора БСА и выдерживали 30 мин при комнатной температуре.

Приготовление растворов стандартного, модельных (с известным содержанием анти-D-Ат Ig) и испытуемых образцов. Растворы МСО анти-D иммуноглобулина с содержанием анти-D-Ат IgG (30; 15; 7,5; 3,75; 1,88 МЕ/мл) готовили последовательным двукратным разведением с использованием 10% ТБР БСА. Растворы модельных образцов с известным содержанием анти-D-Ат IgG (30; 15; 7,5; 3,75; 1,88 МЕ/мл) для оценки правильности готовили путем добавления растворов МСО в раствор СО иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG. Растворы образцов препаратов ИГЧА

№ 1, 2 разводили до содержания анти-D-Ат IgG 30 МЕ/мл добавлением 24 мл воды очищенной к 1 мл раствора препарата, затем готовили растворы испытуемых образцов с содержанием анти-D-Ат IgG (30; 15; 7,5; 3,75; 1,88 МЕ/мл) путем последовательного двукратного разведения с использованием 10% ТБР БСА.

Прямой конкурентный иммуноферментный метод. Вносили по 35 мкл разведений растворов МСО и разведений испытуемых образцов в лунки планшета для разведения образцов в трех повторностях. К каждому разведению добавляли 35 мкл биотинилированных моноклональных анти-D-Ат. Затем по 50 мкл каждого образца переносили в лунки иммуносорбента. После инкубации в течение 1 ч при температуре 37 °C образованные иммунные комплексы Аг-Ат трехкратно отмывали от несвязавшихся Ат ФБР (pH 7,4). Затем для выявления образованных иммунных комплексов в каждую лунку иммуносорбента вносили 50 мкл конъюгата и проводили инкубацию в течение 30 мин при комнатной температуре. Иммуносорбент трехкратно промывали ФБР (pH 7,4), вносили 100 мкл субстрата и проводили инкубацию в течение 10 мин в темном месте. Реакцию останавливали внесением в лунки иммуносорбента 50 мкл 3 М раствора натрия гидроксида.

Учет результатов. Учет результатов проводили с использованием спектрофотометра (Multiskan Go, ThermoScientific, США) при длине волны 405 нм. Расчеты проводили при построении калибровочного графика зависимости оптической плотности (ОП, относительные единицы (ОЕ)) от концентрации растворов МСО (логарифм значений содержания анти-D-Ат IgG). Содержание анти-D-Ат IgG (МЕ/мл) в испытуемых образцах определяли по формулам (1), (2), (3):

$$C_i = A + B \ln[C_{ct}], \quad (1)$$

$$C_i = K \times \exp\left(\frac{[OП_{и} - A]}{B}\right), \quad (2)$$

$$C_{изм} = \frac{\sum_{i=1}^n C_i}{n}, \quad (3)$$

где C_i – содержание анти-D-Ат IgG, при одном определении, МЕ/мл; $\exp$ – функция для пересчета логарифма при построении линейного графика; A , B – коэффициенты уравнения линейной регрессии калибровочного графика; C_{ct} – содержание анти-D-Ат IgG в растворе МСО, МЕ/мл; $OП_{и}$ – оптическая плотность испытуемого образца, ОЕ; K – коэффициент разведения; $C_{изм}$ – среднее значение содержания анти-D-Ат IgG, рассчитанное по трем определениям, МЕ/мл, n – количество определений.

Для оценки правильности рассчитывали величину степени извлечения (r , %) по формуле (4):

$$r = \frac{C_{\text{изм}}}{C_{\text{теор}}} \times 100\%, \quad (4)$$

где $C_{\text{изм}}$ — среднее значение содержания анти-D-Ат IgG в испытуемом образце, рассчитанное по 3 определениям, МЕ/мл; $C_{\text{теор}}$ — за теоретическое значение принимали количество анти-D-Ат IgG в МСО, добавленных в раствор СО иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG. Для расчета содержания анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА использовали лицензионную программу статистической обработки результатов ИФА методом параллельных линий⁶.

Статистическая обработка результатов.

Данные обрабатывали с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics версии 20 (Microsoft Windows, США). Рассчитывали среднее арифметическое значение, стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение RSD (%). Коэффициент детерминации (R^2) линейной регрессии определяли при построении логарифмического калибровочного графика зависимости ОП от концентрации растворов МСО, доверительный интервал рассчитывали как произведение SD и количества значений в группе данных при $p=0,05$, значимость различий данных оценивали с помощью t -критерия Стьюдента и U -критерия Манна–Уитни для независимых выборок [10].

Результаты и обсуждение

Процедура валидации, валидационные характеристики методики количественного определения анти-D-Ат IgG и критерии приемлемости для оценки валидационных характеристик были определены в соответствии с требованиями и рекомендациями нормативных документов международных регуляторных органов (ICH, ЕАЭС, FDA, EMA), предъявляемыми к разработке и валидации количественных биоаналитических методов, основанных на образовании иммунных комплексов Аг–Ат⁷. Установленные для валидации параметры представлены в таблице 1.

Оценку правильности (точности) количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА с использованием эритроцитов фенотипа CCDee проводили с использованием МСО и модельных смесей с известным содержанием определяемого вещества (табл. 2). Рассчитывали средние значения степени извлечения (r , %) анти-D-Ат IgG в испытуемых растворах для каждой концентрации, а затем среднее значение для пяти испытуемых растворов. Оценивали результат отклонением среднего результата определений ($C_{\text{изм}}$) от значения, принимаемого за истинное ($C_{\text{теор}}$).

Во всех испытаниях получены удовлетворительные результаты — значения, принимаемые за истинные ($C_{\text{теор}}$), лежат внутри доверительного интервала соответствующих средних результатов испытаний, полученных экспериментально данной методикой. Результаты оценки содержания анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах соответствуют установленному критерию приемлемости ($\pm 20\%$).

Оценку промежуточной прецизионности (внутрилабораторной воспроизводимости и повторяемости) количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА с использованием эритроцитов фенотипа CCDee проводили в разные дни два аналитика (табл. 3). Проводили по 6 испытаний на препаратах ИГЧА № 1, 2 с одинаковым содержанием анти-D-Ат IgG в 1 мл — 750 МЕ. Общее количество испытаний — 12.

Прецизионность подтверждалась соответствием полученных результатов установленным критериям приемлемости: величина RSD (%) значений содержания анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА, полученных на 6 образцах каждым аналитиком, составила менее 20% (3,54 и 8,89%); величина RSD (%) значений содержания анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА, полученных на 12 образцах, составила менее 20% (6,48%); значения содержания анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА, определенные каждым аналитиком (аналитик 1 — от 729,15 до 771,65 МЕ/мл, аналитик 2 — от 685,01 до 789,99 МЕ/мл), находятся в диапазоне $\pm 20\%$, или от 600 до 900 МЕ/мл от номинального значения (750 МЕ/мл), что соответствует

⁶ PLA Database version 2.0.0 (build 551), S/N: 10536.

⁷ Руководства ICH для фармацевтической отрасли. Качество: практическое руководство. Береговых ВВ., ред. Санкт-Петербург: Профессия; 2017.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 (ред. от 04.09.2020) «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Приложение № 6. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов.

Bioanalytical method validation: guidance for industry. FDA; 2018. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr.2). EMA; 2011. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

Таблица 1. Установленные валидационные параметры методики количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) методом иммуноферментного анализа**Table 1.** Established validation parameters of the enzyme immunoassay for quantitative determination of anti-D IgG antibodies in human anti-D (Rh₀) immunoglobulin preparations

Валидационная характеристика <i>Validation parameter</i>	Критерии приемлемости <i>Acceptance criteria</i>
Правильность (точность) <i>Trueness (accuracy)</i>	Степень извлечения (r , %) анти-D-Ат IgG в модельных образцах, приготовленных путем добавления раствора МСО в раствор СО иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG, должна находиться в диапазоне $\pm 20\%$ относительно добавленного количества ($C_{\text{теор}}$) <i>Recovery (r, %) of anti-D IgG from the samples prepared by spiking the solution of the anti-D IgG-free RS of normal human immunoglobulin with the IS solution should range within $\pm 20\%$ of the spiked amount (C_{theor})</i>
Промежуточная прецизионность (внутрилабораторная воспроизводимость и повторяемость) <i>Intermediate precision (intra-laboratory reproducibility and repeatability)</i>	1. Величина RSD (%) значений содержания анти-D-Ат IgG, полученных на 12 образцах двумя аналитиками в разные дни (по 3 образца препаратов ИГЧА № 1, 2 каждым аналитиком в 3 дня) должна быть $\leq 20\%$. 2. Содержание анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах препаратов ИГЧА № 1, 2, определенное каждым аналитиком, должно находиться в диапазоне $\pm 20\%$ от номинального значения <i>1. Relative standard deviation (RSD, %) of the values of anti-D IgG content obtained for 12 samples by two analysts on different days (3 samples of human anti-D immunoglobulin preparations Nos. 1 and 2 each within 3 days) should be $\leq 20\%$. 2. Anti-D IgG content in the test samples of human anti-D immunoglobulin preparations Nos. 1 and 2, determined by each of the analysts, should range within $\pm 20\%$ of the nominal value</i>
Линейность аналитического диапазона <i>Linearity (analytical range)</i>	Графики зависимости значений оптической плотности от содержания анти-D-Ат IgG в растворах МСО визуально должны характеризоваться линейностью в диапазоне от 1,8 до 30 МЕ/мл, коэффициенты детерминации (R^2) линейной регрессии должны быть $\geq 0,9$ <i>Plots of absorbance versus anti-D IgG content in IS solutions should be visually linear in the range from 1.8 to 30 IU/mL; coefficients of determination (R^2) of the linear regression should be ≥ 0.9</i>
Селективность и специфичность <i>Selectivity and specificity</i>	1. Содержание анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах препаратов ИГЧА № 1, 2 содержащих глицин, натрия хлорид, альбумин человека, должно находиться в диапазоне $\pm 20\%$ от номинального значения. 2. Конкуренция между компонентами реакции: СО иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG, и моноклональными анти-D-Ат при их внесении в лунки иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов фенотипа CCDee, должна отсутствовать. 3. Внесение растворов МСО и испытуемых образцов в лунки иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов резус-отрицательного фенотипа ccdee, не должно образовывать комплекса Ag-Ат <i>1. Anti-D IgG content in the test samples of human anti-D immunoglobulin preparations Nos. 1 and 2 containing glycine, sodium chloride, and human albumin should range within $\pm 20\%$ of the nominal value. 2. Reaction components, the anti-D IgG-free RS of normal immunoglobulin and the anti-D mAbs, should not compete with each other when introduced into the wells with the immunosorbent prepared using CCDee erythrocytes. 3. Antigen-antibody complexes should not form when IS solutions and test samples are introduced into the wells with the immunosorbent prepared using Rh-negative ccdee erythrocytes</i>
Устойчивость методики, сопоставимость результатов при использовании эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE <i>Robustness of the analytical procedure, comparability of the results obtained with CCDee and ccDEE erythrocytes</i>	Значимость различий данных при оценке независимых выборок с помощью t -критерия Стьюдента и U -критерия Манна-Уитни количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА № 1, 2, полученных в условиях оценки промежуточной прецизионности с использованием эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE, должна отсутствовать <i>With independent sample Student's t- and Mann-Whitney U-tests, no significant difference should be observed between the results of anti-D IgG quantification in human anti-D immunoglobulin preparations Nos. 1 and 2 obtained under the conditions for the evaluation of intermediate precision using CCDee and ccDEE erythrocytes</i>

Примечание. Ат — антитела, Ag — антигены, ИГЧА — иммуноглобулин человека антирезус Rh₀(D), СО — стандартный образец, МСО — международный стандартный образец, r — степень извлечения анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах, $C_{\text{теор}}$ — значения содержания анти-D-Ат IgG, принимаемые за истинные, RSD — относительное стандартное отклонение, R^2 — коэффициент детерминации.

Note. mAb—monoclonal antibody, RS—reference standard, IS—international standard, r —recovery of anti-D IgG from the test samples, C_{theor} —anti-D IgG content values taken as true, RSD —relative standard deviation, R^2 —coefficient of determination.

установленным критериям приемлемости результатов. Таким образом, методика количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА методом ИФА с использованием

эритроцитов фенотипа CCDee обладает прецизионностью.

Оценку линейности аналитического диапазона количественного определения анти-D-Ат

Таблица 2. Результаты оценки правильности количественного определения анти-D-антител IgG методом иммуноферментного анализа с использованием эритроцитов фенотипа CCDee

Table 2. Results of trueness evaluation of the enzyme immunoassay method for anti-D IgG quantification using CCDee erythrocytes

Фенотип эритроцитов <i>Phenotype of erythrocytes</i>	$C_{теор}, ME/мл$ $C_{theor}, IU/mL$	$C_{изм}, ME/мл$ $C_{meas}, IU/mL$	$U_{ф}$ U_{obt}	$U_{к}$ U_{crit}	$r, \%$	Средние значения, % <i>Mean values, %</i>	ДИ ($P=95\%$), % <i>CI ($P=95\%$), %</i>
CCDee	30,0	30,7±3,34	16	3	102,37	100,5	100,5±5,37
	15,0	14,87±2,11	15		99,10		
	7,5	7,59±4,58	16		101,21		
	3,75	3,87±0,60	12		103,23		
	1,88	1,82±0,61	12		96,57		

Примечание. $C_{теор}$ — значения содержания анти-D-Ат IgG, принимаемые за истинные, $C_{изм}$ — содержание анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах, $U_{ф}$ — фактическое значение U -критерия Манна–Уитни, $U_{к}$ — критическое значение U -критерия Манна–Уитни; r — степень извлечения анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах, ДИ — доверительный интервал.

Note. C_{theor} —anti-D IgG content values taken as true, C_{meas} —anti-D IgG content values measured in the test samples, U_{obt} —obtained values of Mann–Whitney U -test, U_{crit} —critical values of Mann–Whitney U -test, r —anti-D IgG recovery from the test samples, CI —confidence interval.

Таблица 3. Результаты оценки промежуточной прецизионности количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) с использованием эритроцитов фенотипа CCDee

Table 3. Results of intermediate precision evaluation of the enzyme immunoassay method for anti-D-IgG quantification in human anti-D (Rh₀) immunoglobulin preparations using CCDee erythrocytes

Аналитик <i>Analyst</i>	Препарат <i>Preparation</i>	Дни <i>Days</i>	$C_{изм}, ME/мл$ $C_{meas}, IU/mL$	Среднее значение, МЕ/мл <i>Mean value, IU/mL</i>	SD	$RSD, \%$	RSD , среднее значение, % <i>RSD, mean value, %</i>	ДИ ($P=95\%$), МЕ/мл <i>CI ($P=95\%$), IU/mL</i>
1	№ 1	1	754	750,4	26,56	3,54	6,48	±21,25
		2	792					
		3	739					
	№ 2	1	753,5					
		2	754					
		3	710					
2	№ 1	1	734	737,5	65,6	8,89	6,48	±52,49
		2	686					
		3	807					
	№ 2	1	770					
		2	791					
		3	637					

Примечание. $C_{изм}$ — содержание анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах, SD — стандартное отклонение, RSD — относительное стандартное отклонение, ДИ — доверительный интервал.

Note. C_{meas} —anti-D IgG content values measured in the test samples, SD —standard deviation, RSD —relative standard deviation, CI —confidence interval.

IgG в препаратах ИГЧА с использованием эритроцитов фенотипа CCDee проводили десятью испытаниями с применением растворов МСО, содержащих 30, 15, 7,5, 3,75, 1,88 МЕ/мл анти-D-Ат IgG (табл. 4).

Величина RSD (%) значений ОП растворов МСО не превышала 11,0% и соответствовала

установленным критериям приемлемости результатов ($\leq 20\%$). Графики зависимости значений ОП от значений содержания анти-D-Ат IgG в растворах МСО характеризовались линейностью, коэффициенты детерминации линейной регрессии (R^2) были не менее 0,9 (рис. 1), что свидетельствовало о наличии линейной зависимо-

Таблица 4. Результаты оценки линейности аналитического диапазона количественного определения анти-D-антител IgG иммуноферментным методом с использованием эритроцитов фенотипа CCDee
Table 4. Results of linearity range evaluation of the enzyme immunoassay method for anti-D IgG quantification using CCDee erythrocytes

$C_{MCO}, \text{МЕ/мл}$ $C_{IS}, \text{IU/mL}$	Оптическая плотность растворов МСО, относительные единицы <i>Absorbance of IS solutions, arbitrary units</i>	<i>RSD, %</i>
1,88	0,738±0,017	2,3
3,75	0,626±0,021	3,5
7,5	0,536±0,026	4,8
15,0	0,379±0,024	5,8
30,0	0,260±0,025	11,0

Примечание. МСО – международный стандартный образец, C_{MCO} – содержание анти-D-антител IgG в растворах МСО, *RSD* – относительное стандартное отклонение.
Note. IS – international standard, C_{IS} – anti-D IgG content in IS solutions, *RSD* – relative standard deviation.

сти в аналитическом диапазоне содержания анти-D-Ат IgG от 1,88 до 30 МЕ/мл.

Оценку селективности и специфичности количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА с использованием эритроцитов фенотипа CCDee рассматривали как способность методики однозначно оценивать содержание анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА в присутствии сопутствующих компонентов. Для исследования валидационных характеристик использовали препараты ИГЧА различного состава (препараты № 1, 2). Селективность и специфичность подтверждалась соответствием критериям приемлемости результатов, доказывающих, что входящие в состав препаратов дополнительные вещества (стабилизаторы – глицин, натрия хлорид, альбумин человека) не влияют на количественное определение содержания анти-D-Ат IgG (табл. 3).

При параллельном воспроизведении методики в качестве испытуемого образца использовали раствор СО иммуноглобулина человека

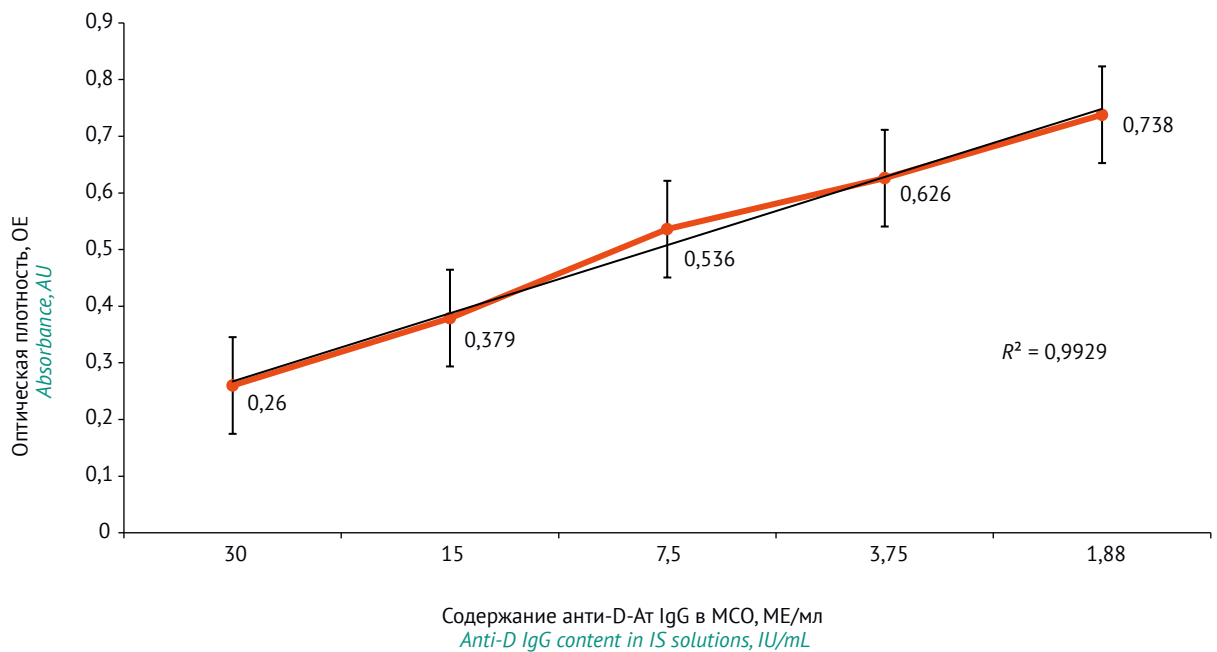


Рис. 1. Определение содержания анти-D-антител IgG в растворах Международного стандартного образца (МСО) при коэффициенте детерминации $R^2 \geq 0,9$: — при использовании эритроцитов фенотипа CCDee, — линия тренда средних значений при $n=10$.
Fig. 1. Anti-D IgG quantification in international standard (IS) solutions with the coefficient of determination of $R^2 \geq 0,9$: — results obtained with CCDee erythrocytes; — trend line for means, $n=10$.

Таблица 5. Результаты оценки количественного определения анти-D-антител IgG в препарате № 1 с помощью иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE

Table 5. Results of evaluation of anti-D IgG quantification in preparation No. 1 using the immunosorbents prepared with CCDee and ccDEE erythrocytes

Фенотип эритроцитов <i>Phenotype of erythrocytes</i>	$C_{изм}$, МЕ/мл C_{meas} , IU/mL	Среднее значение, МЕ/мл <i>Mean value, IU/mL</i>	<i>SD</i>	<i>RSD, %</i>	ДИ (<i>P</i> =95%), МЕ/мл <i>CI (P=95%), IU/mL</i>	$t_{теор}$ t_{theor}	t_{ϕ} t_{obt}
CCDee	754	758,56	72,15	9,51	±47,14	2,30	1,24
	734						
	686						
	792						
	844						
	807						
	739						
	844						
	627						
ccDEE	748	798,78	51,71	6,47	±33,78		
	730						
	833						
	794						
	792						
	891						
	776						
	771						
	854						

Примечание. $C_{изм}$ — содержание анти-D-антител IgG в препарате № 1, SD — стандартное отклонение, RSD — относительное стандартное отклонение, ДИ — доверительный интервал, $t_{теор}$ — теоретическое значение t -критерия Стьюдента, $t_{ф}$ — фактическое значение t -критерия Стьюдента.

Note. C_{meas} —anti-D IgG content values measured in preparation No. 1, SD —standard deviation, RSD —relative standard deviation, CI—confidence interval, t_{theor} —theoretical value of Student's t -test, t_{obt} —obtained value of Student's t -test.

нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG. При его применении наблюдалось отсутствие конкуренции с биотинилированными моноклональными анти-D-Ат, что подтверждалось развитием яркого окрашивания реакционной смеси после внесения стоп-реагента, а также высокими значениями ОП ($OE > 2$, $n=10$) при учете результатов с использованием спектрофотометра.

При параллельном воспроизведении методики при внесении растворов МСО, испытуемых образцов и биотинилированных моноклональных анти-D-Ат в лунки иммуносорбента, приготовленного с использованием D-отрицательных эритроцитов фенотипа ccdee, не наблюдалось образования комплексов Аг-Ат, что подтверждалось отсутствием окрашивания реакционной смеси после внесения стоп-реагента при визуальной оценке, а также значениями ОП значительно ниже аналитическо-

го диапазона определения — $0,050 \pm 0,007$ ОЕ ($n=10$), при учете результатов с использованием спектрофотометра.

Таким образом, продемонстрирована специфичность методики количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА с использованием эритроцитов фенотипа CCDee.

Оценку устойчивости методики и сопоставимость результатов проводили для подтверждения возможности применения эритроцитов фенотипа CCDee как альтернативного фенотипу ccDEE при количественном определении анти-D-Ат IgG методом ИФА. Для этого готовили иммуносорбент с использованием эритроцитов двух фенотипов и определяли содержание анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА различного состава для внутримышечного (препарат № 1) и внутривенного (препарат № 2) введения (по 18 определений для каждого препарата). Результаты

Таблица 6. Результаты оценки количественного определения анти-D-антител IgG в препарате № 2 с помощью иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE

Table 6. Results of evaluation of anti-D IgG quantification in preparation No. 2 using the immunosorbents prepared with CCDee and ccDEE erythrocytes

Фенотип эритроцитов <i>Phenotype of erythrocytes</i>	$C_{изм}$, МЕ/мл C_{meas} , IU/mL	Среднее значение, МЕ/мл <i>Mean value, IU/mL</i>	<i>SD</i>	<i>RSD, %</i>	ДИ (P=95%), МЕ/мл <i>CI (P=95%), IU/mL</i>	$t_{теор}$ t_{theor}	t_{ϕ} t_{obt}
CCDee	753,5	779,17	80,8	10,37	±52,79	2,30	0,79
	754						
	791						
	637						
	710						
	770						
	890						
	888						
	819						
ccDEE	763	751,94	78,03	10,38	±50,98		
	883						
	681						
	700						
	674						
	743,5						
	763						
	691						
	869						

Примечание. $C_{изм}$ — содержание анти-D-антител IgG в препарате № 2, SD — стандартное отклонение, RSD — относительное стандартное отклонение, ДИ — доверительный интервал, $t_{теор}$ — теоретическое значение t -критерия Стьюдента, $t_{ф}$ — фактическое значение t -критерия Стьюдента.

Note. C_{meas} —anti-D IgG content values measured in preparation No. 2, SD —standard deviation, RSD —relative standard deviation, CI —confidence interval, t_{theor} —theoretical value of Student's t -test, t_r —actual value of Student's t -test.

оценки количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА представлены в таблицах 5 и 6 и на рисунке 2.

Возможность применения эритроцитов фенотипа CCDee как альтернативного фенотипу ccDEE для количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА иммуноферментным методом подтверждалась отсутствием статистической значимости различий данных при оценке независимых выборок (результаты количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах № 1, 2). С помощью t -критерия Стьюдента показано, что для препарата № 1 $t_{ф}=1,24$ меньше $t_{теор}=2,30$ (табличного при $P=95\%$), для препарата № 2 — $t_{ф}=0,79$ меньше $t_{теор}=2,30$ (табличного при $P=95\%$). Далее с помощью U -критерия Манна–Уитни для независимых групп данных для двух препаратов было установлено, что $U_{к}=18$ меньше $U_{ф}=21$.

Проведенная валидация методики количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА методом ИФА по ключевым параметрам: правильность, промежуточная прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость), линейность аналитического диапазона, селективность, специфичность, устойчивость методики и сопоставимость результатов при использовании эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE позволила установить следующие критерии приемлемости оценки результатов: 1) относительные значения содержания анти-D-Ат IgG в испытуемом образце должны быть в интервале от 80 до 120% ($\pm 20\%$) от номинального (установленного) значения; 2) при построении графика зависимости значений ОП от значений содержания анти-D-Ат IgG в растворах МСО коэффициент детерминации (R^2) линейной регрессии должен быть не ме-

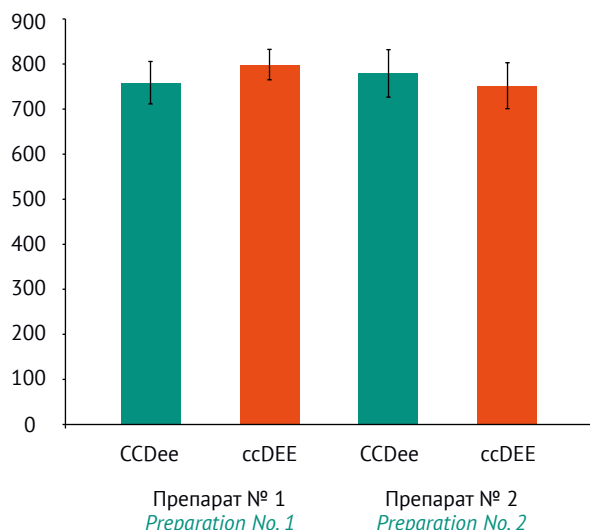


Рис. 2. Результаты оценки устойчивости методики и сопоставимости результатов при количественном определении анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) с использованием эритроцитов фенотипа CCDee и ccDEE. По оси ординат – содержание анти-D-антител IgG, МЕ/мл.

Fig. 2. Results of the evaluation of the analytical procedure's robustness and the comparability of the results of anti-D IgG quantification in human anti-D (Rh₀) immunoglobulin preparations using CCDee and ccDEE erythrocytes. Y axis—anti-D IgG content, IU/mL.

Литература/References

1. Савельева ГМ, Курцер МА, Панина ОБ, Сичинава ЛГ, Клименко ПА, Конопляников АГ, Алексеенкова МВ. Диагностика, лечение, профилактика гемолитической болезни плода при резус-сенситизации. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2006;51(6):73–8. [Savel'eva GM, Kurcer MA, Panina OB, Sichinava LG, Klimenko PA, Konopljannikov AG, Alekseenkova MV. Diagnosis, treatment, prevention of fetal hemolytic disease in RH-sensitization. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2006;51(6):73–8 (In Russ.)]
2. Hannafin B, Lovecchio F, Blackburn P. Do Rh-negative women with first trimester spontaneous abortions need Rh immune globulin? *Am J Emerg Med*. 2006;24(4):487–90. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2006.01.020>
3. Scott ML. The complexities of the Rh system. *Vox Sang*. 2004;87:58–62. <https://doi.org/10.1111/j.1741-6892.2004.00431.x>
4. MacKenzie IZ, Roseman F, Findlay J, Thompson K, Jackson E, Scott J, Reed M. The kinetics of routine antenatal prophylactic intramuscular injections of polyclonal anti-D immunoglobulin. *BJOG*. 2006;113(1):97–101. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00789.x>
5. Thorpe SJ, Sands D, Rautmann G, Schäffner G. International collaborative study to evaluate methods for quantification of anti-D in immunoglobulin preparations. *Vox Sang*. 2002;83(1):42–50. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2002.00169.x>
6. Шведова ЕВ, Кудашева ЭЮ, Климов ВИ. Методы оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D): современное состояние проблемы. *Иммунология*. 2020;41(3):256–61. [Shvedova EV, Kudasheva EYu, Klimov VI. Methods for evaluating the specific activity of preparations of human antirhesus Rh₀(D): current status of the problem. *Immunologiya = Immunology*. 2020;41(3):256–61 (In Russ.)] <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-256-261>
7. Донсков СИ, Мороков ВА. *Группы крови человека: руководство по иммуносерологии*. М.: ИП Скороходов ВА; 2011. [Donskov SI, Morokov VA. *Human blood groups: a guide to immunoserology*. Moscow: IP Skorohodov VA; 2011 (In Russ.)]
8. Thorpe SJ, Turner CE, Heath AC, Sands D. A competitive enzyme-linked immunoassay using erythrocytes fixed to microtitre plates for anti-D quantitation in immunoglobulin products. *Vox Sang*. 2000;79(2):100–7. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2000.7920100.x>
9. Шведова ЕВ, Лешина СА, Давыдов ДС, Борисевич ИВ, Кудашева ЭЮ. Разработка критериев имобилизации эритроцитов человека фенотипов R1R1 и R2R2 на твердой фазе при определении содержания анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) методом иммуноферментного анализа. *Иммунология*. 2022;43(2):208–16. [Shvedova EV, Leshina SA,

нее 0,9; 3) относительное стандартное отклонение (RSD, %) трех значений ОП, ОЕ для каждой концентрации не должно превышать 20%.

Заключение

В ходе проведенных валидационных исследований получены результаты, демонстрирующие возможность применения эритроцитов фенотипа CCDee как альтернативного фенотипу ccDEE для количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА иммуноферментным методом. Разработанные критерии приемлемости оценки результатов количественного определения анти-D-Ат IgG иммуноферментным методом с использованием эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE для приготовления иммуносорбента гарантируют достоверность получаемых результатов количественного определения анти-D-Ат IgG, что позволяет их использовать специалистами контрольно-аналитических лабораторий для оценки качества препаратов ИГЧА. Количественное определение анти-D-Ат IgG с использованием наиболее распространенного фенотипа эритроцитов CCDee в дополнение к фенотипу ccDEE расширяет возможности применения селективного иммуноферментного метода.

Davydov DS, Borisevich IV, Kudasheva EYu. Development of criteria for immobilization of human erythrocytes of phenotypes R1R1 and R2R2 on the solid phase in determining the content of anti-D-antibodies IgG in immunoglobulin human antirhesus Rh₀(D) preparations by enzyme immunoassay.

Immunologiya = Immunology. 2022;43(2):208–16 (In Russ.) <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-2-208-216>

10. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998. [Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994]

Вклад авторов. *Е.В. Шведова* — дизайн исследования, проведение экспериментальных исследований по оценке правильности, промежуточной прецизионности, линейности, селективности, специфичности, устойчивости и сопоставимости результатов при валидации методики, анализ результатов, написание текста рукописи; *С.А. Лешина* — проведение экспериментальных исследований по оценке промежуточной прецизионности и сопоставимости результатов при валидации методики; *Э.Ю. Кудашева* — дизайн исследования, интерпретация результатов, написание текста рукописи; *И.В. Борисевич* — концепция исследования; *В.А. Меркулов* — концепция исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации; *Д.В. Шведов* — дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов, написание 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, И.В. Борисевич — членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contribution. *E.V. Shvedova*—elaboration of the study design, experimental evaluation of trueness, intermediate precision, linearity, selectivity, specificity, robustness and comparability of the results of the analytical procedure during its validation, analysis of the results, writing of the text of the manuscript; *S.A. Leshina*—experimental evaluation of intermediate precision and comparability of the results of the analytical procedure during its validation; *E.Yu. Kudasheva*—elaboration of the study design, interpretation of the results, writing of the text of the manuscript; *I.V. Borisevich*—elaboration of the study concept; *V.A. Merkulov*—elaboration of the study concept, approval of the final version of the manuscript for publication; *D.V. Shvedov*—elaboration of the study, analysis and interpretation of the results, writing of the text of the manuscript.

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. V.A. Merkulov is the Editor-in-Chief, I.V. Borisevich is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Шведова Евгения Владимировна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9229-3677>
NovikovaEV@expmed.ru

Лешина Светлана Анатольевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9482-3483>
Leshina@expmed.ru

Кудашева Эльвира Юрьевна, д-р мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5838-2481>
Kudasheva@expmed.ru

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0713-7419>
borisevichiv@fmba.gov.ru

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>
merkulov@expmed.ru

Шведов Дмитрий Владимирович, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6945-4145>
Shvedov@expmed.ru

Evgeniya V. Shvedova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9229-3677>
NovikovaEV@expmed.ru

Svetlana A. Leshina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9482-3483>
Leshina@expmed.ru

Elvira Yu. Kudasheva, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5838-2481>
Kudasheva@expmed.ru

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0713-7419>
borisevichiv@fmba.gov.ru

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>
merkulov@expmed.ru

Dmitry V. Shvedov, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6945-4145>
Shvedov@expmed.ru

Поступила 19.04.2022

После доработки 22.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Received 19 April 2022

Revised 22 August 2022

Accepted 26 August 2022

УДК 604.4

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-279-292>

Научная статья | Scientific article



Оптимизация условий культивирования клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, с целью повышения выхода фермента арилсульфатазы В

С.С. Тимонова✉, К.А. Смолова, И.А. Кирик, М.С. Пантюшенко, Р.Л. Анисимов, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадз

АО «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Тимонова Софья Сергеевна; timonova1993@yandex.ru

Резюме

Синдром Марото–Лами (мукополисахаридоз VI типа) – орфанное генетическое заболевание, вызванное мутациями гена *ARSB*, который кодирует лизосомальный фермент арилсульфатазу В. Актуальность исследования заключается в необходимости разработки отечественного препарата рекомбинантной арилсульфатазы В для лечения пациентов с данным заболеванием в Российской Федерации. Ранее были получены клеточные линии-продуценты, коэкспрессирующие целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин-генерирующий фермент на основе клеточной линии CHO. Однако для дальнейшей разработки препарата рекомбинантной арилсульфатазы В представляется важным повышение выхода фермента. **Цель работы:** увеличение продуктивности клонов-продуцентов за счет оптимизации процесса культивирования и добавления в культуральную среду хлорида кальция и сульфата меди. **Материалы и методы:** использовали суспензионную клеточную линию CHO. Моноклональные клеточные линии получали с использованием систем Cell Metric и Clone Pix FL. Концентрацию арилсульфатазы В в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа. Использовали периодическое культивирование (batch culture) и/или периодическое культивирование с подпиткой (fed-batch culture) в среде с добавлением различных концентраций сульфата меди и хлорида кальция. **Результаты:** продемонстрировано, что одновременное добавление сульфата меди и хлорида кальция в концентрации 300 мкМ при периодическом культивировании клонов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, увеличивает жизнеспособность культур и повышает удельную продуктивность клеток до $4,58 \pm 1,62$ пг/(клетка×сут). При культивировании лидерного клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, в условиях периодического культивирования с подпиткой длительностью 12 сут достигнуто увеличение выхода активного лизосомального фермента арилсульфатазы В до 420 мг/л при добавлении в ростовую среду сульфата меди в концентрации 300 мкМ. **Выводы:** культивирование клонов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, в условиях периодического культивирования с подпиткой и с добавлением в среду сульфата меди приводит к значительному улучшению ростовых свойств клеточной линии и выхода целевого фермента. Данный подход в подборе условий культивирования продуцентов можно применять к другим ферментам подкласса сульфатаз.

Ключевые слова: арилсульфатаза В; клон-продуцент; условия культивирования; формилглицин-генерирующий фермент; ген *SUMF1*; мукополисахаридоз VI типа

© С.С. Тимонова, К.А. Смолова, И.А. Кирик, М.С. Пантюшенко, Р.Л. Анисимов, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадз, 2022

Для цитирования: Тимонова С.С., Смолова К.А., Кирик И.А., Пантюшенко М.С., Анисимов Р.Л., Хамитов Р.А., Пискунов А.А., Бадэ В.Н. Оптимизация условий культивирования клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, с целью повышения выхода фермента арилсульфатазы В. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):279–292. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-279-292>

Optimisation of culture conditions for a producer clone coexpressing arylsulfatase B and a formylglycine-generating enzyme in order to increase the yield of arylsulfatase B

S.S. Timonova✉, K.A. Smolova, I.A. Kirik, M.S. Pantyushenko, R.L. Anisimov, R.A. Khamitov, A.A. Piskunov, V.N. Bade

JSC "GENERIUM", 14 Vladimirskaya St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Sofia S. Timonova; timonova1993@yandex.ru

Abstract

Maroteaux–Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI) is an orphan genetic disease caused by mutations in the arylsulfatase B gene (*ARSB*), which encodes the lysosomal enzyme arylsulfatase B (ASB). The relevance of the study lies in the need of a Russian recombinant ASB product for patients with the disease in the Russian Federation. Previously, the authors have developed producer lines coexpressing the target ASB enzyme with an auxiliary formylglycine-generating enzyme (FGE), based on Chinese hamster ovary (CHO) cells. Further development of the recombinant ASB preparation places priority on increasing the enzyme yield. **The aim of this study** was to increase the productivity of producer clones by optimising the culture process and adding calcium chloride and copper sulfate to the culture medium. **Materials and methods:** a suspension-adapted CHO cell line was used. Monoclonal cell lines were developed using Cell Metric and ClonePix FL systems. The concentration of ASB in the culture liquid was determined using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The authors analysed batch culture and/or fed-batch culture in media supplemented with various concentrations of copper sulfate and calcium chloride. **Results:** the combined addition of copper sulfate and calcium chloride at concentrations of 300 µM during batch culture of producer clones coexpressing ASB and FGE increases viability and specific productivity of the cells up to 4.58±1.62 pg/(cell×day). The cultivation of the lead producer clone coexpressing ASB and FGE under fed-batch conditions for 12 days and the addition of copper sulfate to the growth medium at the concentration of 300 µM allow for increasing the yield of the active lysosomal enzyme, arylsulfatase B, to 420 mg/L. **Conclusions:** the cultivation of producer clones coexpressing ASB and FGE under fed-batch conditions with copper sulfate added to the medium significantly improves cell line growth properties and the ASB yield. This approach to the selection of culture conditions for producer cell lines can be applied to other enzymes of the sulfatase family.

Key words: arylsulfatase B; producer clone; culture conditions; formylglycine-generating enzyme; *SUMF1* gene; mucopolysaccharidosis type VI

For citation: Timonova S.S., Smolova K.A., Kirik I.A., Pantyushenko M.S., Anisimov R.L., Khamitov R.A., Piskunov A.A., Bade V.N. Optimisation of culture conditions for a producer clone coexpressing arylsulfatase B and a formylglycine-generating enzyme in order to increase the yield of arylsulfatase B. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):279–292. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-279-292>

Введение

Ген *ARSB* кодирует лизосомальный фермент N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазу (арилсульфатаза В, галсульфаза, ASB, EC 3.1.6.12) [1]. Мукополисахаридоз (МПС) VI типа представляет собой орфанное генетическое заболевание, которое вызвано нарушением работы или отсутствием фермента арилсульфатазы В (ASB). Основная функция фермента ASB заключается в отщеплении сульфатных остатков гликозаминогликанов (ГАГ) в лизосомах [2]. Накопление ГАГ приводит к агрегированию нерасщепленных продуктов метаболизма в тканях и органах, вызывая нарушение обмена веществ [3]. В настоящее время пациентам МПС VI типа рекомендовано лечение единственным одобренным препаратом Наглазим (BioMarin, США) [4, 5].

Для активности фермента ASB необходима посттрансляционная модификация [6–8], приводящая к изменению аминокислотного остатка цистеина (Cys) до молекулы α -формилглицин (fGly) [9, 10]. В своей структуре фермент ASB¹ имеет ион двухвалентного металла, предположительно Ca^{2+} . Роль иона металла заключается в стабилизации образования сложного промежуточного сульфатного эфира во время конверсии Cys в fGly [11].

Образование fGly катализируется формилглицин-генерирующим ферментом² (FGE, EC 1.8.3.7) [12, 13]. FGE взаимодействует с развернутой вторичной структурой сульфатаз и модифицирует Cys в активном центре фермента до fGly [14, 15]. В литературе описан механизм реакции конверсии Cys в fGly под действием FGE с участием иона Cu^{2+} [16–19]. Также известно, что вспомогательный фермент FGE имеет два иона Ca^{2+} в третичной структуре белка [20, 21].

В результате предварительных работ, проведенных авторами [22], на основе суспензионной линии клеток CHO были получены клеточные линии-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB и FGE (ASB+FGE), с уровнем выхода целевого фермента ASB 50–100 мг/л. Однако для дальнейшей разработки отечественного препарата на основе рекомбинантной арилсульфатазы В необходимо было оптимизировать процесс культивирования клеточной линии. Для подбора условий культивирования использовали периодическое культивирование (batch culture) и/или периодическое культивирование с подпиткой (fed-batch culture). Добавление сульфата меди как компонента, влияющего на повышение продуктивности клеточной линии и удельную активность суль-

фатазы, известно ранее на примере фермента идуронат-2-сульфатазы [23].

Цель работы – увеличение продуктивности клонов-продуцентов за счет оптимизации процесса культивирования и добавления в культуральную среду хлорида кальция и сульфата меди. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: изучение влияния добавления в культуральную среду различных концентраций сульфата меди и хлорида кальция на выход целевого фермента ASB при культивировании мини-пулов-продуцентов ASB+FGE; изучение влияния добавления хлорида кальция и сульфата меди на ростовые и продукционные характеристики панели клонов-продуцентов ASB+FGE; оптимизация условий культивирования лидерного клона-продуцента ASB+FGE с целью повышения выхода целевого фермента ASB; сравнение и анализ результатов активности очищенного фермента и продуктивности полученных клеточных линий.

Материалы и методы

Материалы

Клетки яичника китайского хомячка (CHO-K1) получены из коллекции клеточных культур НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика и адаптированы к условиям суспензионного культивирования без использования белков животного происхождения.

В работе использовали следующие основные реактивы: полутвердая среда для клонирования ClonaCell Flex (Stemcell, Канада); среда для культивирования BalanCD CHO Growth A (BCD) (FUJIFILM Irvine Scientific, США); подпитка BalanCD CHO Feed 4 (FUJIFILM Irvine Scientific, США); поликлональные крысиные антитела против ASB (anti-ASB, АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); 4-метилумбеллиферилсульфата калиевая соль (Sigma, Япония); крысиные антитела против ASB, конъюгированные с пероксидазой хрена (anti-ASB-HRP, АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); стандарт 4-метилумбеллиферона (Sigma, Япония).

Методы

Получение плазмид с генами, кодирующими арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент. Синтетические последовательности генов *ARSB* и *SUMF1* клонировали в экспрессионные векторы с разными селективными маркерами, как описано авторами ранее [22].

Суспензионное культивирование клеток линии CHO. Клетки линии CHO-K1 были адаптирова-

¹ <https://www.uniprot.org/uniprot/P15848>

² <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8NBK3>

ны к суспензионному культивированию в среде, не содержащей сыворотку или другие компоненты животного происхождения. Использовали ростовую среду BalanCD CHO Growth A (FUJIFILM Irvine Scientific, США). Условия культивирования в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония): 37 °C, влажность более 75%, 5% CO₂.

Определение ростовых характеристик клеточных культур. Жизнеспособность культуры и плотность жизнеспособных клеток (VCD, viable cell density) измеряли с помощью счетчика клеток Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, США); удельную продуктивность (Qp) и кумулятивную клеточную плотность (CCD) рассчитывали, как описано ранее [22, 24].

Получение клонов-продуцентов арилсульфатазы В. Клетки минипула, экспрессирующие фермент ASB, были клонированы методом предельного разведения в ростовой среде BCD в 96-луночных планшетах с концентрацией 5 клеток/мл. Для отслеживания роста клонов клеток использовали систему клеточной визуализации Cell Metric (Solentim, Великобритания). Планшеты с клеточными клонами инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 12 сут в стационарных условиях: 37 °C, 70% влажность, 5% CO₂. Визуализацию и фотодокументирование роста клеточных клонов осуществляли через 4 часа после посева клеток, через 24 ч, 48 ч и далее на 7 и 12 сут роста клонов.

Получение минипулов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент. Клетки линии CHO были трансфицированы двумя плазмидами, кодирующими гены ферментов ASB и FGE (плазмиды вносили в соотношении, равном 90:10%). Трансфицированные клетки высевали в концентрации $5,0 \times 10^4$ клеток/мл в плоскодонные 96-луночные планшеты по 100 мкл/лунку в среде BCD с селективными антибиотиками. Затем проводили скрининг по продуктивности минипулов из 96-луночных планшетов, после чего минипулы с самой высокой продуктивностью переводили в больший объем 6-луночных планшетов. Далее проводили скрининг минипулов из 6-луночных планшетов, после чего переводили минипулы с максимальной продуктивностью в колбы для адаптации роста, как описано авторами ранее [22].

Получение клонов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент. Клетки минипулов, коэкспрессирующих два фермента, ASB и FGE, были клонированы в полутвердую среду ClonaCell Flex (Stemcell, Канада) с посевной концентрацией 10 клеток/мл. Для приготовления полу-

твердой среды для клонирования использовали среду BCD и двухдневную кондиционированную среду исходного минипула. Планшеты с растущими колониями клонов инкубировали 10 сут в условиях CO₂-инкубатора: при 37 °C, 70% влажности и 5% CO₂. Отбор клонов проводили с помощью роботизированной системы Clone Pix FL (Molecular Devices, США).

Криоконсервация клеточных клонов. Клеточную суспензию осаждали центрифугированием при 180 g в течение 5 мин, супернатант удаляли, к осадку клеток добавляли среду BCD с 10% диметилсульфоксидом (Sigma, Япония). Клетки клонов замораживали в концентрации $1,0 \times 10^7$ клеток/мл, после чего помещали криоампулы в сосуд с парами жидкого азота.

Иммуноферментный анализ. Концентрацию ASB в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с применением 96-луночных планшетов с высокой сорбционной способностью MaxiSorp (Thermo Scientific Nunc, Дания). Поликлональные крысиные антитела anti-ASB (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) использовали в качестве сорбирующих антител. Поликлональные крысиные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, anti-ASB-HRP (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) использовали в качестве детектирующих антител. Стандарт — фермент галсульфаза Наглазим (BioMarin, США). Измерения проводили с помощью спектрофотометра Benchmark Plus при 450 нм (Bio-Rad Laboratories, США).

Периодическое культивирование проводили в биореакторе TubeSpin Bioreactor 50 (TPP Techno Plastic Products AG, Швейцария). Посевная концентрация клеток составляла $0,3 \times 10^6$ клеток/мл; в качестве ростовой среды использовали BCD при культивировании в следующих условиях: 5% CO₂, 37 °C, при 200 об/мин на шейкер-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (Kuhner, Германия) [22]. Культивирование продуцентов проводили с добавлением в ростовую среду сульфата меди в концентрации 300 мкМ и/или хлорида кальция в концентрации 300 мкМ. В качестве контроля использовали среду BCD.

Периодическое культивирование с подпиткой проводили в колбах Эрленмейера (Corning, США) в ростовой среде BCD в условиях 5% CO₂, 37 °C, снижая температуру до 30 °C на 6 сут процесса. Для культивирования продуцентов использовали шейкер-инкубатор Multitron (Infors HT, Швейцария) при 150 об/мин. Посевная концентрация клеток: $0,3 \times 10^6$ клеток/мл. Подпитку осуществляли компонентом BalanCD CHO Feed 4 (FUJIFILM Irvine Scientific, США) 3% от объема каждые сутки начиная с 4 сут культивирования. Концентрацию

глюкозы поддерживали на уровне не ниже 3 г/л с 4 сут культивирования до конца процесса. Во время культивирования в ростовую среду добавляли сульфат меди и/или хлорид кальция в различных концентрациях. В качестве контроля использовали среду BCD.

Определение уровня лактата и глюкозы. Для определения уровня лактата и глюкозы в культуральной жидкости использовали анализатор Biosen C-line (EKF-diagnostic GmbH, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Измерение активности арилсульфатазы В. Активность фермента ASB оценивали по способности фермента отщеплять сульфатные остатки от субстрата — 4-метилумбеллиферилсульфата калиевой соли (Sigma, Япония). Единицей активности фермента ASB считали количество фермента, способного катализировать расщепление 1 мкмоль субстрата 4-метилумбеллиферилсульфата калиевой соли при 37 °C, pH 4,9–5,1, в течение 1 мин [22].

Хроматографическая очистка арилсульфатазы В. Для очистки ASB использовали три стадии выделения. На первом этапе целевой белок из культуральной жидкости сорбировали на аффинном сорбенте Con A Sepharose (Cytiva, Швеция). Далее фермент доочищали с помощью металл-хелатной хроматографии с использованием носителя IMAC Sepharose FF (Cytiva, Швеция) с иммобилизованными ионами меди и последующей катионообменной хроматографии с использованием носителя SP Sepharose (Cytiva, Швеция), как описано авторами ранее [22].

Статистическая обработка данных была выполнена с помощью программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA тест) или *t*-критерий Стьюдента. Достоверность отличий обозначали: * $p_{\text{values}} < 0,05$, ** $p_{\text{values}} < 0,01$, *** $p_{\text{values}} < 0,001$, **** $p_{\text{values}} < 0,0001$ или ns — нет статистической разницы. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (SD).

Результаты и обсуждение

Изучение влияния добавления в культуральную среду различных концентраций сульфата меди и хлорида кальция на выход целевого фермента арилсульфатазы В при культивировании минипулов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент

Для повышения продуктивности лидерных минипулов-продуцентов ASB+FGE, полученных авторами ранее [22], проводили изучение влия-

ния добавления в культуральную среду различных концентраций сульфата меди и хлорида кальция. Выбор данных компонентов основан на ранее проведенных исследованиях, а также данных литературы. Известно, что добавление сульфата меди в ростовую среду увеличивает специфическую активность фермента идуронат-2-сульфатазы [18], который относится к подклассу ферментов сульфатаз, так же как изучаемый в работе фермент ASB. Кроме того, описан механизм реакции конверсии цистеина в формилглицин в активном центре ASB с участием фермента FGE, кофактором которого являются ионы Cu^{2+} [19]. О роли ионов Ca^{2+} известно из данных литературы — в структуре как целевого фермента ASB, так и вспомогательного фермента FGE имеются ионы Ca^{2+} [11, 20, 21]. Исходя из описанных данных, нами было выдвинуто предположение о влиянии добавления ионов Ca^{2+} и Cu^{2+} в ростовую среду на продуктивность минипулов-продуцентов ASB+FGE.

Минипулы-продуценты ASB+FGE культивировали в течение 5 сут с добавлением в различных концентрациях как отдельно сульфата меди или хлорида кальция, так и в комбинации данных солей (рис. 1). Минимальная концентрация солей в ростовой среде составляла 30 мкМ, максимальная концентрация — 300–500 мкМ. Следует отметить, что при добавлении в ростовую среду сульфата меди и хлорида кальция как отдельно, так и в комбинации в концентрации 30–50 мкМ статистически значимого увеличения продуктивности клеточной линии не наблюдали. При добавлении в среду культивирования 500 мкМ сульфата меди было отмечено снижение жизнеспособности минипулов-продуцентов ASB+FGE ниже 30% (данные не приведены). Максимальный прирост продуктивности минипула-продуцента ASB+FGE до $55,7 \pm 7,9$ мг/л наблюдали при культивировании в условиях добавления сульфата меди в концентрации 300 мкМ — увеличение продуктивности составило 66% (рис. 1, вариант 1) относительно контрольных условий культивирования без добавления солей (control; продуктивность $33,5 \pm 0,8$ мг/л). Добавление в ростовую среду хлорида кальция в концентрации 300 мкМ приводило к повышению продуктивности до $45,9 \pm 1,5$ мг/л (прирост продуктивности около 37%), однако статистически значимого отличия от контрольных условий в данном случае не выявлено. Следует отметить значительное увеличение выхода фермента ($51,8 \pm 3,4$ мг/л) при условии совместного добавления сульфата меди и хлорида кальция в концентрациях 300 мкМ, при котором наблюдали статистически достоверное увеличение продуктивности на 52% (рис. 1, вариант 3).

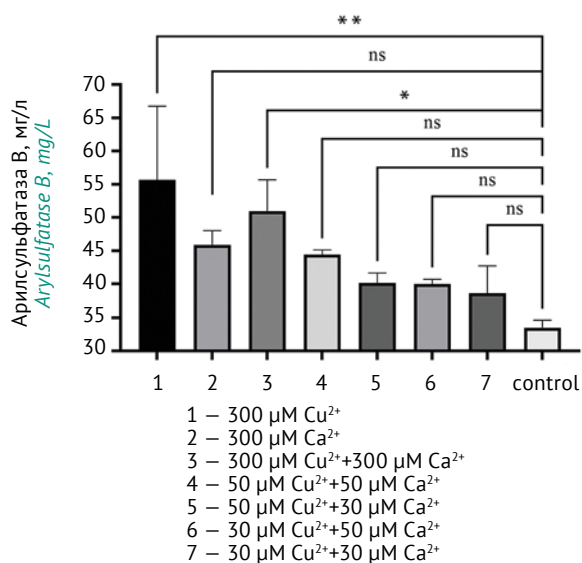


Рис. 1. Продуктивность минипулов-продуцентов ASB+FGE на 5 сут культивирования при различных вариантах добавления сульфата меди и хлорида кальция. В легенде описаны варианты (1–7) культивирования. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. p -values рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля (control) группу ASB+FGE без добавления солей (* $p_{\text{values}} < 0,05$; ** $p_{\text{values}} < 0,01$; ns — нет статистически значимых отличий).

Fig. 1. Productivity of ASB+FGE-expressing mini-pools on culture day 5 with different amounts of added copper sulfate and calcium chloride. The legend describes culture variants (1–7). Data are presented as mean and standard deviation values. p -values are calculated using the one-way ANOVA test with the ASB+FGE group with no added salts as the control (* $p_{\text{values}} < 0.05$; ** $p_{\text{values}} < 0.01$; ns—no statistical difference).

По результатам проведенного эксперимента оптимальным вариантом культивирования минипулов-продуцентов ASB+FGE признано культивирование с добавлением в ростовую среду сульфата меди и хлорида кальция (отдельно и в комбинации) в концентрации 300 мкМ.

Далее в работе проводили получение клонов-продуцентов (клонов-продуцентов ASB и клонов-продуцентов, коэкспрессирующих ASB и FGE), а также изучение влияния добавления в ростовую среду сульфата меди и хлорида кальция на жизнеспособность и продуктивность полученных клонов-продуцентов.

Изучение влияния добавления хлорида кальция и сульфата меди на ростовые и продукционные характеристики панели клонов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент

Для изучения влияния добавления хлорида кальция и сульфата меди на ростовые и продукционные характеристики восьми клонов-продуцентов, коэкспрессирующих ASB и FGE, было

проведено периодическое культивирование в среде с различными вариантами добавок (рис. 2). В качестве контрольных условий использовали ростовую среду BCD.

При добавлении сульфата меди в ростовую среду наблюдали повышение жизнеспособности клонов-продуцентов ASB+FGE (рис. 2A), увеличение клеточной плотности (рис. 2B) и продуктивности клонов (рис. 2C). При этом максимальное значение продуктивности достигало 150 мг/л.

Добавление хлорида кальция как отдельного компонента в ростовую среду привело к повышению жизнеспособности клонов-продуцентов в среднем на 10% на протяжении всего процесса культивирования (рис. 2A, $p_{\text{values}} < 0,05$).

Добавление двух компонентов, сульфата меди и хлорида кальция, в ростовую среду привело к повышению жизнеспособности клонов-продуцентов в среднем на 15% по сравнению с контрольными условиями на протяжении всего процесса культивирования (рис. 2A). Также при добавлении в ростовую среду одновременно двух компонентов наблюдали рост удельной продуктивности клонов-продуцентов ASB+FGE (рис. 2D) до значений $4,58 \pm 1,62$ пг/(клетка×сут) по сравнению с вариантом культивирования в присутствии сульфата меди, $3,62 \pm 0,64$ пг/(клетка×сут). Следует отметить, что максимальное значение удельной продуктивности достигло $9,30$ пг/(клетка×сут) (рис. 2D).

Потребление глюкозы более интенсивно проходило при добавлении сульфата меди (рис. 2E) и как отдельного компонента, и совместно с хлоридом кальция, что связано с высокой клеточной плотностью клонов-продуцентов (рис. 2B). Уровень лактата в культуральной жидкости во всех условиях статистически не различался (рис. 2F).

Таким образом, в результате проведенного эксперимента было продемонстрировано, что добавление в ростовую среду сульфата меди и хлорида кальция положительно влияет на удельную продуктивность клеточных линий и жизнеспособность клонов-продуцентов ASB+FGE. По-видимому, данный эффект объясняется тем, что одновременное добавление в среду (в качестве компонентов) ионов Ca^{2+} и Cu^{2+} , входящих в структуру активных центров целевого и вспомогательного ферментов [11, 16–21], благоприятно влияет на конфигурацию и стабильность ASB.

Исходя из полученных результатов, следующий этап исследований с лидерным клоном-продуцентом в условиях его периодического культивирования с подпиткой проводили с использованием двух вариантов условий культивирования: с добавлением сульфата меди и одновременным добавлением двух компонентов.

Оптимизация условий культивирования лидерного клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, с целью повышения выхода целевого фермента арилсульфатазы В

Для дальнейшей оптимизации процесса культивирования из панели клонов был выбран один лидерный клон-продуцент ASB+FGE, продемонстрировавший наиболее высокий уровень

выхода целевого фермента и способность достигать высоких клеточных плотностей. Рост клон-продуцента проводили при периодическом культивировании с подпиткой длительно-стью 12 сут в трех вариантах условий: в ростовой среде (контроль); с добавлением сульфата меди в концентрации 300 мкМ; с одновременным добавлением сульфата меди в концентрации 300 мкМ и хлорида кальция в концентрации 300 мкМ (рис. 3).

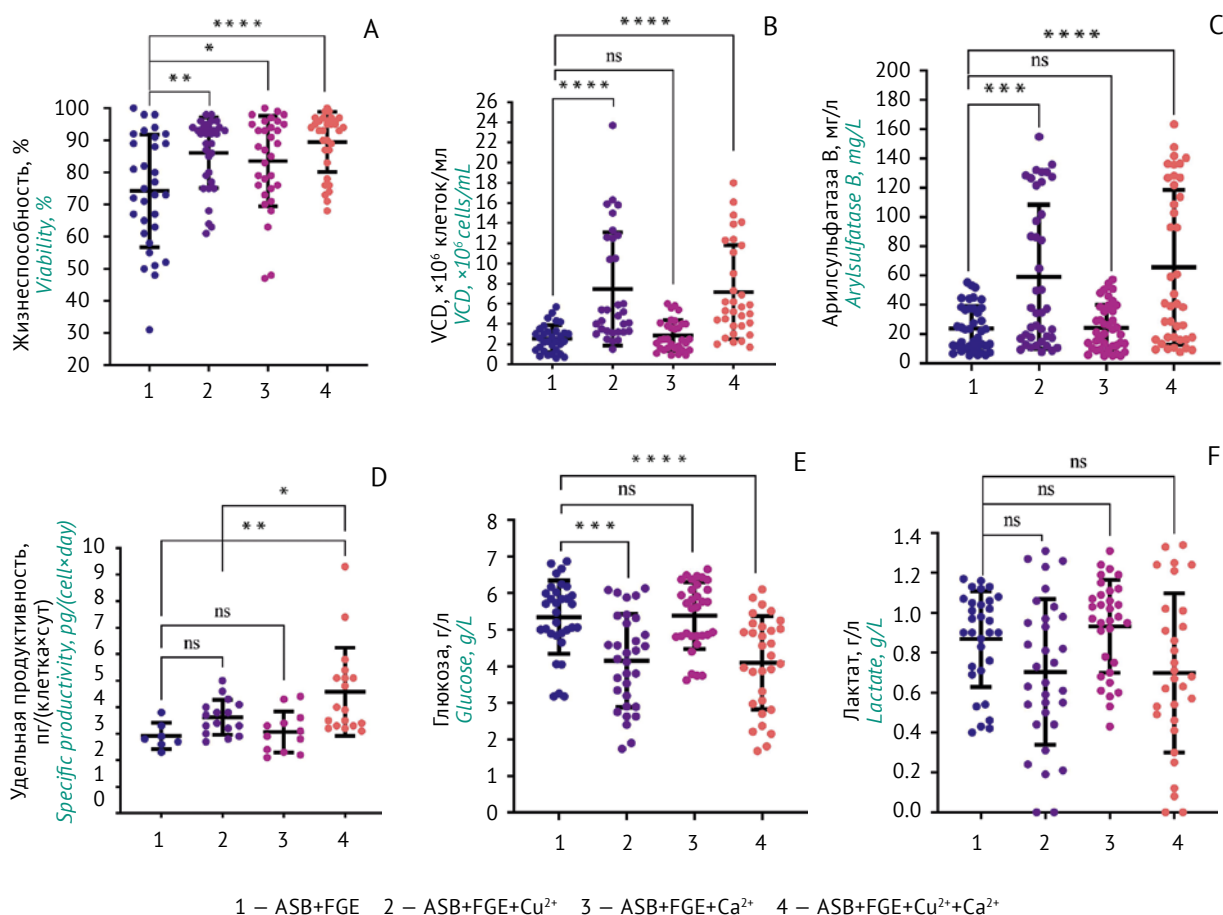


Рис. 2. Характеристики восьми клонов-продуцентов, коэкспрессирующих ферменты ASB и FGE, в процессе периодического культивирования на 4–7 сут. А – жизнеспособность клеток; В – плотность жизнеспособных клеток, VCD; С – продуктивность; D – удельная продуктивность клеток; Е – концентрация глюкозы; F – концентрация лактата. Обозначения на рисунке: ASB+FGE – клоны-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE, культивируемые на среде BCD; ASB+FGE+Cu²⁺ – клоны-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE, культивируемые на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+FGE+Ca²⁺ – клоны-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE, культивируемые на среде BCD с добавлением хлорида кальция; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺ – клоны-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB+FGE, культивируемые на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. p_{values} рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB+FGE (* $p_{\text{values}} < 0,05$, ** $p_{\text{values}} < 0,01$, *** $p_{\text{values}} < 0,001$, **** $p_{\text{values}} < 0,0001$; ns – нет статистически значимых отличий). Точками обозначены значения показателей для 8 клонов на каждые сутки культивирования с 4 по 7 сут.

Fig. 2. Characteristics of 8 producer clones coexpressing ASB and FGE enzymes on days 4–7 of batch culture. A—cell viability; B—viable cell density, VCD; C—volumetric productivity; D—specific productivity; E—glucose concentration; F—lactate concentration. Abbreviations: ASB+FGE—producer clones coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD; ASB+FGE+Cu²⁺—producer clones coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD with copper sulfate; ASB+FGE+Ca²⁺—producer clones coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD with calcium chloride; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺—producer clones coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD with copper sulfate and calcium chloride. Data are presented as mean and standard deviation values. p_{values} are calculated using the one-way ANOVA test with the ASB+FGE group as the control (* $p_{\text{values}} < 0.05$, ** $p_{\text{values}} < 0.01$, *** $p_{\text{values}} < 0.001$, **** $p_{\text{values}} < 0.0001$; ns—no statistical difference). Dots indicate test values observed for 8 clones on each culture day (days 4 to 7).

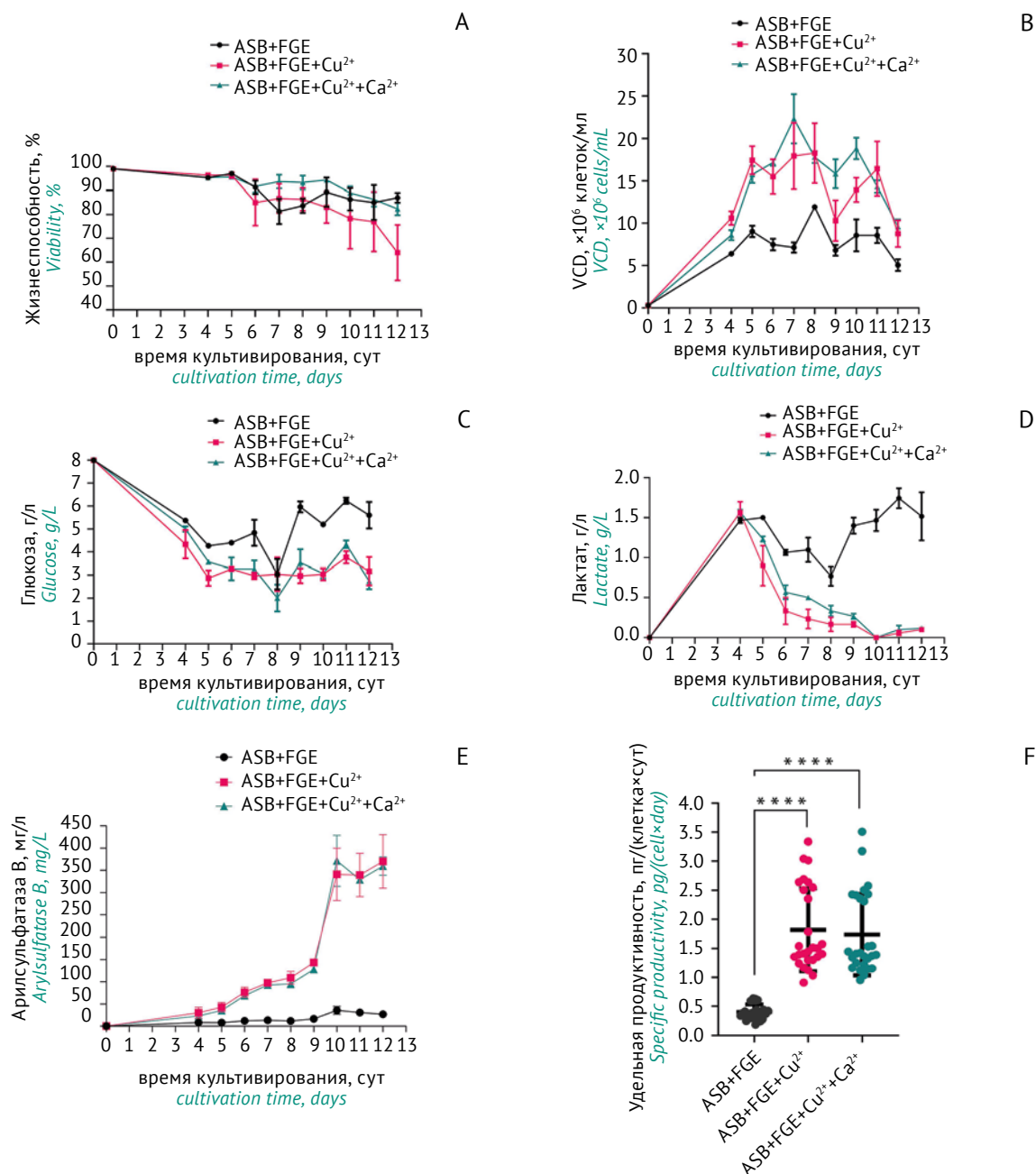


Рис. 3. Характеристики лидерного клон, коэкспрессирующего ферменты ASB и FGE в процессе периодического культивирования с подпиткой, и активность очищенного препарата ASB. А – жизнеспособность клеток; В – плотность жизнеспособных клеток, VCD; С – концентрация глюкозы; D – концентрация лактата; E – продуктивность клон; F – удельная продуктивность клеток с 4 по 12 сут. Обозначения на рисунке: ASB+FGE – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемые на среде BCD; ASB+FGE+Cu²⁺ – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺ – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. p_{values} рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA; в качестве контроля использовали группу ASB+FGE (**** $p_{\text{values}} < 0,0001$). Точками обозначены значения удельной продуктивности клонов с 4 по 12 сут культивирования в трех повторях.

Fig. 3. Characteristics of the lead clone coexpressing ASB and FGE enzymes during fed-batch culture and the specific enzyme activity of the purified ASB preparation. A – cell viability; B – viable cell density, VCD; C – glucose concentration; D – lactate concentration; E – volumetric productivity; F – specific productivity of the cells on days 4 to 12 of fed-batch culture. Abbreviations: ASB+FGE – producer clones coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD; ASB+FGE+Cu²⁺ – producer clone coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD with copper sulfate; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺ – producer clone coexpressing ASB and FGE, cultivated in BCD with copper sulfate and calcium chloride. Data are presented as mean and standard deviation values. p_{values} are calculated using the one-way ANOVA test with the ASB+FGE group as the control (**** $p_{\text{values}} < 0.0001$). Dots indicate specific productivity values observed for the clones on culture days 4–12; the experiment was conducted in triplicate.

В условиях культивирования с одновременным добавлением сульфата меди и хлорида кальция наблюдали высокую жизнеспособность на протяжении всего периода культивирования, которая составляла более 80% (рис. 3A).

При добавлении сульфата меди и/или одновременно двух компонентов солей наблюдали увеличение плотности жизнеспособных клеток до $\sim(16,55 \pm 2,29) \times 10^6$ клеток/мл (рис. 3B). Ранее было показано, что добавление хлорида кальция не способствует росту плотности жизнеспособных клеток, поэтому можно сделать вывод, что на увеличение плотности жизнеспособных клеток влияет добавление ионов меди в ростовую среду. Возможным объяснением данного эффекта является то, что добавление ионов меди в ростовую среду влияет на активность вспомогательного FGE фермента [16–19], способствуя биосинтезу сверхэкспрессированной лизосомальной сульфатазы ASB, обеспечивая правильный фолдинг и последующую секрецию в культуральную жидкость (рис. 3B, ASB+FGE+Cu²⁺/ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺). Вероятно, поэтому можно наблюдать низкую плотность жизнеспособных клеток $\sim(8,40 \pm 1,84) \times 10^6$ при культивировании в контрольных условиях, где, возможно, ASB с неправильным фолдингом накапливается в эндоплазматическом ретикулуме и/или цитоплазме и, как следствие, оказывает токсическое действие на клетку (рис. 4B, ASB+FGE) [25].

Как правило, потребление глюкозы и накопление лактата в культуральной жидкости являются показателями метаболической активности клеток [26, 27]. Чаще всего накопление лактата в культуральной жидкости приводит к ингибированию роста клеток и, как следствие, снижению продукции целевого белка [28]. Однако существует метаболический процесс, при котором клетки клона начинают одновременно потреблять и лактат, и глюкозу [29]. Для промышленных процессов периодического культивирования такие клоны-продуценты являются более предпочтительными, так как в данном случае происходит более эффективное потребление питательных веществ и достигается высокий выход продукта за счет увеличения длительности процесса культивирования и высоких клеточных плотностей. Помимо вышеперечисленного, в ряде работ показано, что добавление в ростовую среду сульфата меди способствует увеличению выхода продукта, плотности жизнеспособных клеток и жизнеспособности культуры за счет снижения уровня белков клеточного стресса [30]. В ходе проведенного исследования было обнаружено, что лидерный клон-продуцент ASB+FGE с добавлением в ростовую

среду двух компонентов активно потреблял одновременно и глюкозу, и лактат в стационарной фазе процесса культивирования (рис. 3C, 4D), в то время как этот же клон-продуцент без добавления компонентов был не способен утилизировать лактат, который накапливается в культуральной жидкости во время культивирования (рис. 3C).

Кроме того, было показано, что добавление в ростовую среду сульфата меди привело к повышению продуктивности и удельной продуктивности клона-продуцента ASB+FGE в сравнении с контрольными условиями в среднем с $31,04 \pm 7,05$ до $350,20 \pm 48,19$ мг/л и с $0,41 \pm 0,13$ до $1,82 \pm 0,70$ пг/(клетка×сут) соответственно (рис. 3E, 3F). Следует отметить, что максимальное значение продуктивности лидерного клона-продуцента достигало 420 мг/л, а максимальное значение удельной продуктивности — $3,50$ пг/(клетка×сут).

Изучение влияния сульфата меди и хлорида кальция на продуктивность, ростовые характеристики и метаболизм клон-продуцента арилсульфатазы B

Культивирование клон-продуцента ASB проводили в режиме периодического культивирования в трех вариантах условий: в стандартной ростовой среде (контроль); с добавлением сульфата меди в концентрации 300 мкМ; с одновременным добавлением сульфата меди в концентрации 300 мкМ и хлорида кальция в концентрации 300 мкМ (рис. 4).

Во всех трех вариантах условий культивирования не наблюдалось изменения ростовых характеристик клон-продуцента ASB на протяжении процесса культивирования. Жизнеспособность клеток клон-продуцента снижалась на 7 сут процесса (рис. 4A), максимальная плотность жизнеспособных клеток (показатель VCD) на 6 сут культивирования достигала около $(13,0 \pm 1,51) \times 10^6$ клеток/мл (рис. 4C). Временные зависимости уровней глюкозы и лактата представлены на рисунке 4B и 4D.

Несмотря на схожие ростовые характеристики клон-продуцента ASB в разных условиях культивирования, было выявлено трехкратное увеличение продуктивности клеточной линии с $1,93 \pm 0,27$ до $6,77 \pm 1,01$ мг/л (рис. 4E) и повышение удельной продуктивности клеток с $0,04 \pm 0,01$ до $0,13 \pm 0,01$ пг/(клетка×сут) при добавлении в ростовую среду сульфата меди (рис. 4F).

При добавлении двух компонентов активность ASB в культуральной жидкости в среднем составила $0,047 \pm 0,009$ ЕД/мл, что выше

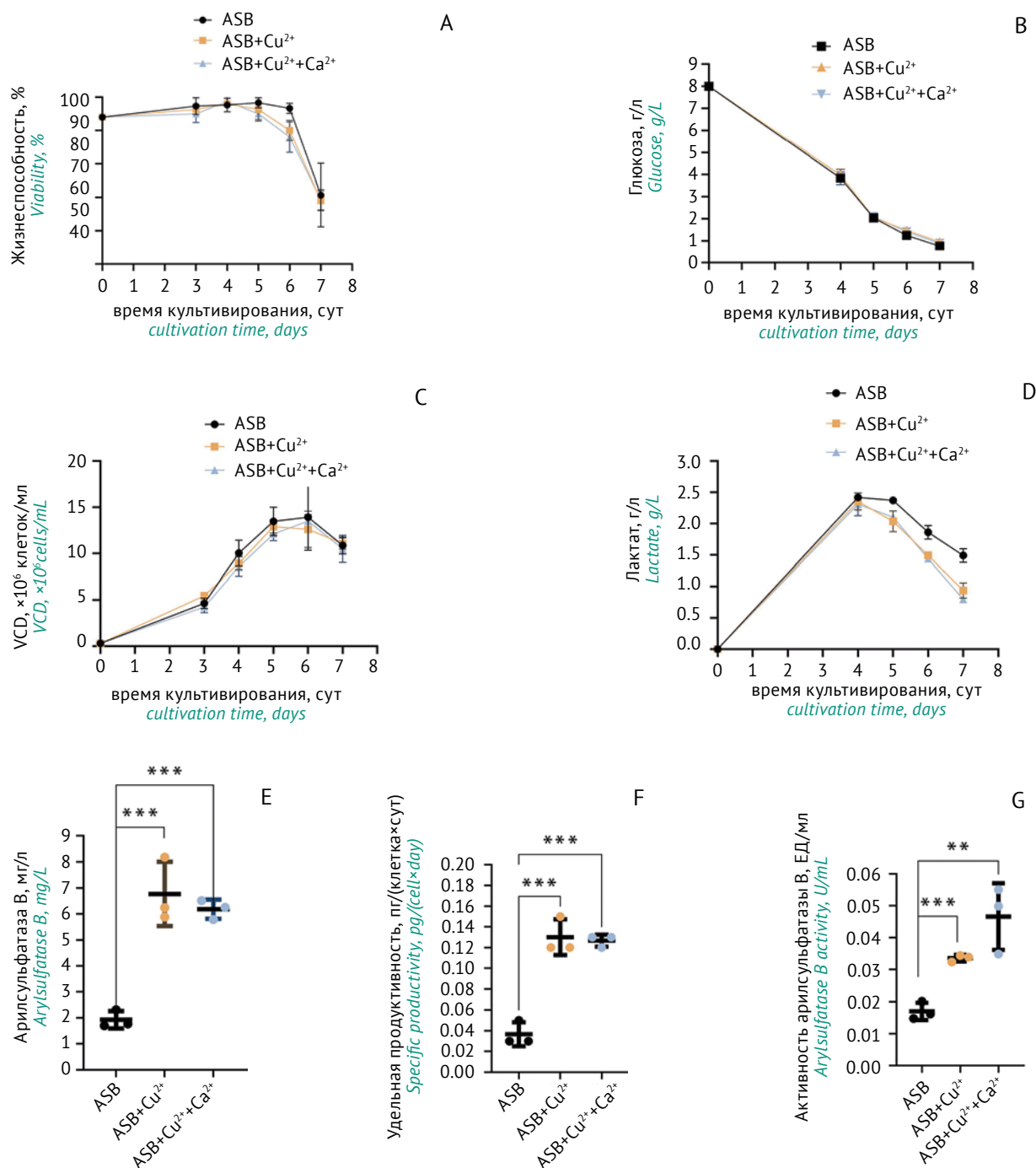


Рис. 4. Характеристики клон-продуцента ASB в процессе периодического культивирования. А — жизнеспособность клеток; В — плотность жизнеспособных клеток, VCD; С — концентрация глюкозы; D — концентрация лактата; E — продуктивность; F — удельная продуктивность клеток; G — активность ASB в культуральной жидкости. Обозначения на рисунке: ASB — клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD; ASB+Cu²⁺ — клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+Cu²⁺+Ca²⁺ — клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. p_{values} рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB (** $p_{\text{values}} < 0,01$, *** $p_{\text{values}} < 0,001$). Точками обозначены значения исследуемых показателей в трех повторях.

Fig. 4. Characteristics of the ASB-producing clone during batch culture. A—cell viability; B—viable cell density, VCD; C—glucose concentration; D—lactate concentration; E—volumetric productivity; F—specific productivity; G—ASB activity in the culture medium. Abbreviations: ASB—ASB-producing clone cultivated in BCD; ASB+Cu²⁺—ASB-producing clone cultivated in BCD with copper sulfate; ASB+Cu²⁺+Ca²⁺—ASB-producing clone cultivated in BCD with copper sulfate and calcium chloride. Data are presented as mean and standard deviation values. p_{values} are calculated using the one-way ANOVA test with the ASB group as the control (** $p_{\text{values}} < 0.01$, *** $p_{\text{values}} < 0.001$). Dots indicate test values observed; the experiment was conducted in triplicate.

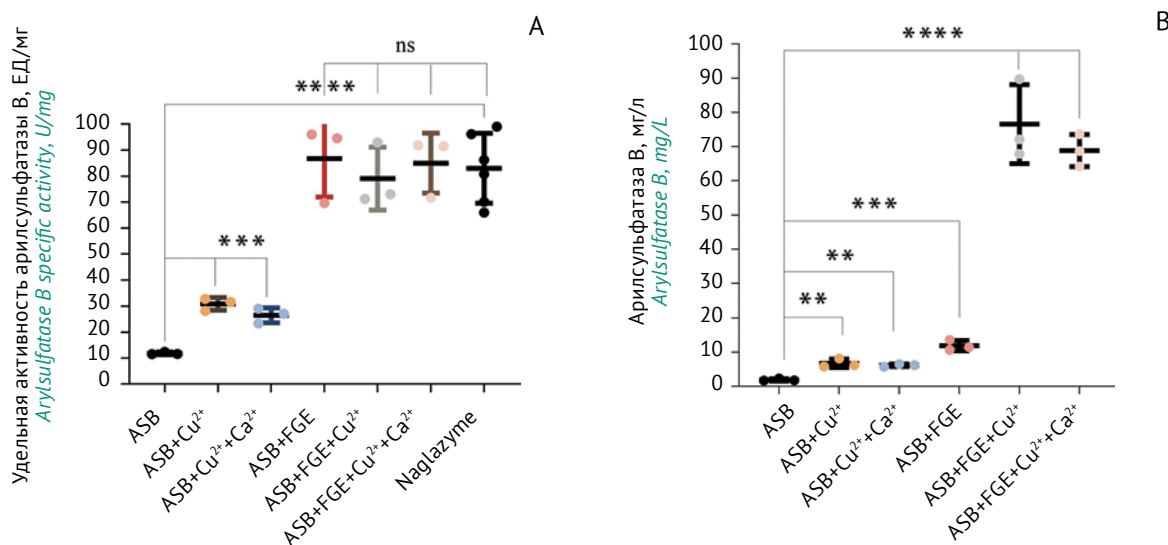


Рис. 5. Удельная активность очищенного препарата ASB и продуктивность клонов. А – удельная активность фермента ASB после хроматографической очистки; В – продуктивность на 6 сут процесса культивирования. Обозначения на рисунке: ASB – клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD; ASB+Cu²⁺ – клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+Cu²⁺+Ca²⁺ – клон-продуцент ASB, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция; ASB+FGE – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD; ASB+FGE+Cu²⁺ – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺ – клон-продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB+FGE, культивируемый на среде BCD с добавлением сульфата меди и хлорида кальция; Naglazyme – препарат галсульфазы Наглазим. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. p_{values} рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA; в качестве контроля использовали условие ASB (** $p_{\text{values}} < 0,01$, *** $p_{\text{values}} < 0,001$, **** $p_{\text{values}} < 0,0001$; ns – нет статистической разницы). Точками обозначены значения исследуемых показателей клонов в трех повторях.

Fig. 5. Specific activity of the purified ASB preparation and productivity of clones. A—specific activity of ASB after chromatographic purification; B—productivity on culture day 6. Abbreviations: ASB—ASB-producing clone cultivated in BCD; ASB+Cu²⁺—ASB-producing clone cultivated in BCD with copper sulfate; ASB+Cu²⁺+Ca²⁺—ASB-producing clone cultivated in BCD with copper sulfate and calcium chloride; ASB+FGE—producer clone coexpressing ASB and FGE enzymes, cultivated in BCD; ASB+FGE+Cu²⁺—producer clone coexpressing ASB and FGE enzymes, cultivated in BCD with copper sulfate; ASB+FGE+Cu²⁺+Ca²⁺—producer clone coexpressing ASB and FGE enzymes, cultivated in BCD with copper sulfate and calcium chloride; Naglazyme—galsulfase medicinal product. Data are presented as mean and standard deviation values. p_{values} are calculated using the one-way ANOVA test with the ASB group as the control (** $p_{\text{values}} < 0.01$, *** $p_{\text{values}} < 0.001$, **** $p_{\text{values}} < 0.0001$; ns—no statistical difference). Dots indicate test values observed for the clones; the experiment was conducted in triplicate.

в 2,7 раза в сравнении с контрольными условиями – $0,017 \pm 0,002$ ЕД/мл (рис. 4Г).

Было показано, что добавление в ростовую среду сульфата меди и одновременное добавление сульфата меди и хлорида кальция в концентрации 300 мкМ приводит к повышению продуктивности и активности фермента клон-продуцента, экспрессирующего один фермент ASB. Полученные результаты соотносятся с известными данными литературы [9, 11, 18, 19].

Изучение активности фермента арилсульфатазы В и продуктивности клон-продуцента арилсульфатазы В и клон-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент

На рисунке 5А представлены данные активности очищенного препарата фермента ASB, полученного при культивировании клон-про-

дуцента ASB и клон-продуцента ASB+FGE. Удельная активность хроматографически очищенного препарата ASB, полученного в условиях периодического культивирования клон-продуцента ASB без добавления солей металлов, в среднем составляла около $11,85 \pm 0,42$ ЕД/мг (рис. 5А, ASB). Добавление сульфата меди увеличивало активность фермента приблизительно в 3 раза до $30,85 \pm 1,96$ ЕД/мг (рис. 5А, ASB+Cu²⁺). Благодаря коэкспрессии ферментов ASB и FGE удалось значительно повысить удельную активность ASB до 70–90 ЕД/мг (рис. 5А); активность полученного фермента ASB в этом случае соответствовала активности коммерчески доступного препарата сравнения Наглазим.

Таким образом, описанные результаты свидетельствуют о том, что значительный вклад в увеличение активности фермента ASB достигается за счет модификации клеточной линии вспомогательным ферментом FGE.

На рисунке 5В представлены данные продуктивности клона ASB и клона ASB+FGE на 6 сут культивирования продуцентов. Продemonстрировано, что наибольшее увеличение выхода целевого фермента ASB достигалось при добавлении в ростовую среду при культивировании клона-продуцента, модифицированного ферментом FGE, сульфата меди в концентрации 300 мкМ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что значительное увеличение выхода целевого фермента ASB достигается за счет следующих факторов: влияние на активный центр целевого фермента ASB (модификация клеточной линии путем коэкспрессии фермента FGE приводит к достижению стабильной высокой активности ASB и увеличению продуктивности клона-продуцента) и влияние на активный центр вспомогательного фермента FGE (добавление в ростовую среду сульфата меди приводит к дополнительному увеличению продуктивности целевого фермента ASB).

Таким образом, в экспериментальной работе выявлены критические факторы, влияющие на выход рекомбинантного фермента ASB. Разработанная технология получения и культивирования клона-продуцента ASB+FGE может быть использована при наработке фермента для проведения доклинических и клинических исследований.

Выводы

1. Получены моноклональные клоны-продуценты, коэкспрессирующие арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, на основе суспензионной линии клеток CHO

Литература/References

1. Remondino RG, Tello CA, Noel M, Wilson AF, Galarretto E, Bersusky E, Piantoni L. Clinical manifestations and surgical management of spinal lesions in patients with mucopolysaccharidosis: a report of 52 cases. *Spine Deform.* 2019;7(2):298–303. <https://doi.org/10.1016/j.jsdpd.2018.07.005>
2. Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and degradation of glycans of the extracellular matrix: sulfated glycosaminoglycans, hyaluronan, and matriglycan. In: Barchi JJ, ed. *Comprehensive Glycoscience*. 2nd ed. Elsevier B.V.; 2021. P. 29–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819475-1.00018-3>
3. Mehta A, Winchester B, eds. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide*. John Wiley & Sons, Ltd.; 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118514672>
4. Harmatz P, Hendriksz CJ, Lampe C, McGill JJ, Parini R, Leão-Teles E, et al. The effect of galsulfase enzyme replacement therapy on the growth of patients with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Mol Genet Metab.* 2017;122(1–2):107–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.03.008>
5. Garcia P, Phillips D, Johnson J, Martin K, Randolph LM, Rosenfeld H, Harmatz P. Long-term outcomes of patients with mucopolysaccharidosis VI treated with galsulfase enzyme replacement therapy since infancy. *Mol Genet Metab.* 2021;133(1):100–8. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.03.006>
6. de Ruijter J, de Ru MH, Wagemans T, Ijlst L, Lund AM, Orchard PJ, et al. Heparan sulfate and dermatan sulfate derived disaccharides are sensitive markers for newborn screening for mucopolysaccharidoses types I, II and III. *Mol Genet Metab.* 2012;107(4):705–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.09.024>
7. Baenziger JU. A major step on the road to understanding a unique posttranslational modification and its role in a genetic disease. *Cell.* 2003;113(4):421–2. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00354-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00354-4)
8. Peng J, Alam S, Radhakrishnan K, Mariappan M, Rudolph MG, May C, et al. Eukaryotic formylglycine-generating enzyme catalyses a monooxygenase type of reaction. *FEBS J.* 2015;282(17):3262–74. <https://doi.org/10.1111/febs.13347>

без использования белков животного происхождения.

2. Подобрана оптимальная концентрация сульфата меди и хлорида кальция, которая позволяет увеличить выход целевого фермента арилсульфатазы В (для клона-продуцента арилсульфатазы В и клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент).
3. При периодическом культивировании клонов-продуцентов, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, при одновременном добавлении сульфата меди и хлорида кальция в концентрации 300 мкМ показано увеличение жизнеспособности культур (клонов) и повышение удельной продуктивности клеток в среднем до $4,58 \pm 1,62$ пг/(клетка×сут).
4. Разработана технология суспензионного культивирования лидерного клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, позволяющая достигать выхода активного целевого фермента арилсульфатазы В до 420 мг/л в условиях периодического культивирования с подпиткой длительностью 12 суток при добавлении в среду сульфата меди в концентрации 300 мкМ.
5. Разработанные условия культивирования для клона-продуцента, коэкспрессирующего арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, могут быть использованы для наработки рекомбинантной арилсульфатазы В для проведения доклинических и клинических исследований.

9. Appel MJ, Bertozzi CR. Formylglycine, a post-translationally generated residue with unique catalytic capabilities and biotechnology applications. *ACS Chem Biol.* 2015;10(1):72–84. <https://doi.org/10.1021/cb500897w>
10. Dierks T, Miech C, Hummerjohann J, Schmidt B, Kertesz MA, von Figura K. Posttranslational formation of formylglycine in prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine. *J Biol Chem.* 1998;273(40):25560–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25560>
11. Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ, Hopwood JJ, Guss JM. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure.* 1997;5(2):277–89. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(97\)00185-8](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00185-8)
12. Dierks T, Dickmanns A, Preusser-Kunze A, Schmidt B, Mariappan M, von Figura K, et al. Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. *Cell.* 2005;121(4):541–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.001>
13. Dickmanns A, Schmidt B, Rudolph MG, Mariappan M, Dierks T, von Figura K, Ficner R. Crystal structure of human pFGE, the paralog of the Calpha-formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem.* 2005;280(15):15180–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414317200>
14. Mariappan M, Preusser-Kunze A, Balleininger M, Eisel N, Schmidt B, Gande SL, et al. Expression, localization, structural, and functional characterization of pFGE, the paralog of the Cα-formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem.* 2005;280(15):15173–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413698200>
15. Ghosh D. Three-dimensional structures of sulfatases. *Methods Enzymol.* 2005;400:273–93. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)00016-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)00016-9)
16. Holder PG, Jones LC, Drake PM, Barfield RM, Bañas S, de Hart GW, et al. Reconstitution of formylglycine-generating enzyme with copper(II) for aldehyde tag conversion. *J Biol Chem.* 2015;290(25):15730–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652669>
17. Appel MJ, Meier KK, Lafrance-Vanasse J, Lim H, Tsai CL, Hedman B, et al. Formylglycine-generating enzyme binds substrate directly at a mononuclear Cu(I) center to initiate O₂ activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(12):5370–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818274116>
18. York D, Baker J, Holder PG, Jones LC, Drake PM, Barfield RM, et al. Generating aldehyde-tagged antibodies with high titers and high formylglycine yields by supplementing culture media with copper(II). *BMC Biotechnol.* 2016;16:23. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0254-0>
19. Knop M, Dang TQ, Jeschke G, Seebeck FP. Copper is a cofactor of the formylglycine-generating enzyme. *Chembiochem.* 2017;18(2):161–5. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600359>
20. Roeser D, Preusser-Kunze A, Schmidt B, Gasow K, Wittmann JG, Dierks T, et al. A general binding mechanism for all human sulfatases by the formylglycine-generating enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(1):81–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507592102>
21. Schlotawa L, Wachs M, Bernhard O, Mayer FJ, Dierks T, Schmidt B, Radhakrishnan K. Recognition and ER quality control of misfolded formylglycine-generating enzyme by protein disulfide isomerase. *Cell Rep.* 2018;24(1):27–37.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.016>
22. Тимонова СС, Смолова КА, Зарипова ДТ, Пантюшенко МС, Королева МА, Анисимов РЛ и др. Увеличение продуктивности клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилглицин-генерирующего фермента. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(1):80–93. [Timonova SS, Smolova KA, Zaripova DT, Pantyushenko MS, Koroleva MA, Anisimov RL, et al. Increasing productivity of arylsulfatase B-producing cell line by coexpression of formylglycine-generating enzyme. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2022;22(1):80–93 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-80-93>
23. Тимонова СС, Пантюшенко МС, Тихонов РВ, Пискунов АА, Бадэ ВН. Оптимизация процесса культивирования клона-продуцента рекомбинантного лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы. *Биотехнология.* 2021;37(2):34–47. [Timonova SS, Pantyushenko MS, Tikhonov RV, Piskunov AA, Bade VN. Optimization of the cultivation process of a producer clone of the recombinant lysosomal iduronate-2-sulfatase enzyme. *Biotechnologiya = Biotechnology.* 2021;37(2):34–47 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-2-34-47>
24. Muralidharan-Chari V, Wurz Z, Doyle F, Henry M, Diendorfer A, Tenenbaum SA, et al. PTSelect™: a post-transcriptional technology that enables rapid establishment of stable CHO cell lines and surveillance of clonal variation. *J Biotechnol.* 2021;325:360–71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.09.025>
25. Christianson TM, Starr CM, Zankel TC. Overexpression of inactive arylsulphatase mutants and *in vitro* activation by light-dependent oxidation with vanadate. *Biochem J.* 2004;382(2):581–7. <https://doi.org/10.1042/BJ20040447>
26. Gupta SK, Srivastava SK, Sharma A, Nalage VHH, Salvi D, Kushwaha H, et al. Metabolic engineering of CHO cells for the development of a robust protein production platform. *PLoS One.* 2017;12(8):e0181455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181455>
27. Mulukutla BC, Yongky A, Le T, Mashek DG, Hu WS. Regulation of glucose metabolism – a perspective from cell bioprocessing. *Trends Biotechnol.* 2016;34(8):638–51. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.012>
28. Tsao YS, Cardoso AG, Condon RG, Voloch M, Lio P, Lagos JC, et al. Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *J Biotechnol.* 2005;118(3):316–27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.016>
29. Martínez-Monge I, Comas P, Triquell J, Casablanco A, Lecina M, Paredes CJ, Cairó JJ. Concomi-

tant consumption of glucose and lactate: a novel batch production process for CHO cells. *Biochem Eng J.* 2019;151:107358. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107358>

30. Qian Y, Khattak SF, Xing Z, He A, Kayne PS, Qian NX, et al. Cell culture and gene transcription effects of copper sulfate on Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog.* 2011;27(4):1190–4. <https://doi.org/10.1002/btpr.630>

Вклад авторов. С.С. Тимонова — получение клеточных линий, проведение исследования, анализ данных, измерение активности ферментов, написание рукописи; К.А. Смолова — разработка метода очистки фермента; И.А. Кирик — редактирование текста рукописи; М.С. Пантюшенко — разработка ИФА и методов измерения активности ферментов; Р.Л. Анисимов — работы по молекулярной биологии, дизайн плазмид; Р.А. Хамитов — определение основного направления исследований; А.А. Пискунов — критическое обсуждение текста рукописи; В.Н. Бадэ — планирование исследования, анализ данных, доработка текста рукописи.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках разработки биотехнологического препарата против мукополисахаридоза VI типа в АО «ГЕНЕРИУМ». Авторы выражают признательность коллегам, которые оказывали помощь в выполнении исследования.

Конфликт интересов. Р.А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contributions. S.S. Timonova—development of cell lines, conducting of the study, analysis of data, measurements of enzyme activity, writing of the manuscript; K.A. Smolova—development of the enzyme purification procedure; I.A. Kirik—editing of the text of the manuscript; M.S. Pantyushenko—development of ELISA and enzyme activity assays; R.L. Anisimov—application of molecular biology techniques, design of plasmids; R.A. Khamitov—determination of the main study direction; A.A. Piskunov—critical revision of the text of the manuscript; V.N. Bade—planning of the study, analysis of data, finalisation of the text of the manuscript.

Acknowledgements. This study was carried out as part of the development of a biotechnological product against mucopolysaccharidosis type VI at GENERIUM JSC. The authors express their gratitude to the colleagues who assisted in the study.

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

Об авторах / Authors

Тимонова Софья Сергеевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2733-7458>
timonova1993@yandex.ru

Смолова Ксения Александровна, канд. хим. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9135-9673>
Smolova@ibcgenerium.ru

Кирик Инесса Анатольевна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0364-8107>
Kirik@ibcgenerium.ru

Пантюшенко Марина Семеновна, канд. биол. наук. Pantyushenko@ibcgenerium.ru

Анисимов Роман Львович, канд. биол. наук. Anisimov@ibcgenerium.ru

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>
Khamitov@ibcgenerium.ru

Пискунов Александр Александрович, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-5419>
Piskunov@ibcgenerium.ru

Бадэ Вероника Николаевна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9877-5220>
Bade@ibcgenerium.ru

Sofia S. Timonova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2733-7458>
timonova1993@yandex.ru

Kseniya A. Smolova, Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9135-9673>
Smolova@ibcgenerium.ru

Inessa A. Kirik, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0364-8107>
Kirik@ibcgenerium.ru

Marina S. Pantyushenko, Cand. Sci. (Biol.). Pantyushenko@ibcgenerium.ru

Roman L. Anisimov, Cand. Sci. (Biol.). Anisimov@ibcgenerium.ru

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>
Khamitov@ibcgenerium.ru

Aleksandr A. Piskunov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-5419>
Piskunov@ibcgenerium.ru

Veronika N. Bade, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9877-5220>
Bade@ibcgenerium.ru

Поступила 09.03.2022

После доработки 03.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Received 9 March 2022

Revised 3 August 2022

Accepted 26 August 2022

УДК 616.5:616-001.4

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-293-307>

Научная статья | Scientific article



Ранозаживляющее и противовоспалительное действие рекомбинантного ангиогенина человека

А.Е. Гуляев¹, З.Т. Шульгау¹, Ш.Д. Сергазы^{1,2}, Н.В. Юрина³, А.М. Горячкин⁴,
С.С. Богачев⁵, А.С. Проскурина^{5,✉}

¹ РГП «Национальный центр биотехнологии», Кургальжинское шоссе, д. 13/5, г. Нур-Султан, 010000, Республика Казахстан

² Частное учреждение "National Laboratory Astana", Назарбаев Университет, просп. Кабанбай Батыра, д. 53, г. Нур-Султан, 010000, Республика Казахстан

³ Автономная некоммерческая организация «Региональный центр высоких медицинских технологий», ул. Фрунзе, д. 71/1, г. Новосибирск, 630112, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красный просп., д. 52, г. Новосибирск, 630091, Российская Федерация

⁵ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», просп. Академика Лаврентьева, д. 10, г. Новосибирск, 630090, Российская Федерация

✉ Проскурина Анастасия Сергеевна; labmolbiol@mail.ru

Резюме

Создание новых эффективных ранозаживляющих средств является актуальной задачей современной клинической фармакологии. Одним из перспективных направлений представляется разработка препаратов для стимуляции ангиогенеза, который является критическим этапом процесса заживления ран. **Цель работы:** оценить ранозаживляющее действие препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека в виде геля на различных экспериментальных моделях. **Материалы и методы:** в качестве экспериментальных животных использовали белых беспородных крыс-самцов. Исследовано ранозаживляющее действие препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека (0,0025%) в виде геля относительно препарата сравнения на моделях плоскостной кожно-мышечной, линейной и ожоговой раны. Ранозаживляющее действие исследуемого препарата при лечении длительно незаживающей раны охарактеризовано на модели аллоксанового сахарного диабета. На модели адьювантного артрита оценено противовоспалительное действие препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека относительно препарата сравнения. **Результаты:** установлена более высокая ранозаживляющая активность препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека относительно препарата сравнения (гель Солкосерил) для плоскостной кожно-мышечной раны, линейной и ожоговой ран. При применении исследуемого препарата ускоряется процесс репарации тканей при лечении длительно незаживающей раны на модели аллоксанового сахарного диабета. Отмечено более быстрое расплавление некротических масс и переход к эпителизации краев раны. Установлена противовоспалительная активность препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека, по эффективности сравнимая с действием препарата сравнения (гель Диклофенак). **Выводы:** определено наличие у препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека в виде геля выраженных ранозаживляющих и противовоспалительных свойств, сопоставимых с препаратами сравнения.

© А.Е. Гуляев, З.Т. Шульгау, Ш.Д. Сергазы, Н.В. Юрина, А.М. Горячкин, С.С. Богачев, А.С. Проскурина, 2022

Ключевые слова: плоскостная кожно-мышечная рана; линейная рана; ожоговая рана; аллоксановый сахарный диабет; адъювантный артрит; противовоспалительное средство; рекомбинантный ангиогенин человека

Для цитирования: Гуляев А.Е., Шульгау З.Т., Сергазы Ш.Д., Юрина Н.В., Горячкин А.М., Богачев С.С., Проскурина А.С. Ранозаживляющее и противовоспалительное действие рекомбинантного ангиогенина человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):293–307. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-293-307>

Wound healing and anti-inflammatory effects of recombinant human angiogenin

A.E. Gulyayev¹, Z.T. Shulgau¹, Sh.D. Sergazy^{1,2}, N.V. Yurina³, A.M. Goryachkin⁴, S.S. Bogachev⁵, A.S. Proskurina^{5,✉}

¹ National Center for Biotechnology, 13/5 Kurgalzhynskoye Rd, Nur-Sultan 010000, Republic of Kazakhstan

² National Laboratory Astana, Nazarbayev University, 53 Kabanbay batyr Ave, Nur-Sultan 010000, Republic of Kazakhstan

³ Regional Center for High Medical Technologies, 71/1 Frunze St., Novosibirsk 630112, Russian Federation

⁴ Novosibirsk State Medical University, 52 Krasnyj Ave, Novosibirsk 630091, Russian Federation

⁵ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Academician Lavrentiev Ave, Novosibirsk 630090, Russian Federation

✉ Anastasia S. Proskurina; labmolbiol@mail.ru

Abstract

New effective wound healing agents are a priority for modern clinical pharmacology. A promising approach would be to develop medicinal products that promote angiogenesis, which is a critical step in wound healing. **The aim of the study** was to evaluate the wound healing effect of a medicinal product based on recombinant human angiogenin in gel form in various experimental models. **Materials and methods:** white outbred male rats were used as experimental animals. The study compared healing effects of a regenerating product containing recombinant human angiogenin (0.0025%) in gel form and a reference product in full-thickness excision, incision, and burn wound models. The healing effect of the test product in treating chronic wounds was assessed in a model of alloxan-induced diabetes mellitus. The anti-inflammatory effect of the test product containing recombinant human angiogenin was compared with that of another reference product in a model of adjuvant-induced arthritis. **Results:** according to the study, the test product based on recombinant human angiogenin exerts higher wound healing effect in treating excision, incision, and burn wounds than the reference product (Solcoseryl gel). Being applied, the test product intensifies tissue repair in chronic wounds in the model of alloxan-induced diabetes. The dissociation of necrotic tissues and the progression towards epithelialisation at wound edges are more rapid. The anti-inflammatory effect of the test product based on recombinant human angiogenin is comparable with that of the reference product (Diclofenac gel). **Conclusions:** the test product based on recombinant human angiogenin in gel form was found to have pronounced wound healing and anti-inflammatory effects comparable with those of reference products.

Key words: excision wound; incision wound; burn wound; alloxan-induced diabetes mellitus; adjuvant-induced arthritis; anti-inflammatory agent; recombinant human angiogenin

For citation: Gulyayev A.E., Shulgau Z.T., Sergazy Sh.D., Yurina N.V., Goryachkin A.M., Bogachev S.S., Proskurina A.S. Wound healing and anti-inflammatory effects of recombinant human angiogenin. *BIO-*

Введение

Создание эффективных ранозаживляющих средств является актуальной задачей современной клинической медицины. Одним из перспективных направлений представляется разработка подходов для стимуляции ангиогенеза, который является критическим этапом процесса заживления ран. Вновь образующиеся кровеносные сосуды участвуют в инициации формирования грануляционной ткани и далее обеспечивают питанием и кислородом растущие ткани [1, 2].

Одним из сильнейших индукторов образования кровеносных сосудов является ангиогенин. Он также играет ведущую роль в различных физиологических и патологических процессах, включая репродуктивный цикл, рост эмбриональных и постнатальных тканей, регенерацию поврежденных тканей и системы кровотока, нейропротекцию и воспаление [3–6].

Ангиогенин представляет собой секреторную рибонуклеазу, которая стимулирует транскрипцию рРНК в ядрах эндотелиальных клеток. Это приводит к активному синтезу различных белков, необходимых для роста и выживаемости клеток и формирования новых сосудов. В итоге пролиферирующие эндотелиальные клетки образуют новую трубку как основу будущего кровеносного сосуда, которая укрепляется клетками гладкой мускулатуры, формируя новый кровеносный сосуд [7, 8].

Помимо основной функции активации ангиогенеза, ангиогенин участвует в регуляции воспалительного процесса и проявляет противовоспалительное действие [9–13].

В экспериментальной и клинической практике описана возможность использования ангиогенина для системного лечения сосудистых заболеваний (ишемия, инфаркт миокарда), бокового амиотрофического склероза, для заживления костей и восстановления суставов [4, 14–16]. Также описано применение ангиогенина, в том числе в виде гелей, для местного лечения ран [1, 17–22].

Описано получение активного химерного белка рекомбинантного ангиогенина человека в штамме-продуценте *Pichia pastoris* [23]. На ос-

нове субстанции рекомбинантного ангиогенина человека был разработан гель регенерирующий для местного применения.

Цель работы — оценить ранозаживляющее действие препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека в виде геля на различных экспериментальных моделях.

Материалы и методы

Материалы:

- исследуемый препарат — препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека [23] в виде геля — гель регенерирующий Ангиофарм (25 мкг на 1 г готовой лекарственной формы, массовый процент 0,0025%) (ООО «Лаборатория Ангиофарм», Россия);
- контрольный препарат — гелевая основа — гидроксипропил акрилат/натрия акрилоилдиметилтаурата сополимер (Sepinov EMT 10, Франция);
- препарат сравнения — гель Солкосерил (Legacy Pharmaceuticals Switzerland GmbH, Швейцария);
- препарат сравнения — гель Диклофенак (1% диклофенак натрия) (Hemofarm, Сербия).

Экспериментальные животные

Исследования на животных были одобрены локальным этическим комитетом Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 8 от 19.03.2019) и проведены в соответствии с положениями Директивы Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях¹, а также требованиями и рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных².

В качестве экспериментальных животных использовали грызунов (крысы), применение которых рекомендовано для изучения регенеративной активности препаратов для местного применения [24].

В исследованиях использовали белых беспородных крыс-самцов массой 200–300 г (источник животных — виварий ФГБНУ «Федеральный

¹ Директива Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей.

² ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»). Животных содержали в клетках с обеспыленной подстилкой из деревянной стружки при комнатной температуре 22 ± 2 °C с 12-часовым циклом свет/темнота и минимальной относительной влажностью 40%, имели свободный доступ к воде и гранулированному корму (Sniff, V1534-300, Германия).

Эксперименты по моделированию ран проводили в соответствии с требованиями руководства работы с лабораторными животными³ и принципами надлежащей лабораторной практики⁴. Раны моделировали в условиях эфирного наркоза. Поскольку процесс заживления модельных ран зависит от типа раны, сроки проведения экспериментов различались для каждой модели. Вывод животных из эксперимента проводили во временные точки в соответствии с задачами, определенными для каждой модели раны. Эвтаназию животных проводили посредством передозировки углекислого газа.

Методы

Режим нанесения препаратов на рану. Препараты наносили в одинаковом режиме. Количество наносимого препарата зависело от площади поверхности раны. На каждый квадратный сантиметр поверхности раны наносили не более 0,1 г геля 1 раз в сутки. Необходимое количество препарата равномерно наносили аппликатором на область поражения с краевым захватом здоровых тканей, создавая равномерную пленку толщиной не более 1 мм.

Модель плоскостной кожно-мышечной раны. Крысам наносили полнослойную кожную рану в шейнолопаточной области путем удаления кожного лоскута с подкожной клетчаткой площадью 3 см². С целью получения у всех животных одинакового исходного размера ран к краям раны подшивали рамочки, так как вследствие подвижности кожи у крыс размеры ран могут значительно варьировать, рамочки удаляли через двое суток⁵. Препараты (исследуемый препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека; препарат сравнения Солкосерил; контрольный препарат — гелевая основа) наносили на раневую поверхность ежедневно в течение 21 сут. В каждой группе было по 10 животных. С целью взятия материала для морфологическо-

го исследования, половина животных (по 5 животных из каждой исследуемой группы) выводились из эксперимента на 5 сут. У оставшихся животных (по 5 животных в каждой исследуемой группе) оценивали сроки заживления ран. Сроки заживления ран фиксировали по моменту отпадения струпа и наличия под ним покрытого эпителием дефекта.

Модель линейной раны. Крысам в области спины наносили резаную рану длиной 3 см до собственной фасции. Лечение начинали немедленно после подсыхания раны. Препараты (исследуемый препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека; препарат сравнения Солкосерил; контрольный препарат — гелевая основа) наносили на раневую поверхность ежедневно в течение 7 сут. В каждой группе было по 5 животных.

Модель ожоговой раны. Термический ожог у крыс вызывали на выстриженном участке спины размером 3×3 см. Для этого использовали прибор собственного лабораторного производства с установленной контролируемой температурной шкалой и электропаяльником, на конце которого крепится металлическая пластина размером 3×3 см. Данный метод позволяет получить стандартные ожоги по площади и глубине всей толщи кожи. Время экспозиции нагретой до 200 ± 10 °C контактной пластинки составляло 10 с. При соблюдении этих условий ожог кожи у животных соответствовал IIIA степени клинической классификации ожогов⁶. Препараты (исследуемый препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека; препарат сравнения Солкосерил; контрольный препарат — гелевая основа) наносили на раневую поверхность ежедневно в течение 28 сут. В каждой группе было по 6 животных. Регистрировали состояние раны, проводили измерение площади раны, прикладывая к ране прозрачный трафарет. Фиксировали также количество животных с зарубцевавшимися ранами.

Модель длительно незаживающей раны на фоне аллоксанового сахарного диабета. Экспериментальный диабет индуцировали у 20 крыс путем внутривенного однократного введения в хвостовую боковую вену 45 мг/кг аллоксана. Эффективность модели оценивали по уровню глюкозы в сыворотке крови с помощью стандартной клинической методики [25]. Крыс с раз-

³ Каркищенко НН, Грачева СВ, ред. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. М.: Профиль; 2010.

⁴ ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики.

⁵ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2013.

⁶ Кузнецов НА, ред. Основы клинической хирургии: практическое руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.

вившимся сахарным диабетом распределяли по группам (8 животных в контрольной группе; 7 животных в группе, получавшей препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека) и индуцировали образование раны путем введения в подушечку задней конечности 50 мкл 20% гидроксида калия. Через неделю после введения гидроксида калия формировалась длительно незаживающая рана. Препараты (исследуемый препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека; контрольный препарат – гелевая основа) наносили на раневую поверхность ежедневно в течение 28 сут.

Модель адьювантного артрита у крыс. Хроническое иммунное воспаление моделировали у крыс однократным субплантарным введением в правую заднюю лапу 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда (взвесь ослабленных жизнеспособных бацилл Кальметта–Герена 2,5 мг/мл в вазелиновом масле). Лечение начинали на 12 сут после введения адьюванта Фрейнда. Препараты (исследуемый препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека; препарат сравнения Диклофенак; контрольный препарат – гелевая основа) наносили на место воспаления ежедневно в течение 21 сут. В каждой группе было по 5 животных. С помощью штангенциркуля каждые 2–4 сут измеряли диаметр здоровой лапы и лапы с индуцированным воспалением. Торможение отека оценивали по формуле $T = 100\% \times (\Delta D_k - \Delta D_o) / \Delta D_k$, где T – торможение отека, ΔD_k – разница между отеочной и здоровой лапой в контроле, ΔD_o – разница между отеочной и здоровой лапой в опытных группах. Объем конечности определяли методом онкометрии с помощью портативного плетизмометра [26].

Морфологическое исследование. Материалы для гистологического исследования забирали на видимой границе между интактной и поврежденной тканью, захватывая оба варианта ткани, и фиксировали в 10% нейтрализованном мелом формалине. Дальнейшую обработку и заливку материала в парафин осуществляли по общепринятой гистологической методике [27, 28]. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Все микропрепараты исследовали на микроскопах Axioskop-2 (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы Statistica 8.0 методом непараметрической статистики с оценкой значимости различий по U -критерию Манна–Уитни. На рисунках приведены средние значения и стандартные отклонения.

Результаты и обсуждение

Оценка ранозаживляющего действия рекомбинантного ангиогенина человека на модели плоскостной кожно-мышечной раны

На смоделированной условно асептической полнослойной ране кожи крыс размером 3 см² (рис. 1А) проведено сравнительное морфологическое изучение динамики раневого процесса на 5 сут эксперимента, поскольку в этот момент наиболее выражена воспалительная фаза течения раневого процесса. В контрольной группе на 5 сут эксперимента морфологическая картина раны характеризовалась травматическим воспалением с серозно-фибринозной и нейтрофильной экссудацией, резким расширением сосудов (рис. 1В). Кровеносные сосуды дермы расширены и полнокровны, присутствует плотный воспалительный инфильтрат.

При обработке раны препаратом сравнения Солкосерил на 5 сут эксперимента фибриновые массы в ране были набухшие с равномерно распределенными включенными гнойными тельцами (рис. 1В). Морфологические изменения отличались от контроля меньшей толщиной, плотностью и интенсивностью окраски лейкоцитарного вала. Воспалительная инфильтрация в дерме была также выражена меньше в сравнении с контролем.

При обработке раны препаратом на основе рекомбинантного ангиогенина человека фибринозно-лейкоцитарный слой раны был утолщен за счет равномерного пропитывания гелем (рис. 1В). При этом нейтрофильные лейкоциты были разрушены. Диффузная воспалительная инфильтрация в дерме была выражена слабее в сравнении с контролем, отмечались обширные участки кровоизлияний. Воспалительный инфильтрат проникал в глубокие слои дермы, где появлялись крупные клетки неправильной формы с базофильными крупными, эксцентрично расположенными ядрами. Вокруг сосудов были отмечены многочисленные молодые формы фибробластов.

Время заживления ран фиксировали по моменту отпадения струпа и наличия под ним покрытого эпителием дефекта. Установлено, что и препарат сравнения Солкосерил, и исследуемый препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека ускоряют заживление плоскостных ран кожи у крыс (рис. 2). При этом средняя скорость заживления раны в случае применения исследуемого препарата (12 сут) была достоверно выше по сравнению как с контролем (20 сут), так и с препаратом сравнения Солкосерил (15 сут).

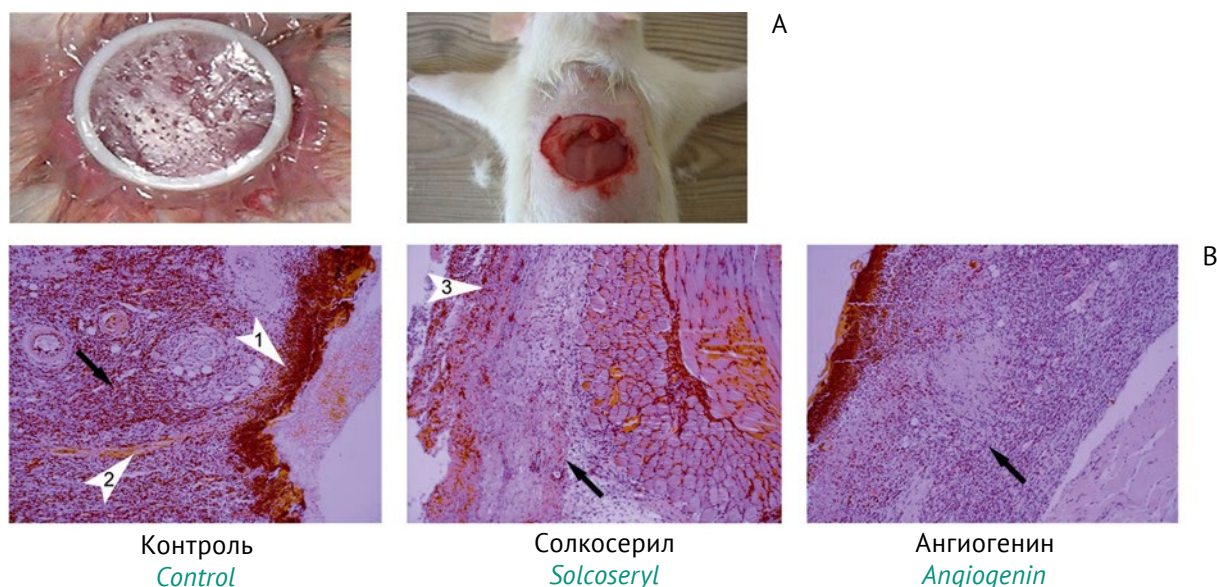


Рис. 1. Оценка ранозаживляющего действия рекомбинантного ангиогенина человека на модели плоскостной кожно-мышечной раны у крыс. А — моделирование плоскостной кожно-мышечной раны с использованием фиксирующих размер рамок (фотография слева) и плоскостная кожно-мышечная рана (фотография справа). В — состояние плоскостной кожно-мышечной раны на 5 сут в контрольной группе (Контроль) и после обработки препаратом сравнения (Солкосерил) и препаратом на основе рекомбинантного ангиогенина человека (Ангиогенин). Белыми стрелками указаны: 1 — фибринозно-геморрагическая корка на поверхности раны, 2 — полнокровный сосуд, 3 — распадающиеся нейтрофилы. Черными стрелками указана воспалительная инфильтрация. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 100$.

Fig. 1. Evaluation of the wound healing effect of recombinant human angiogenin using a full-thickness excision wound model in rats. A—splinting (left) and the resulting wound (right); B—wound condition in the control group, the reference group (Solcoseryl), and the test group (recombinant human angiogenin) on treatment day 5. White arrows: 1—fibrinohaemorrhagic crust on the wound surface, 2—blood-filled vessel, 3—degrading neutrophils. Black arrows: inflammatory infiltration. Haematoxylin-eosin stains at $100\times$ magnification.

Оценка ранозаживляющего действия рекомбинантного ангиогенина человека на модели линейной раны

На смоделированной линейной ране (рис. 3А) для забора гистологического препарата были выбраны 5 сут, поскольку в этот момент наиболее выражена воспалительная фаза течения раневого процесса. Морфологическая картина линейной раны на 5 сут в контрольной группе исследования характеризовалась воспалительной фазой раневого процесса. Дефект ткани был заполнен некротическими массами и покрыт фибринозно-лейкоцитарным слоем различной толщины с многочисленными нейтрофилами и гнойными тельцами (рис. 3В).

В группе с применением препарата сравнения Солкосерил сохранялась массивная фибринозно-некротическая пленка на всем протяжении раневой поверхности. Воспалительная инфильтрация была выражена в меньшей степени по сравнению с контролем. Молодая ткань характеризовалась началом развития грануляционной ткани с появлением фибробластов и мелких овальной формы сосудов (рис. 3В).

При обработке раны препаратом на основе рекомбинантного ангиогенина человека поверхностный фибринозно-лейкоцитарный слой был равномерно пропитан гелем (рис. 3В). Грануляционная ткань была представлена тонким слоем и характеризовалась умеренной степенью зрелости. Наблюдались небольшие кровоизлияния. По краям раны отмечено усиленное новообразование мелких кровеносных сосудов.

На рисунке 4 представлена динамика изменения морфологических параметров раны и клеточного состава в мазке раневого экссудата на 1, 3 и 7 сут эксперимента в контрольной группе и группах с применением препарата сравнения Солкосерил и исследуемого препарата в форме геля.

В группе с применением препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека наблюдается уменьшение площади интерстиция (рис. 4А), свидетельствующее об активно идущих регенеративных процессах. Количество полиморфноядерных лейкоцитов в группе, получавшей исследуемый препарат, существенно снижалось к 7 сут (рис. 4В), что свидетельствует об уменьшении воспалительного процесса.

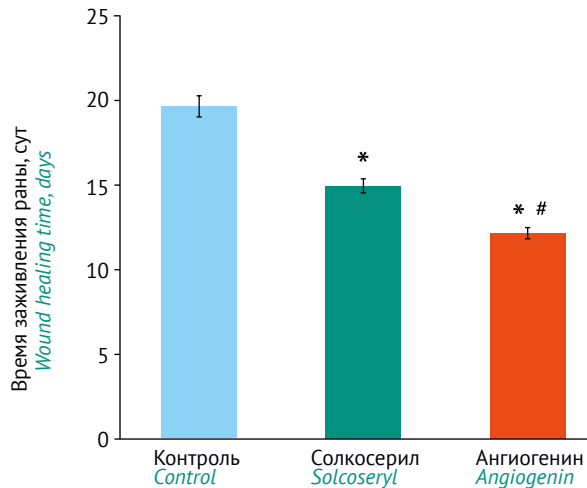
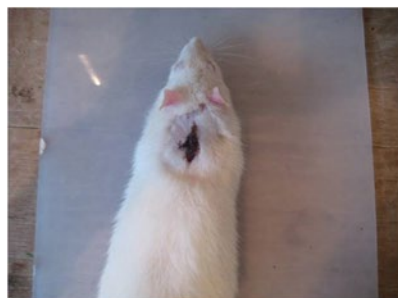
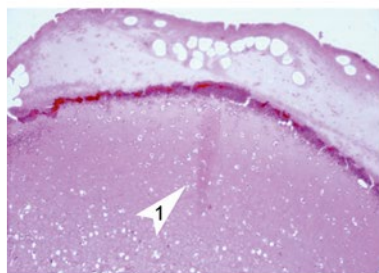


Рис. 2. Влияние рекомбинантного ангиогенина человека на сроки полной эпителизации плоскостных ран у крыс. По оси абсцисс указаны группы животных. * – достоверные отличия от контрольной группы, # – достоверные отличия от группы, получавшей Солкосерил ($p < 0,05$, U -критерий Манна–Уитни).

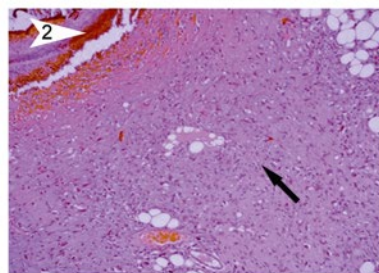
Fig. 2. Effect of recombinant human angiogenin on the time to complete epithelialisation of excision wounds in rats. The X-axis represents animal groups. *—significant difference from the control group, #—significant difference from the Solcoseryl group ($p < 0.05$; Mann–Whitney U -test).



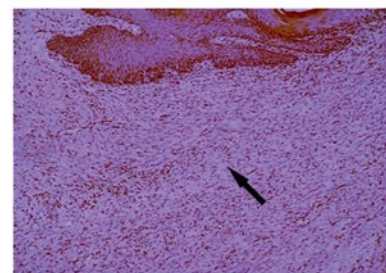
A



Контроль
Control



Солкосерил
Solcoseryl



Ангиогенин
Angiogenin

B

Рис. 3. Оценка ранозаживляющего действия рекомбинантного ангиогенина человека на модели линейной раны у крыс. А – модель линейной раны. В – морфологическая картина линейной раны на 5 сут в контрольной группе (Контроль) и после обработки препаратом сравнения (Солкосерил) и препаратом на основе рекомбинантного ангиогенина человека (Ангиогенин). Белыми стрелками указаны: 1 – серозная корка на поверхности раны, 2 – фибринозно-некротическая пленка на поверхности раны. Черными стрелками указана грануляционная ткань. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 100$.

Fig. 3. Evaluation of the wound healing effect of recombinant human angiogenin using an incision wound model in rats. A—incision wound model; B—wound morphology in the control group, the reference group (Solcoseryl), and the test group (recombinant human angiogenin) on treatment day 5. White arrows: 1—serous crust on the wound surface, 2—fibrinoid necrotic layer on the wound surface. Black arrows: granulation tissue. Haematoxylin–eosin stains at $100\times$ magnification.

Было изучено количество фибробластов как показателя интенсивности пролиферативных процессов. В группах, получавших препарат сравнения Солкосерил и препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека, отмечена сходная динамика роста количества фибробластов (рис. 4С). При этом в контрольной группе нарастание количества фибробластов с 1 по 7 сут отсутствовало.

Количество внесосудистых эритроцитов в группах с применением препарата Солкосерил и исследуемого препарата снижалось уже на 3 сут и продолжало уменьшаться на 7 сут (рис. 4D), что свидетельствует о затухании воспалительного процесса.

О локальной реактивности тканей в зоне раны свидетельствует количество макрофагов и тучных клеток. В группах, получавших препарат сравнения Солкосерил и исследуемый препарат, оно возрастало и достигало максимального значения к 7 сут (рис. 4Е, 4F). В контрольной группе увеличения числа макрофагов и тучных клеток не наблюдалось.

Таким образом, проведенные сравнительные исследования свидетельствуют о том, что наиболее благоприятная тенденция к заживлению ран отмечена в группе с применением исследуемого препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека.

Оценка ранозаживляющего действия рекомбинантного ангиогенина человека на модели ожоговой раны

При проведении сравнительного исследования на модели ожоговой раны у крыс (рис. 5) было показано, что различия в скорости заживления

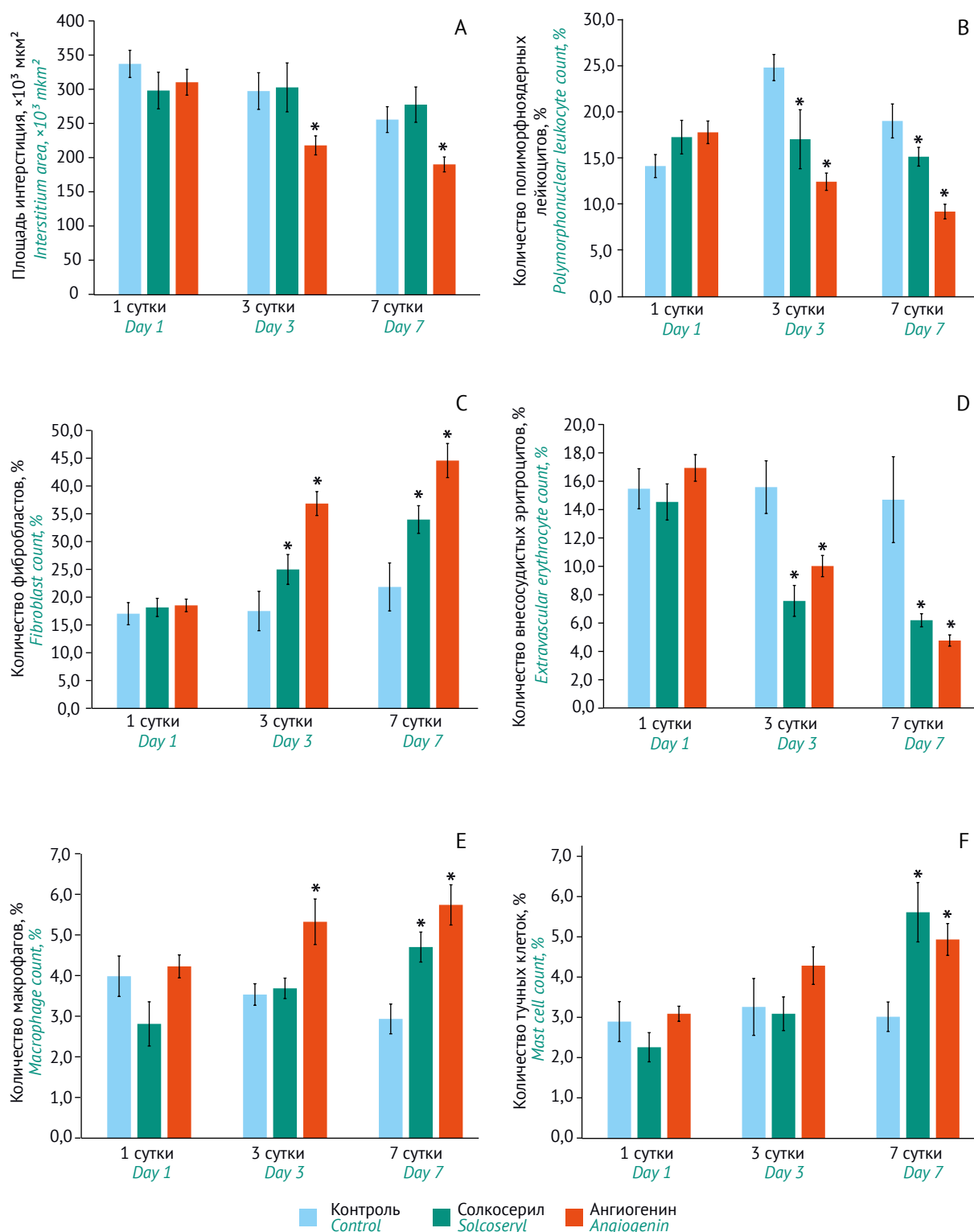


Рис. 4. Динамика изменения клеточного состава в мазке раневого экссудата линейной раны на 1, 3 и 7 сут эксперимента в контрольной группе (Контроль) и после обработки препаратом сравнения (Солкосерил) и препаратом на основе рекомбинантного ангиогенина человека (Ангиогенин). А – площадь интерстиция, В – количество полиморфноядерных лейкоцитов, С – количество фибробластов, Д – количество внесосудистых эритроцитов, Е – количество макрофагов, Ф – количество тучных клеток. В легенде указаны группы животных. * – достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$, U-критерий Манна–Уитни).

Fig. 4. Time course of cellular composition changes in smears of incision wound exudate in the control group, the reference group (Solcoseryl), and the test group (recombinant human Angiogenin) on treatment days 1, 3, and 7. А–interstitium areas, В–polymorphonuclear leukocyte counts, С–fibroblast counts, Д–extravasated erythrocyte counts, Е–macrophage counts, F–mast cell counts. The legend indicates animal groups. *—significant difference from the control group ($p < 0.05$; Mann–Whitney U-test).

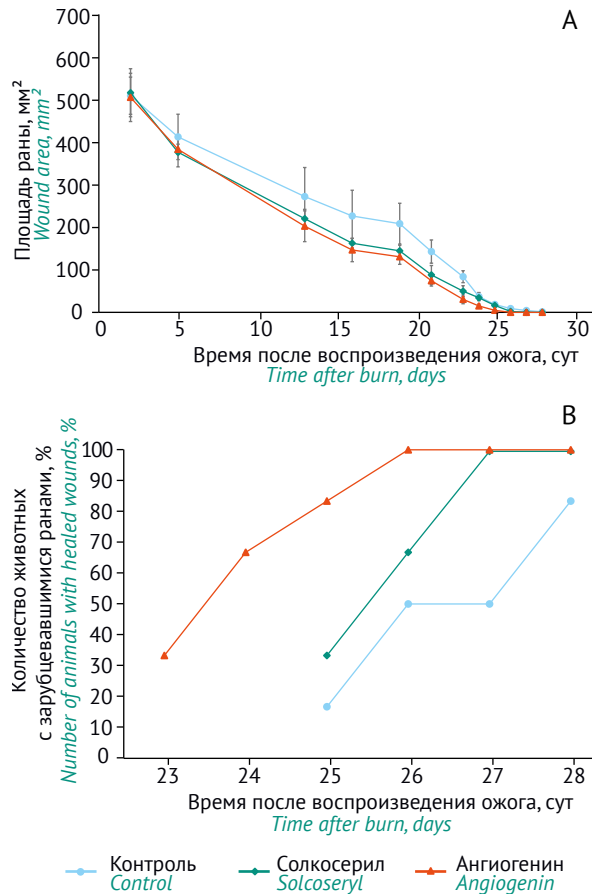


Рис. 5. Оценка ранозаживляющего действия рекомбинантного ангиогенина человека на модели ожоговой раны у крыс. Представлены показатели заживления ран в контрольной группе (Контроль) и после обработки препаратом сравнения (Солкосерил) и препаратом на основе рекомбинантного ангиогенина человека (Ангиогенин). А — динамика изменения площади раны во времени. В — количество животных с зарубцевавшимися ранами. В легенде указаны группы животных.

Fig. 5. Evaluation of the wound healing effect of recombinant human angiogenin using a burn wound model in rats. The figure shows indicators of wound healing in the control group, the reference group (Solcoseryl), and the test group (recombinant human angiogenin). A—changes in the wound area with time; B—number of animals with healed wounds. The legend indicates groups of animals.

раны между группой, получавшей исследуемый препарат, и контрольной группой начинают достоверно определяться начиная с 23 сут. Препарат сравнения Солкосерил на модели ожоговой раны проявлял явный ранозаживляющий эффект, процесс эпителизации на 23 сут использования препарата носил выраженный характер. В те же сроки при обработке раны препаратом на основе рекомбинантного ангиогенина человека большая часть раневой поверхности язвы эпителизировалась. Полная эпителизация при применении исследуемого препарата достигалась на 26 сут, а при применении препарата срав-

нения Солкосерил — на 27 сут. В контрольной группе полная эпителизация не была достигнута вплоть до окончания эксперимента (28 сут).

При исследовании мазков раневой поверхности в динамике отмечалась следующая картина. На 1–2 сут во всех исследуемых группах наблюдалось наличие эритроцитов и лейкоцитов в разреженном пространстве. На 7–9 сут в группах, получавших препарат Солкосерил и препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека, отмечались единичные макроциты, напоминающие клетки рогового слоя эпителия. В контрольной группе преобладали лейкоциты. На 10–13 сут в группах с применением препарата Солкосерил и исследуемого препарата наблюдалось присутствие крупных безъядерных эпителиальных клеток. В контрольной группе выявлены единичные безъядерные эпителиальные клетки в консорциуме с макроцитами.

Таким образом, было показано, что препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека обладает способностью стимулировать репарацию тканей в области ожоговой раны дермы (ожог III степени) относительно контроля. При этом ранозаживляющий эффект исследуемого препарата сходен с эффектом препарата сравнения Солкосерил, являющимся стандартом при исследовании процессов регенерации.

Оценка ранозаживляющего действия рекомбинантного ангиогенина человека на модели длительно незаживающей раны на фоне аллоксанового сахарного диабета

Известно, что при формировании аллоксанового сахарного диабета существенно снижается способность животных к нормальному протеканию репаративных процессов, что позволяет моделировать у них длительно незаживающие раны [29]. При моделировании аллоксанового сахарного диабета у крыс (табл. 1) была зафиксирована гибель 3 из 20 экспериментальных животных. В экспериментальные группы были отобраны крысы с концентрацией глюкозы в крови, превышающей 10,0 мМ (табл. 1). У этих крыс вызвали развитие длительно незаживающей раны в подушечке задней конечности (рис. 6А), характеризующейся формированием фибринового струпа и наличием большого количества некротизированных клеток.

Морфологическая картина раны до лечения (на момент формирования модели) характеризовалась глубоким поражением дермы, обилием гнойных телец и небольшим фибринозным слоем с резко выраженными признаками некроза. Отмечено присутствие нейтрофилов. Раневой канал заполнен фибриноидными массами,

Таблица 1. Характеристика экспериментальных групп животных по уровню концентрации глюкозы в крови через 4 сут после однократного введения аллоксана

Table 1. Classification of experimental animal groups according to blood glucose concentrations 4 days after a single injection of alloxan

Контрольная группа <i>Control group</i>				Группа, получавшая препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека <i>Recombinant human angiogenin group</i>			
№ животного <i>Animal No.</i>	Масса животного, г <i>Animal weight, g</i>	Концентрация глюкозы, мМ <i>Glucose concentration, mM</i>		№ животного <i>Animal No.</i>	Масса животного, г <i>Animal weight, g</i>	Концентрация глюкозы, мМ <i>Glucose concentration, mM</i>	
		до введения аллоксана <i>before alloxan treatment</i>	после введения аллоксана <i>after alloxan treatment</i>			до введения аллоксана <i>before alloxan treatment</i>	после введения аллоксана <i>after alloxan treatment</i>
1	215	4,5	16,5	1	201	3,6	17,6
2	210	3,8	16,8	2	219	5,3	Гибель <i>Death</i>
3	232	5,1	Гибель <i>Death</i>	3	202	3,6	12,6
4	207	3,7	7,7 ^а	4	238	4,8	19,8
5	237	5	20	5	218	4,1	17,1
6	202	4,3	14,3	6	205	3,1	5,9 ^а
7	212	3,2	17,7	7	220	4,6	19,6
8	202	5,2	19,2	8	213	3,5	Гибель <i>Death</i>
9	235	5,3	20,3	9	236	3,6	10,6
10	231	5,5	18,5	10	239	4,3	15,3

^а Исключенные из исследования животные (концентрация глюкозы в крови ≤ 10 мМ).

^а Animals withdrawn from the study (blood glucose concentrations ≤ 10 mM).

покрытыми лейкоцитарным слоем. Наблюдались участки полнокровных сосудов и признаки воспалительной инфильтрации, зоны кровоизлияний (рис. 6А).

На 7 сут в контрольной группе изменения не выражены. На поверхности раны присутствовали значительные некротические массы с фибрином. В группе животных, получавших лечение исследуемым препаратом, отмечались признаки расплавления некротических масс, острая воспалительная инфильтрация в глубоких слоях дермы, не разрушенных во время формирования раны.

На 14 сут лечения в контрольной группе отмечены признаки лизиса некротических масс, увеличено количество нейтрофилов, определялись отложения фибрина на поверхности раны. В глубоких слоях дермы выявлен воспалительный инфильтрат (рис. 6В). В группе с применением исследуемого препарата на фоне обильных некротических масс с фибрином отмечены участки активного лизиса с миграцией нейтрофилов и макрофагов в эти зоны. В глубоких слоях дермы воспалительная инфильтрация (рис. 6В).

По краям раны наблюдался тонкий регенерирующий эпителиальный пласт, подползающий под некротические массы.

На 21 сут в контрольной группе отмечено значительное сокращение размеров фибринозного слоя и уменьшение некротических масс. Расположенная под тонким слоем фибринозно-лейкоцитарного слоя грануляционная ткань характеризовалась очагами отека, фибриноидного набухания, полнокровием кровеносных сосудов. Наблюдающийся эпителиальный регенерирующий пласт имел неравномерную толщину и слабые связи с подлежащей тканью. Выявлено значительное количество моноцитов и нейтрофилов, а также присутствие плазматических клеток. В глубоких слоях дермы имелись признаки воспалительных процессов (рис. 6В). Отмечено значительное сокращение некротических масс и фибринозного слоя. Поверхность к моменту окончания лечения была эпителизирована. В подлежащей соединительной ткани отмечено формирование волосяных луковиц. Тем не менее репарации структуры дермы и полного заживления раны не произошло.

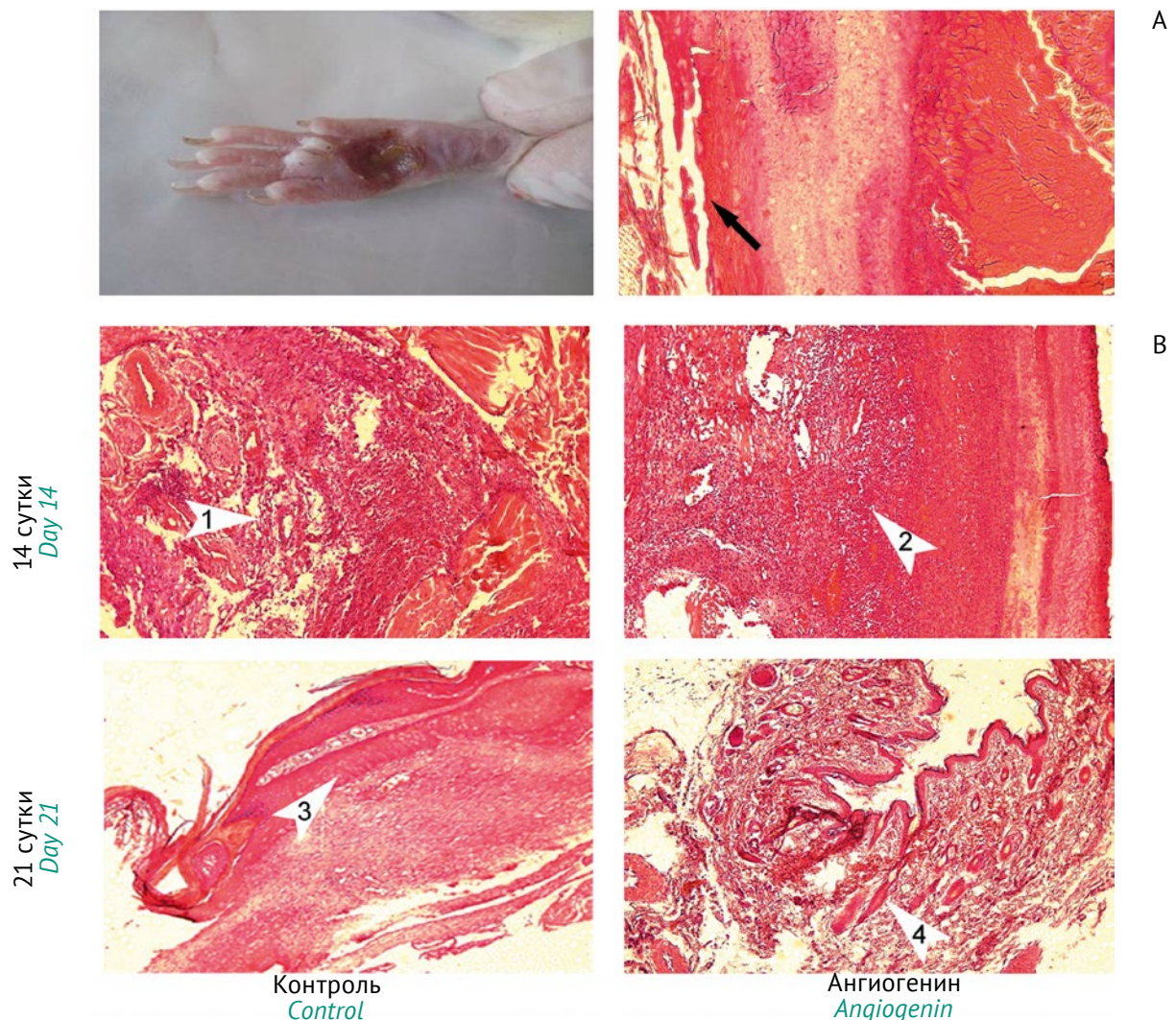


Рис. 6. Оценка ранозаживляющего действия рекомбинантного ангиогенина человека на модели длительно незаживающей раны на фоне аллоксанового сахарного диабета у крыс. А – внешний вид раны (фотография слева) и морфологическая картина раны на момент формирования модели, без лечения (фотография справа). Черной стрелкой отмечены фибринозно-геморрагические массы на поверхности раны. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 200$. В – морфологическая картина раны в контрольной группе (Контроль) и после применения препарата рекомбинантного ангиогенина человека (Ангиогенин) на 14 и 21 сут. Белыми стрелками отмечены: 1 – воспалительный инфильтрат в глубоких слоях дермы, 2 – некротические массы с лейкоцитарной инфильтрацией, 3 – эпидермизирующаяся рана, 4 – восстановленные волосные фолликулы в эпидермизированной ране. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 200$, для группы с применением препарата Ангиогенин на 21 сут – увеличение $\times 50$.

Fig. 6. Evaluation of the wound healing effect of recombinant human angiogenin using a chronic wound model in rats with alloxan-induced diabetes mellitus. A—appearance of the wound (left); and wound morphology at the moment of model formation, without treatment (right). The black arrow indicates fibrino-haemorrhagic masses at the wound surface. Haematoxylin-eosin stains at $200\times$ magnification. B—wound morphology in the control group and the test group (recombinant human angiogenin) on treatment days 14 and 21. White arrows: 1— inflammatory infiltrate in the deep dermis layers, 2—necrotic masses with leukocytic infiltration, 3—wound re-epithelialisation, 4—restored hair follicles in the re-epithelialised wound. Haematoxylin-eosin stains at $50\times$ magnification (angiogenin on day 21) and $200\times$ magnification (the rest).

На фоне применения препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека на 21 сут наблюдения рана полностью эпителизовалась с восстановлением полноценной структуры кожи (рис. 6В).

Среднее время заживления хронической раны после лечения исследуемым препаратом сокращалось на 8 сут по сравнению с контрольной группой (рис. 7).

Оценка противовоспалительного действия рекомбинантного ангиогенина человека на модели адьювантного артрита

Крысам с адьювантным артритом на воспаленную конечность наносили препарат на основе рекомбинантного ангиогенина человека или препарат сравнения Диклофенак. Сравнивали противовоспалительное действие препаратов с действием гелевой основы (контрольная

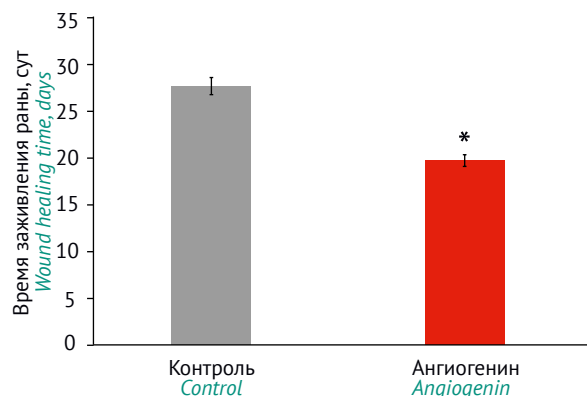


Рис. 7. Сроки заживления хронических ран при использовании рекомбинантного ангиогенина человека на модели длительно незаживающей раны на фоне аллоксанового сахарного диабета у крыс. По оси абсцисс указаны группы животных. * — достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$, U -критерий Манна–Уитни).

Fig. 7. Chronic wound healing time with recombinant human angiogenin in the chronic wound model in rats with alloxan-induced diabetes mellitus. The X-axis represents animal groups. * — significant difference from the control group ($p < 0.05$; Mann–Whitney U -test).

группа). На рисунке 8 приведены результаты сравнения противовоспалительного действия препаратов по изменению размеров пораженной конечности крыс в контрольной и экспериментальных группах.

Обнаружено, что при терапии смоделированного адьювантного артрита противовоспалительное действие исследуемого препарата было сопоставимо с действием препарата сравнения Диклофенак и достоверно отличалось от эффекта препарата контроля.

Закключение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии у препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека в виде геля выраженных ранозаживляющих и противовоспалительных свойств.

В случае применения исследуемого препарата наблюдалась наиболее благоприятная тенденция к заживлению ран по сравнению с контролем и препаратами сравнения Солкосерил и Диклофенак, выражающаяся следующими признаками:

- высокий локальный ответ (реактивность) тканей в зоне раны, сопровождающийся снижением числа нейтрофилов и миграцией в зону воспаления макрофагов, тучных клеток и фибробластов, индуцирующих и поддерживающих противовоспалительные процессы;
- активная стимуляция репарации поврежденных тканей;

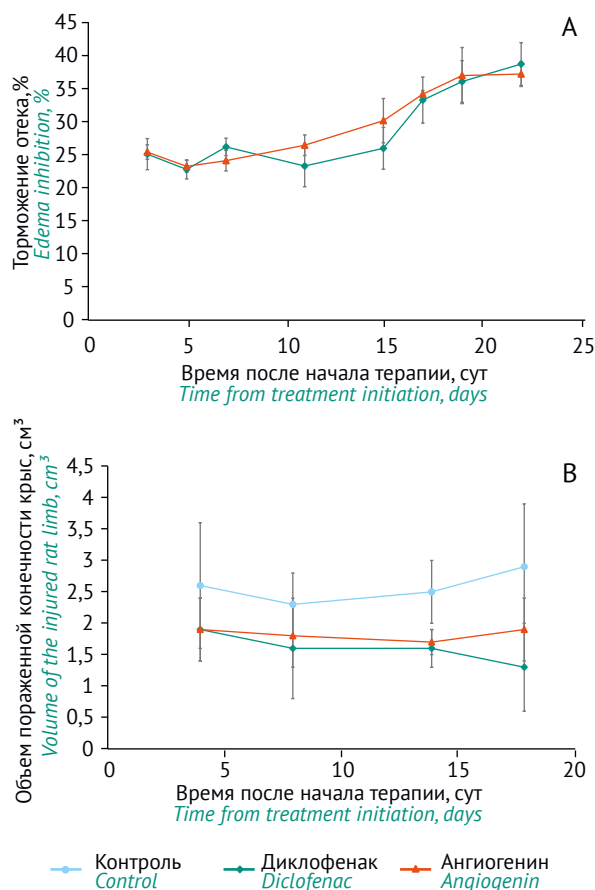


Рис. 8. Оценка противовоспалительного эффекта рекомбинантного ангиогенина человека на модели адьювантного артрита у крыс. Представлены показатели противовоспалительного действия в контрольной группе (Контроль) и после обработки препаратом сравнения (Диклофенак) и препаратом рекомбинантного ангиогенина человека (Ангиогенин). А — динамика торможения отека. В — динамика изменения объема пораженной конечности крыс. В легенде указаны группы животных.

Fig. 8. Evaluation of the anti-inflammatory effect of recombinant human angiogenin using a model of adjuvant-induced arthritis in rats. The figure shows indicators of the anti-inflammatory effect in the control group, the reference group (Diclofenac), and the test group (recombinant human angiogenin). A—edema inhibition with time, %; B—changes in the injured limb volume with time, cm^3 . The legend indicates groups of animals.

- быстрая эпителизация с восстановлением полноценной структуры кожи;
- достоверное сокращение сроков заживления раны, определяемое по моменту отпадения струпа и наличия под ним покрытого эпителием дефекта;
- выраженное противовоспалительное действие.

Полученные результаты дают основание для проведения дальнейших экспериментальных исследований свойств препарата на основе рекомбинантного ангиогенина человека в виде геля, а также проведения расширенных доклинических и клинических исследований.

Литература/References

1. Гуляев АЕ, Лохвицкий СВ, Тусупханов БА. Ранозаживляющие эффекты рекомбинантного ангиогенина человека. *Медицина и экология*. 2010;3:9–12. [Gulyayev AY, Lohvitskiy SV, Tusupkhanov BA. Wound healing effects of man's recombined angiogenin. *Medicina i ekologiya = Medicine and Ecology*. 2010;3:9–12 (In Russ.)]
2. Комолова ГС, Ионова ИИ. Биологические функции и лечебные свойства ангиогенина. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2010;73(3):40–4. [Komolova GS, Ionova II. Biological functions and therapeutic properties of angiogenins. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*. 2010;73:40–4 (In Russ.)]
3. Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, Sfridakis A, Kandidaki E, Kouroumalis EA. Serum angiogenin in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2004;49:1758–62. <https://doi.org/10.1007/s10620-004-9565-4>
4. King TV, Vallee BL. Neovascularisation of the meniscus with angiogenin. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br*. 1991;73(4):587–90. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.73b4.1712788>
5. Goncalves KA, Silberstein L, Li S, Severe N, Hu MG, Yang H, et al. Angiogenin promotes hematopoietic regeneration by dichotomously regulating quiescence of stem and progenitor cells. *Cell*. 2016;166(4):894–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.042>
6. Yu D, Cai Y, Zhou W, Sheng J, Xu Z. The potential of angiogenin as a serum biomarker for diseases: systematic review and meta-analysis. *Dis Markers*. 2018;1984718. <https://doi.org/10.1155/2018/1984718>
7. Sheng J, Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016;48(5):399–410. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv131>
8. Newman AC, Nakatsu MN, Chou W, Gershon PD, Hughes CCW. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Mol Biol Cell*. 2011;22(20):3791–800. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-05-0393>
9. Etoh T, Shibuta K, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiogenin expression in human colorectal cancer: the role of focal macrophage infiltration. *Clin Cancer Res*. 2000;6(9):3545–51.
10. Hartmann A, Kunz M, Köstlin S, Gillitzer R, Toksoy A, Bröcker EB, Klein CE. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res*. 1999;59(7):1578–83.
11. Lee SH, Kim KW, Joo K, Kim JC. Angiogenin ameliorates corneal opacity and neovascularization via regulating immune response in corneal fibroblasts. *BMC Ophthalmol*. 2016;16:57. <https://doi.org/10.1186/s12886-016-0235-z>
12. Matousek J, Soucek J, Riha J, Zankel TR, Benner SA. Immunosuppressive activity of angiogenin in comparison with bovine seminal ribonuclease and pancreatic ribonuclease. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 1995;112(2):235–41. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)00075-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00075-5)
13. Oikonomou KA, Kapsoritakis AN, Kapsoritaki AI, Manolakis AC, Tiaka EK, Tsiopoulos FD, et al. Angiogenin, angiopoietin-1, angiopoietin-2, and endostatin serum levels in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(4):963–70. <https://doi.org/10.1002/ibd.21410>
14. Moreau C, Devos D, Gosset P, Brunaud-Danel V, Tonnel A-B, Lassalle P, et al. Mécanismes de dérégulation de la réponse à l'hypoxie dans la sclérose latérale amyotrophique [Mechanisms of deregulated response to hypoxia in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a clinical study]. *Rev Neurol (Paris)*. 2010;166(3):279–83. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2009.05.018>
15. Liu XH, Bai CG, Xu ZY, Huang SD, Yuan Y, Gong DJ, Zhang JR. Therapeutic potential of angiogenin modified mesenchymal stem cells: angiogenin improves mesenchymal stem cells survival under hypoxia and enhances vasculogenesis in myocardial infarction. *Microvasc Res*. 2008;76(1):23–30. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2008.02.005>
16. Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P. The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009;129(7):989–97. <https://doi.org/10.1007/s00402-008-0777-5>
17. Ибраимов АС, Бейсембаев АА, Давыдов ВТ, Омурбеков ТО. Влияние ангиогенина на репаративные процессы при экспериментальной асептической ране печени. В кн.: *Морфология и хирургия: Сборник научных трудов НГМА*. Новосибирск; 2022. С. 61–2. [Ibraimov AC, Beisembaev AA, Davydov VT, Omurbekov TO. The effect of angiogenin on reparative processes in an experimental aseptic wound of the liver. In: *Morphology and Surgery: Collection of scientific works of NSMA*. Novosibirsk; 2002. P. 61–2 (In Russ.)]
18. Кулбачаев БК, Ибраимов АС. Регенераторные процессы в экспериментальной ране печени при интраоперационном применении геля рекомбинантного ангиогенина человека. *Хирургия, морфология, лимфология*. 2003;1:37–41. [Kulbachaev BC, Ibraimov AC. Regenerative processes in an experimental liver wound with intraoperative use of recombinant human angiogenin gel. *Khirurgiya, morfologiya, limfologiya = Surgery, Morphology, Lymphology*. 2003;1:37–41 (In Russ.)]
19. White R, McIntosh C. A review of the literature on topical therapies for diabetic foot ulcers. Part 2: advanced treatments. *J Wound Care*. 2009;18(8):335–41. <https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.8.43633>
20. Langer A, Rogowski W. Systematic review of economic evaluations of human cell-derived wound care products for the treatment of venous leg and diabetic foot ulcers. *BMC Health Serv Res*. 2009;9:115. <https://doi.org/10.1186/1472-6963-9-115>
21. Токтомбаев КК, Габитов АХ. Экспериментальное обоснование возможности применения ангиостимулирующих технологий в хирургии. *Вестник КPCУ*. 2009;9(1):162–4. [Toktombaev KK,

- Gabitov AN. Experimental substantiation of the possibility of using angiostimulating technologies in surgery. *Vestnik KRSU = Herald of KRSU*. 2009;9(1):162–4 (In Russ.)]
22. Гуляев АЕ, Тусупханов БА. Стимуляция ангиогенином процессов заживления ран в эксперименте. *Медицина и экология*. 2010;3:54–56. [Gulyayev AY, Tusupkhanov BA. Stimulation of wound repair processes by angiogenin in experiment. *Medicina i ekologiya = Medicine and Ecology*. 2010;3:54–56 (In Russ.)]
23. Пуртов АА, Мамаев АЛ. Рекомбинантная плазмида для экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris* гена химерного белка ангиогенина человека и штамм дрожжей *Pichia pastoris* – продуцент рекомбинантного химерного белка ангиогенина человека. Патент Российской Федерации № 2658758; 2018. [Purtov AA, Mamaev AL. Recombinant plasmid for expression in *Pichia pastoris* yeast gene of chimeric protein of human angiogenin and strain of *Pichia pastoris* yeast – producer of recombinant chimeric protein of human angiogenin. Patent of the Russian Federation No. 2658758; 2018 (In Russ.)]
24. Гуцин ЯА, Ковалева МА. Сравнительная морфология кожи человека и лабораторных животных. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2019;2. [Gushchin YA, Kovaleva MA. Comparative morphology of skin of human and laboratory animals. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy = Laboratory Animals for Science*. 2019;2 (In Russ.)] <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-02-06>
25. Ломаева СВ, Гетте ИФ, Булавинцева ТС, Переведенцева СЕ, Данилова ИГ. Особенности обмена биополимеров соединительной ткани в печени крыс с аллоксановым диабетом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2013;12(6):38–42. [Lomaeva SV, Gette IF, Bulavintseva TS, Perevedentseva SE, Danilova IG. The exchange of connective tissue biopolymers in the liver of alloxan diabetic rats. *Bulleten' sibirskoy mediciny = Bulletin of Siberian Medicine*. 2013;12(6):38–42 (In Russ.)]
26. Тринус ФП, Мохорт НА, Клебанов БМ. *Нестероидные противовоспалительные средства*. Киев: Здоровье; 1975. [Trinus FP, Mokhort NA, Klebanov BM. *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*. Kiev: Health; 1975 (In Russ.)]
27. Хэм А, Кормак Д. *Гистология*. В 5 томах. М.: Мир; 1982. [Ham A, Cormack D. *Histology*. In 5 volumes. M.: Mir; 1982 (In Russ.)]
28. Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G, Klapwijk J, Elwell MR, Lenz B, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 2. a joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol*. 2004;55(6):413–31. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00349>
29. Ярмолинская МИ, Андреева НЮ, Абашова ЕИ, Мишарина ЕВ. Экспериментальные модели сахарного диабета 1-го типа. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2019;68(2):109–18. [Yarmolinskaya MI, Andreyeva NY, Abashova EI, Misharina EV. Experimental models of type 1 diabetes. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2019;68(2):109–18 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17816/JOWD682109-118>

Вклад авторов. **А.Е. Гуляев** – разработка дизайна исследования, планирование экспериментальной работы, написание текста рукописи; **З.Т. Шульгау** – проведение экспериментальной работы, сбор и систематизация данных; **Ш.Д. Сергазы** – проведение экспериментальной работы, сбор и систематизация данных; **Н.В. Юрина** – анализ полученных данных, редактирование и переработка рукописи; **А.М. Горячкин** – интерпретация результатов исследования; **С.С. Богачев** – анализ и обобщение данных литературы, анализ и систематизация экспериментальных данных; **А.С. Проскурина** – обобщение результатов исследования, редактирование, переработка и оформление рукописи.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен локальным этическим комитетом Института Цитологии и Генетики СО РАН (протокол № 8 от 19.03.2019).

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в Институте цитологии и генетики (государственный бюджетный проект № FWNR-2022-0016) и при поддержке ООО «Лаборатория Ангиофарм».

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

Authors' contributions. **A.E. Gulyayev**—elaboration of the study design, planning of the experiments, writing of the text of the manuscript; **Z.T. Shulgau**—execution of the experiments, collection and systematisation of data; **S.D. Sergazy**—execution of the experiments, collection and systematisation of data; **N.V. Yurina**—analysis of the data obtained, editing and revision of the manuscript; **A.M. Goryachkin**—interpretation of the study results; **S.S. Bogachev**—analysis and consolidation of literature data, analysis and systematisation of the experimental data obtained; **A.S. Proskurina**—consolidation of the study results, editing, revision and formatting of the manuscript.

Ethics approval. The animal study protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (approval No. 8, 19 March 2019).

Acknowledgements. This work was supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education via the Institute of Cytology and Genetics (State Budget Project No. FWNR-2022-0016) and by Angiopharm Laboratory, LLC.

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

Об авторах / Authors

Гуляев Александр Евгеньевич, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5098-4675>
akin@mail.ru

Шульгау Зарина Токтамысовна, канд. мед. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8148-0816>
zarina4006@mail.ru

Сергазы Шынгыс Даулетханулы, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6030-620X>
shynggys.sergazy@nu.edu.kz

Юрина Наталья Владимировна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6907-8629>
yurina_nat@mail.ru

Горячкин Александр Михайлович. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0249-3043>
goryachkin.a@inbox.ru

Богачев Сергей Станиславович, д-р биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2019-9382>
gorbi@bionet.nsc.ru

Проскурина Анастасия Сергеевна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7650-4331>
labmolbiol@mail.ru

Aleksandr E. Gulyayev, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5098-4675>
akin@mail.ru

Zarina T. Shulgau, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8148-0816>
zarina4006@mail.ru

Shynggys D. Sergazy, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6030-620X>
shynggys.sergazy@nu.edu.kz

Natalia V. Yurina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6907-8629>
yurina_nat@mail.ru

Aleksandr M. Goryachkin. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0249-3043>
goryachkin.a@inbox.ru

Sergey S. Bogachev, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2019-9382>
gorbi@bionet.nsc.ru

Anastasia S. Proskurina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7650-4331>
labmolbiol@mail.ru

Поступила 25.12.2021

После доработки 10.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Received 25 December 2021

Revised 10 August 2022

Accepted 26 August 2022



Влияние ферментативно деполимеризованного фукоидана на эффекторные функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета

Т.А. Кузнецова^{1,✉}, Т.П. Смолина¹, Е.В. Персиянова¹, Л.А. Иванушко¹,
А.С. Сильченко², С.П. Ермакова², Н.Н. Беседнова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Сельская, д. 1, г. Владивосток, 690087, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения Российской академии наук, пр. 100-летия Владивостока, д. 159, г. Владивосток, 690022, Российская Федерация

✉ Кузнецова Татьяна Алексеевна; takuznets@mail.ru

Резюме

Использование сульфатированных полисахаридов (фукоиданов) в качестве фармацевтических субстанций или адъювантов связано с решением задачи по получению структурно охарактеризованных и однородных образцов или их олигомерных фракций, сохраняющих высокую биологическую активность. Нами получен высокоочищенный продукт ферментативного гидролиза фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и дана оценка биологической активности полученного продукта в сравнении с нативным фукоиданом. **Цель работы:** изучение влияния ферментативно деполимеризованного образца фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* на эффекторные функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета *in vitro* и *in vivo* в условиях антигенной нагрузки овальбумином (ОВА) в сравнении с нативным фукоиданом. **Материалы и методы:** для оценки влияния образцов фукоиданов (ферментативно деполимеризованного и нативного) *in vitro* на уровень экспрессии основных иммунофенотипических маркеров клеток врожденного и адаптивного иммунитета (нейтрофилов, натуральных киллеров, моноцитов, лимфоцитов) применяли методы проточной цитометрии. В экспериментах *in vivo* в сыворотке крови мышей линии BALB/c, иммунизированных ОВА, исследовали уровень специфических антител IgG, IgG1, IgG2a и цитокинов (IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы Statistica 10. **Результаты:** под влиянием обоих образцов фукоиданов *in vitro* выявлены изменения уровня экспрессии основных иммунофенотипических маркеров клеток врожденного и адаптивного иммунитета, свидетельствующие об их активации. В условиях *in vivo* под действием образцов фукоиданов наблюдалось увеличение уровня ОВА-специфических антител (IgG, IgG1, IgG2a) и продукции цитокинов (IFN- γ , IL-2, IL-10). **Выводы:** показана активация образцом ферментативно деполимеризованного фукоидана врожденного и адаптивного иммунитета, которая не уступает действию нативного образца фукоидана, что определяет возможность его применения в качестве адъюванта для широкого спектра профилактических и терапевтических вакцин.

Ключевые слова: фукоиданы; адъюванты; вакцины; врожденный иммунитет; адаптивный иммунитет; овальбумин

Для цитирования: Кузнецова Т.А., Смолина Т.П., Персиянова Е.В., Иванушко Л.А., Сильченко А.С., Ермакова С.П., Беседнова Н.Н. Влияние ферментативно деполимеризованного фукоидана на эффекторные функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):308–317. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-308-317>

Effects of enzymatically depolymerised fucoidan on effector functions of innate and adaptive immunity cells

T.A. Kuznetsova^{1,✉}, T.P. Smolina¹, E.V. Persiyanova¹, L.A. Ivanushko¹, A.S. Silchenko², S.P. Ermakova², N.N. Besednova¹

¹ G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, 1 Selskaya St., Vladivostok 690087, Russian Federation

² G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 159 100-letiya Vladivostoka Ave, Vladivostok 690022, Russian Federation

✉ Tatyana A. Kuznetsova; takuznets@mail.ru

Abstract

The use of sulfated polysaccharides (fucoidans) as active pharmaceutical ingredients or adjuvants poses the challenge of obtaining structurally characterised and homogeneous samples or their oligomeric fractions maintaining high biological activity. The authors obtained a highly purified enzymatic hydrolysate of fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and compared its biological activity with that of a native sample. **The aim of the study** was to compare, *in vitro* and *in vivo*, the effects of depolymerised fucoidan from the brown alga *F. evanescens* and native fucoidan on the effector functions of innate and adaptive immunity cells loaded with ovalbumin (OVA). **Materials and methods:** the effects of the fucoidan samples (depolymerised and native) on the expression of the main immunophenotypic markers by innate and adaptive immunity cells (neutrophils, monocytes, natural killers, and lymphocytes) were studied *in vitro* using flow cytometry. The levels of serum OVA-specific antibodies (IgG, IgG1, IgG2a) and cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12) were studied *in vivo* using BALB/c mice immunised with OVA. The statistical analysis of the data obtained was performed using the Statistica 10 software package. **Results:** *in vitro*, both fucoidan samples altered the expression of the main immunophenotypic markers by innate and adaptive immunity cells, indicating their activation. *In vivo*, mice treated with the fucoidan samples demonstrated an increase in the levels of OVA-specific antibodies (IgG, IgG1 and IgG2a) and in the production of cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-10). **Conclusions:** the effects of enzymatically depolymerised fucoidan on functional activity of innate and adaptive immunity cells are comparable to those of native fucoidan. The findings indicate the possibility of using enzymatic hydrolysis products of fucoidan as adjuvants for a wide range of prophylactic and therapeutic vaccines.

Key words: fucoidans; adjuvants; vaccines; innate immunity; adaptive immunity; ovalbumin

For citation: Kuznetsova T.A., Smolina T.P., Persiyanova E.V., Ivanushko L.A., Silchenko A.S., Ermakova S.P., Besednova N.N. Effects of enzymatically depolymerised fucoidan on effector functions of innate and adaptive immunity cells. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):308–317. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-308-317>

Введение

Фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens* обладает высокой биосовместимостью, низкой токсичностью, безопасностью для макроорганизма и проявляет иммуномодулирующую, противовоспалительную, антикоагулянтную, противоопухолевую, гиполипидемическую, гипогликемическую, антиоксидантную активность [1]. Это открывает большие возможности конструирования препаратов для биомедицинского применения на основе фукоиданов. В то же время фукоиданы до сих пор не используются в качестве фармацевтических субстанций, адъювантов и др. В основе стратегии по их разработке находится создание стандартизованных препаратов фукоидана с установленной структурой.

Стандартизация препаратов полисахаридов бурых водорослей весьма проблематична в силу ряда причин. Так, разные виды бурых водорослей синтезируют различающиеся по строению полисахариды. Кроме того, каждый вид водоросли синтезирует характерный для него набор полисахаридов, содержащий несколько структурных типов фукоиданов, ламинаранов и альгиновых кислот. Состав и структура полисахаридов зависят от вида и сезона сбора водоросли и от ее репродуктивного статуса. Имеют значение условия процессов обработки водоросли и экстракции полисахаридов при получении биополимеров [1, 2].

Одним из подходов к решению задачи по получению структурно охарактеризованных и однородных образцов или их олигомерных фракций, сохраняющих высокую биологическую активность, является использование ферментов, деполимеризующих фукоиданы. В частности, с помощью фукоиданазы из морской бактерии *Formosa algae* KMM 3553T получен высокоочищенный продукт ферментативного гидролиза фукоидана из *Fucus evanescens* [2].

Цель работы – изучение влияния ферментативно деполимеризованного образца фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* на эффекторные функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета *in vitro* и *in vivo* в условиях антигенной нагрузки овальбумином (ОВА) в сравнении с нативным фукоиданом.

Материалы и методы

Получение и анализ образцов фукоиданов

В работе использовали два образца фукоиданов, выделенных из бурой водоросли *Fucus evanescens*: ферментативно деполимеризованное производное фукоидана (образец 1) [2]

и нативный фукоидан в комплексе с полифенолами (образец 2) [3]. Для получения продукта ферментативного гидролиза (образец 1) 1 г нативного фукоидана растворяли в 98 мл раствора фермента рекомбинантной фукоиданазы FFA1 (0,001 мг/мл) из штамма морской бактерии *Formosa algae* KMM 3553^T (коллекция микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, Россия) в 0,015 М Трис-HCl буфере, pH 7,2 с добавлением 5 мМ CaCl₂ и инкубировали при 34 °C в течение 72 ч. Высокомолекулярные продукты гидролиза осаждали этанолом (1:3, v/v). Выпавший осадок центрифугировали на центрифуге 5804 R (Eppendorf, Германия) при 10000 g в течение 40 мин. Супернатант, содержащий низкомолекулярные продукты реакции, удаляли. Осадок, содержащий высокомолекулярные продукты реакции, растворяли в воде, концентрировали на ротационном испарителе Hei-VAP (Heidolph, Германия), высушивали с помощью лиофильной сушилки Иней 4 (Институт биологического приборостроения РАН, Россия) и анализировали с применением ЯМР-спектроскопии. ¹H, ¹³C-ЯМР и 2D ЯМР (COSY, TOCSY, HMBC, HSQC) спектры для растворов фукоиданов в D₂O были получены на ЯМР-спектрометрах Avance III-700 HD (Bruker BioSpin AG, Швейцария) и Avance II-500 HD (Bruker, Германия) с рабочей частотой 700 и 500 МГц при температуре 37 °C.

Содержание общих сахаров в образцах фукоиданов определяли фенол-сернокислотным методом [4]. Концентрацию общих сахаров рассчитывали по соответствующим калибровочным кривым, используя как стандарт L-фукозу (Sigma-Aldrich, Германия). Содержание сульфатных групп в полисахаридах оценивали с помощью турбидиметрического метода [5]. Моносахаридный состав продуктов кислотного гидролиза определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-20A (Shimadzu, Япония) с использованием колонки Shim-pack ISA-07/S2504, 0,4×25 см (Shimadzu, Япония) при 60 °C. Обнаружение проводили бицинхонинатным методом [6]. Моносахариды (L-фукозу (L-Fuc), D-галактозу (D-Gal), D-ксилозу (D-Xyl), D-маннозу (D-Man), D-глюкозу (D-Glc) и ламинарибиозу (Sigma-Aldrich, Германия) использовали в качестве стандартов.

По результатам анализа данных ЯМР-спектроскопии образец 1 представляет собой регулярный полисахарид с повторяющимся дисахаридным звеном [$\rightarrow 3$]- α -L-Fucp(2,4-SO₃⁻)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Fucp(2-SO₃⁻)-(1 $\rightarrow$)]_n, сульфатированный преимущественно по C2 и в меньшей мере по C4, ацетильные группы находятся в положении C4 [2]. Нативный фукоидан состоит из 1 $\rightarrow$ 3- и 1 $\rightarrow$ 4-связанных остатков α -L-фукозы и сульфатирован

Таблица 1. Характеристики полисахаридов из бурой водоросли *Fucus evanescens*
Table 1. Characteristics of polysaccharides from the brown alga *Fucus evanescens*

Полисахарид <i>Polysaccharide</i>	Mw, kDa	SO ₃ Na, %	Нейтральные сахара, моль % <i>Neutral sugars, mol %</i>				
			Fuc	Gal	Xyl	Man	Glc
Ферментативно деполимеризованный фукоидан (образец 1) <i>Enzymatically depolymerised fucoidan (sample 1)</i>	50,8	29,7 ^a	97,8	2,2	0	0	0
Нативный фукоидан (образец 2) <i>Native fucoidan (sample 2)</i>	130–430	27,0 ^a	94,1	3,8	2,1	0	0

Примечание. Fuc – L-фукоза, Gal – D-галактоза, Xyl – D-ксилоза, Man – D-манноза, Glc – D-глюкоза.

^a Процент от массы образца.

Note. Fuc–L-fucose, Gal–D-galactose, Xyl–D-xylose, Man–D-mannose, Glc–D-glucose.

^a Percent by weight of the sample.

главным образом по C2 и в меньшей степени по C4, ацетильные группы занимают свободное положение при C4. Нативный фукоидан содержит минорные остатки моносахаридов, такие как галактоза и ксилоза. Молекулярная масса образца 1 составляет 50,8 кДа, для образца 2 – находится в интервале 130–430 кДа (табл. 1) [2, 3].

Экспериментальные исследования образцов фукоиданов *in vitro*

Для исследования фукоиданов *in vitro* использовали образцы венозной крови пяти условно здоровых доноров, стабилизированной гепарином (25 Ед/мл). Фукоиданы вносили в концентрации 100 мкг/мл, овальбумин (ОВА) (EndoFit™ Ovalbumin, InvivoGen Европа, США) – в концентрации 10 мг/мл. В качестве контролей служили: образец фукоидана 2 (контроль 1), ОВА (контроль 2), фосфатный буферный раствор (ФБР) (контроль 3). Культивирование проводили в полной питательной среде (RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 ммоль L-глутамин и 20 мг гентамицина) в CO₂-инкубаторе при 37 °C в течение 24 ч.

Уровень экспрессии клеточных маркеров определяли с использованием меченных флуорохромами моноклональных антител к маркерам клеточной дифференцировки (CD) – молекулам CD16, CD25, CD69, CD62L, CD11b, CD56^{bright} и HLA-DR (Beckman Coulter, США) и соответствующих изотипических контролей на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, США). Данные анализировали, используя программное обеспечение BD CellQuest Pro (Becton Dickinson, США). Жизнеспособность клеток оценивали путем окрашивания 7-аминоактиномицином D. Выделение субпопуляций

гранулоцитов (основную часть которых составляют нейтрофилы) осуществляли по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. Моноциты дифференцировали от других клеток по параметрам FSC и SSC, а также по экспрессии клетками молекул CD14. NK-клетки идентифицировали как субпопуляцию лимфоцитов CD3–CD56⁺. Лимфоциты анализировали по параметрам FSC и SSC, а также по экспрессии молекул CD3 для Т-клеток и по экспрессии CD19 или CD20 для В-клеток. В каждой пробе анализировали не менее 1×10⁴ клеток. Результаты измерения представляли в виде среднего количества клеток (в %), экспрессирующих соответствующие маркеры, или показателя средней интенсивности флуоресценции (MFI – mean fluorescence intensity), который косвенно отражает количество молекул, экспрессированных на клеточной мембране.

Экспериментальные исследования образцов фукоиданов *in vivo*

Экспериментальные исследования *in vivo* выполнены на мышах-самцах линии BALB/c массой 18–20 г, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино» и адаптированных в виварии ФГБНУ «Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора. Работу проводили с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях»¹. По окончании эксперимента животных эвтаназировали с использованием эфирного наркоза. Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен

¹ European convention for protection of vertebrate animals used in experimental and other studies. ETS No 123. Strasbourg; 1986.

Этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 14.03.2019).

Были сформированы 4 группы по 10–12 мышей в каждой для проведения иммунизации: группа 1 — композицией ОВА с ферментативно деполимеризованным фукоиданом (образец 1); группа 2 — ОВА с нативным фукоиданом (образец 2); группа 3 — ОВА с гидроксидом алюминия; группа 4 (контроль) — ОВА с ФБР. ОВА использовали в дозе 100 мкг/мышь, фукоиданы — в дозе 5 мг/мышь. Суспензию ОВА с фукоиданами или с гидроксидом алюминия готовили путем смешивания или адсорбции на геле гидроксида алюминия в течение 1 ч. В качестве растворителя использовали ФБР pH 7,2.

Иммунизацию осуществляли внутрибрюшинно трехкратно с интервалом 2 недели (0, 14, 28 сут). Через 35 сут от начала иммунизации проводили отбор крови из сонных артерий и получали сыворотку, которую хранили при минус 70 °С. В сыворотке крови определяли уровень специфических антител IgG, IgG1 и IgG2a с применением тест-системы (Mouse Anti-OVA IgG, IgG1 and IgG2a Antibody Assay Kit, Chondrex Inc., США) и выражали в десятичных логарифмах концентрации (lg [концентрация], мкг/мл). Уровень цитокинов (IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12) в сыворотке крови мышей определяли с применением тест-систем Mouse Platinum ELISA (eBioscience, Австрия). Результаты измеряли на микропланшетном спектрофотометре Multiscan RC (Labsystems, Финляндия) при 450 нм.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Выборочные параметры, используемые в таблицах, имеют следующие обозначения: медиана (*Me*), минимальное и максимальное значения (*min–max*), объем анализируемой подгруппы (*n*), достигнутый уровень значимости (*p*). Оценку различий в связанных группах проводили с использованием критерия Вилкоксона, между двумя независимыми группами — Манна–Уитни (в экспериментах *in vitro*). Результаты экспериментов *in vivo* представлены в виде среднего арифметического (*M*) $\pm$ стандартное отклонение (δ). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния фукоиданов на экспрессию клеточных маркеров *in vitro* вы-

явлены существенные изменения (табл. 2). Показано изменение функционального состояния нейтрофилов, что проявлялось в повышении уровня экспрессии молекул активации CD69 и молекул адгезии CD11b, относящихся к семейству β 2-интегринов, и снижении за счет слушивания с клеточной поверхности молекулы CD62L (L-селектин) по сравнению с контролем 3 (ФБР) или по сравнению с клетками, инкубированными с ОВА (контроль 2) ($p < 0,05$).

Активация моноцитов под действием фукоиданов сопровождалась повышением уровня экспрессии молекул ранней (CD69) и поздней (HLA-DR) активации по сравнению с контролем 3 (ФБР) ($p < 0,05$). Наиболее выраженные изменения функционального состояния нейтрофилов и моноцитов регистрировались при совместном культивировании образца 1 с ОВА по сравнению с контролем 3 (ФБР) или по сравнению с контролем 2 (ОВА) ($p < 0,05$) (табл. 2).

В популяции NK-клеток под влиянием фукоиданов усиливалась экспрессия молекул CD16 по сравнению с контролем 3 (ФБР) и CD56^{bright} по сравнению с контролями 2 и 3 (ФБР и ОВА) ($p < 0,05$). Под влиянием образцов фукоидана повышался уровень экспрессии молекул HLA-DR по сравнению с контролем 3 (ФБР) ($p < 0,05$), что свидетельствует об активации и повышении цитотоксического потенциала NK-клеток, являющихся основным компонентом системы врожденного иммунитета и играющих важную роль в элиминации клеток, инфицированных вирусами, а также опухолевых клеток [7, 8].

При инкубировании образцов крови с фукоиданами или с комбинацией ферментативно деполимеризованного фукоидана (образец 1) с ОВА в популяции Т-лимфоцитов повышалась экспрессия маркеров активации (CD69, CD25, HLA-DR) по сравнению с контролем 3 (ФБР) ($p < 0,05$), в то время как по отношению к контролю 2 (ОВА) различия касались лишь отдельных показателей. Аналогичная тенденция наблюдалась и в отношении экспрессии маркеров CD69 и CD25 В-клетками (табл. 2).

Таким образом, активирующий эффект ОВА на исследуемые популяции клеток проявлялся незначительно, тогда как при его совместном инкубировании с фукоиданом степень активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета усиливалась в значительной мере. При этом эффекты нативного фукоидана (образец 2) на экспрессию маркеров активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета были сопоставимы с эффектами ферментативно деполимеризованного фукоидана (образец 1).

Таблица 2. Влияние образцов фукоидана на экспрессию маркеров активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета
Table 2. Effects of fucoidan samples on activation marker expression by innate and adaptive immunity cells

Субпопуляция клеток <i>Cell subpopulation</i>	Маркер активации (единицы измерения) <i>Activation marker (measurement units)</i>	Фукоидан, образец 1 <i>Fucoidan, sample 1</i>	Фукоидан, образец 1 + ОВА <i>Fucoidan, sample 1 + OVA</i>	Контроль <i>Control</i>		
				Фукоидан, образец 2 (контроль 1) <i>Fucoidan, sample 2 (control 1)</i>	ОВА (контроль 2) <i>OVA (control 2)</i>	ФБР (контроль 3) <i>PBS (control 3)</i>
Нейтрофилы <i>Neutrophils</i>	CD69 (MFI)	26,8** (19–36)	39,6** (18–63)	33,2** (14–54)	14,7 (8–22)	10,3 (4–17)
	CD62L (MFI)	11,5** (8–17)	12,4** (7–19)	13,8** (8–21)	43,1 (27–60)	39,0 (22–8)
	CD11b (MFI)	2621** (1738–3670)	2819** (2332–3934)	2706** (1839–3631)	1959* (1298–2653)	1023 (802–1264)
Моноциты <i>Monocytes</i>	CD69 (MFI)	454,1** (230–680)	624,1** (311–938)	555,4** (243–869)	40,9* (19–61)	28,7 (9–49)
	CD62L (MFI)	7,4** (5–11)	9,6** (5–16)	10,9** (4–17)	28,6 (12–46)	27,8 (11–45)
	HLA-DR (MFI)	161* (112–206)	208* (134–295)	194* (129–278)	158* (98–199)	91 (64–121)
NK-клетки <i>NK cells</i>	CD16 (MFI)	56,9* (34–82)	68,4* (42–96)	47,6* (23–73)	46,9* (28–66)	37,5 (25–51)
	CD56 ^{bright} (%)	8,4** (4–13)	14,9** (10–19)	13,0** (6–21)	4,7 (2–9)	5,9 (3–10)
	HLA-DR (%)	4,7^ (3,0–6,4)	9,2** (5,1–14,2)	8,4** (6,2–10,5)	4,4 (2,8–6,9)	4,2 (2,1–6,7)
Т-лимфоциты (CD3 ⁺) <i>T-cells (CD3⁺)</i>	CD69 (%)	31,4** (19–45)	36,2** (16–59)	26,9** (13–41)	14,1 (9–19)	3,2 (1–5)
	CD25 (%)	9,1* (6,2–14,1)	15,1** (9,2–20,8)	6,4 (4,1–8,8)	7,8 (4,4–11,8)	5,9 (3,7–7,9)
	HLA-DR (%)	6,4* (4,2–8,9)	8,9** (3,3–14,3)	5,4 (3,2–9,0)	4,9 (3,4–8,1)	4,1 (2,1–6,9)
В-лимфоциты (CD20 ⁺) <i>B-cells (CD20⁺)</i>	CD69 (%)	25,1* (18,5–28,4)	34,4** (21,9–44,4)	28,7** (16,4–32,6)	14,5 (7,2–21,1)	11,3 (6,2–14,2)
	CD25 (%)	6,6* (4,9–9,5)	10,2* (6,1–13,8)	5,8* (3,3–8,2)	6,9* (4,4–9,1)	2,3 (1,2–3,5)

Примечание. ОВА – овалбумин, ФБР – фосфатный буферный раствор, MFI – среднее значение интенсивности флуоресценции. Значения представлены в виде показателя медианы *Me* и в скобках – min–max (*n*=5). * *p*<0,05 – значимость различий показателей по отношению к контролю 3 (ФБР); # *p*<0,05 – значимость различий показателей по отношению к контролю 2 (ОВА), ^ *p*<0,05 – значимость различий показателей образца фукоидана 1 по сравнению с образцом фукоидана 2.
Note. OVA—ovalbumin, MFI—mean fluorescence intensity. The table presents median (*Me*) values with min–max ranges in brackets (*n*=5). *—compared to control 3 (PBS), *p*<0.05; #—compared to control 2 (OVA), *p*<0.05; ^—Fucoidan sample 1 compared to Fucoidan sample 2, *p*<0.05.

Описанную выше модель с применением совместного воздействия ОВА с фукоиданом на иммунные клетки или в условиях антигенной нагрузки клеток можно рассматривать в качестве модели вакцинной композиции *in vitro*.

Анализ специфического иммунного ответа *in vivo* показал, что иммунизация мышей ОВА (группа 4) приводила к незначительному повышению уровня общих IgG, тогда как под влиянием образца 1 (группа 1) содержание общего IgG увеличивалось с 1,43±0,22 до 2,48±0,41 lg

[мкг/мл] (*p*<0,05), а под влиянием образца 2 – до 2,23±0,43 lg [мкг/мл] (*p*<0,01) по сравнению с контролем (группа 4). Исследуемые образцы фукоиданов также усиливали продукцию изотипов антител IgG1 и IgG2a (*p*<0,05) (рис. 1).

Для уточнения преимущественного типа иммунного ответа рассчитывали соотношение изотипов антител IgG1/IgG2a (мкг/мл), которое составило 2,8 для каждого из испытуемых образцов. Для гидроксида алюминия этот показатель составил 23,1, что свидетельствует

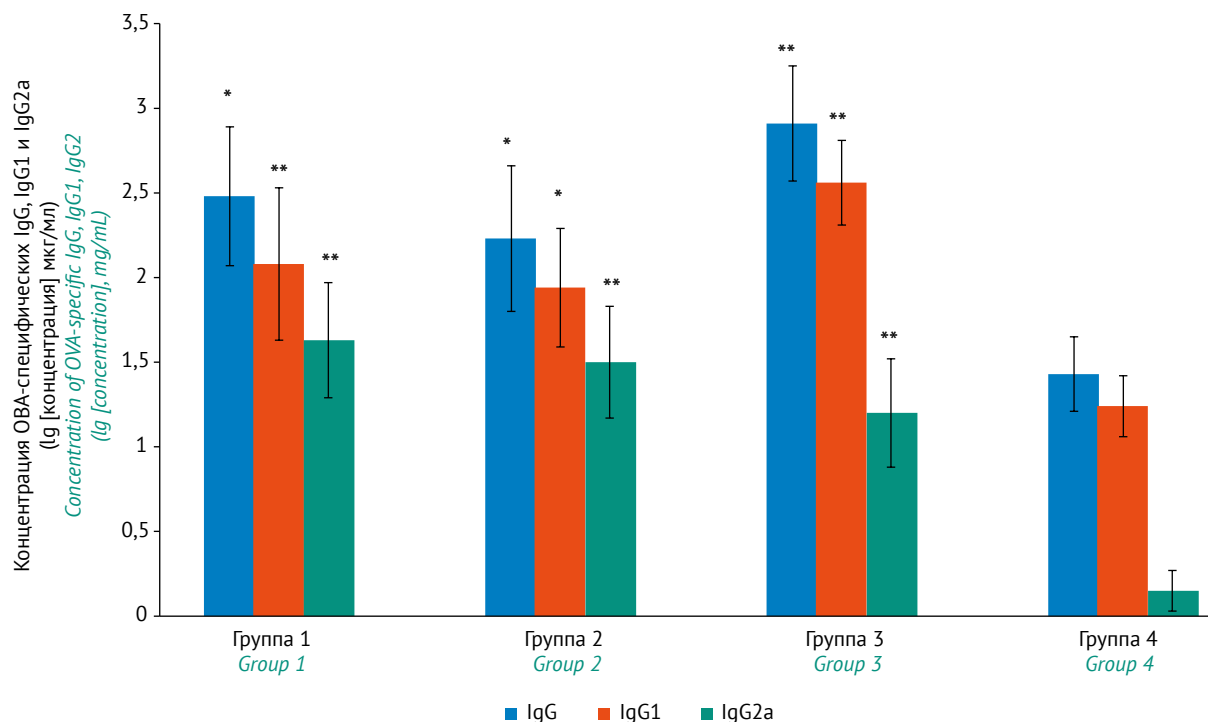


Рис. 1. Уровень овальбумин (OVA)-специфических IgG, IgG1 и IgG2a в сыворотке крови мышей после иммунизации. По оси абсцисс — группы иммунизированных животных: Группа 1 — ферментативно деполимеризованный фукоидан (образец 1) + OVA; Группа 2 — нативный фукоидан (образец 2) + OVA; Группа 3 — гидроксид алюминия + OVA; Группа 4 — OVA (контроль). В легенде представлены изотипы антител. Данные гистограмм представлены в виде показателя $M \pm \delta$ ($n=6$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ — различия значимы по отношению к контролю (OVA).

Fig. 1. Serum levels of ovalbumin (OVA)-specific IgG, IgG1, and IgG2a in immunised mice. The X-axis lists the groups of immunised animals: Group 1—enzymatically depolymerised fucoidan (sample 1) + OVA; Group 2—native fucoidan (sample 2) + OVA; Group 3—aluminum hydroxide + OVA; Group 4—OVA (control). The legend specifies antibody isotypes. Bars show data as $M \pm \delta$ ($n=6$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ —compared to the control (OVA).

о преимущественном развитии иммунного ответа по Th2-типу.

В сыворотке крови мышей, иммунизированных композициями OVA с обоими образцами фукоиданов (группа 1 и группа 2) наблюдалось усиление продукции IFN- γ ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (группа 4), тогда как применение гидроксида алюминия в качестве адъюванта (группа 3) не оказывало влияния на уровень IFN- γ ($p > 0,05$). Уровень IL-2 под влиянием образцов фукоидана 1 и 2 значимо отличался от показателей в контроле (OVA) ($p < 0,05$), под влиянием гидроксида алюминия эти различия не были значимы ($p > 0,05$). Такая же тенденция выявлена в отношении регуляторного цитокина IL-12. В отношении IL-10 стимулирующее влияние образца 1 носило характер тенденции, а под влиянием образца 2 и гидроксида алюминия выявлено усиление продукции IL-10 по сравнению с контролем (группа 4) ($p < 0,05$) (рис. 2).

В последние годы в результате активного изучения сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей (фукоиданов) и других природных и синтетических соединений

полисахаридной природы выявлены их иммуноадьювантные свойства [9–13]. Несмотря на высокую биологическую активность и низкую токсичность, фукоиданы до сих пор не применяются в качестве фармацевтических субстанций. Однако широкие исследования, направленные на получение стандартизованных препаратов и на изучение терапевтического и иммуноадьювантного протенциала фукоиданов, продолжаются.

В данной работе проведено исследование иммуноадьювантных свойств ферментативно деполимеризованного фукоидана в сравнении с нативным фукоиданом, который, в отличие от нативного, характеризуется регулярной воспроизводимой структурой. Проведенное исследование показало, что применение модифицированного фукоидана способствовало повышению уровня активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета в условиях антигенной нагрузки и стимулировало развитие специфического гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных OVA, усиливая уровень продукции как общих IgG, так и изоти-

пов IgG1 и IgG2a, а также продукцию цитокинов Th1-типа (IFN- γ , IL-2) и Th2-типа (IL-10).

Иммунный ответ на антигены различной природы реализуется в реакциях клеточного и гуморального иммунитета. С развитием клеточного иммунитета коррелирует Th1-иммунный ответ, выражающийся продукцией цитокинов TNF- β , IFN- γ , IL-2 и усиленной выработкой IgG2a, IgG2b, IgG3 у мышей [14], а с развитием гуморального иммунитета — Th2-иммунный ответ, который характеризуется продукцией преимущественно противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10, IL-3, IL-5 и IgG1 [15–17]. Адьюванты в составе вакцинных препаратов определяют поляризацию иммунного ответа по Th1- или Th2-типу в зависимости от природы антигена [15]. Как известно, адьюванты на основе гидроксида алюминия инициируют поляризацию иммунного ответа в сторону Th2-типа, отвечающего за выработку антител [18], что и следует из полученных нами результатов. Учитывая тот факт, что при вирусных и многих микробных инфекциях более эффективным является иммунный ответ по Th1-типу, существует потребность в разработке новых

эффективных и безопасных адьювантов, отвечающих этим требованиям.

Полученные в работе результаты продемонстрировали, что под влиянием обоих образцов фукоиданов из *F. evanescens* у иммунизированных ОВА мышей линии BALB/c наблюдалось значительное увеличение титров всего спектра исследуемых антител (IgG, IgG1, IgG2a), а также усиление продукции цитокинов Th1-типа (IFN- γ , IL-2) и Th2-типа (IL-10). Таким образом, исследованные образцы фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* обладают значительным адьювантным потенциалом для усиления как клеточного, так и гуморального иммунного ответа.

Заключение

Исследованные образцы фукоидана (нативного и ферментативно деполимеризованного) из бурой водоросли *F. evanescens* обладают иммуоадьювантной активностью, стимулируя формирование смешанного Th1/Th2 иммунного ответа в условиях иммунизации антигеном (овальбумин). Адьювантное действие связано с усилением продукции цитокинов,

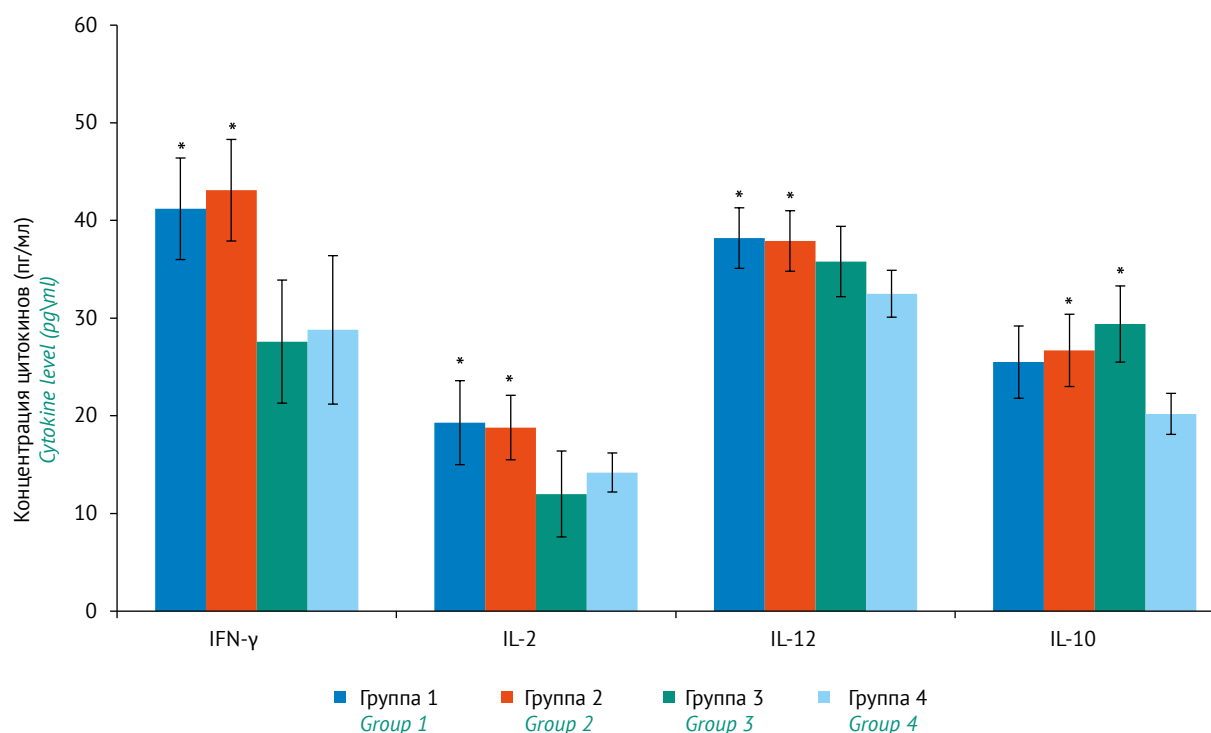


Рис. 2. Влияние образцов фукоидана на продукцию цитокинов в сыворотке крови иммунизированных мышей. По оси абсцисс — наименование цитокина. В легенде указаны группы иммунизированных животных: Группа 1 — ферментативно деполимеризованный фукоидан (образец 1) + овальбумин (ОВА); Группа 2 — нативный фукоидан (образец 2) + ОВА; Группа 3 — гидроксид алюминия + ОВА; Группа 4 — ОВА (контроль). Данные гистограмм представлены в виде показателя $M \pm \delta$ ($n=6$). * $p < 0,05$ — значимость различий показателей в сравнении с контролем (ОВА).

Fig. 2. Effects of fucoidan samples on serum cytokine production in immunised mice. The X-axis specifies the cytokines. The legend lists the groups of immunised animals: Group 1—enzymatically depolymerised fucoidan (sample 1) + OVA; Group 2—native fucoidan (sample 2) + OVA; Group 3—aluminum hydroxide + OVA; Group 4—OVA (control). Bars show data as $M \pm \delta$ ($n=6$). * $p < 0.05$ —compared to the control (OVA).

активацией клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета, что свидетельствует об усилении эффекторных функций. Активирующее влияние ферментативно деполимеризованного производного фукоидана с регулярной структурой на эффекторные функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета не уступает таковому у нативного

образца фукоидана. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что структурно охарактеризованный модифицированный фукоидан, полученный путем ферментативного гидролиза, может являться эффективным и безопасным кандидатом в адъюванты для широкого спектра профилактических и терапевтических вакцин.

Литература/References

1. Menshova RV, Shevchenko NM, Imbs TI, Zvyagintseva TN, Malyarenko OS, Zaporoshets TS, et al. Fucoidans from Brown Alga *Fucus evanescens*: structure and biological activity. *Front Marine Sci.* 2016;3:1–9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00129>
2. Silchenko AS, Rasin AB, Kusaykin MI, Malyarenko OS, Shevchenko NM, Zueva AO, et al. Modification of native fucoidan from *Fucus evanescens* by recombinant fucoidanase from marine bacteria *Formosa algae*. *Carbohydr Polym.* 2018;193:189–95. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.094>
3. Anastyuk SD, Shevchenko NM, Dmitrenok PS, Zvyagintseva TN. Structural similarities of fucoidans from brown algae *Silvetia babingtonii* and *Fucus evanescens*, determined by tandem MALDI-TOF mass spectrometry. *Carbohydr Res.* 2012;358:78–81. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.06.015>
4. Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature.* 1951;168(4265):167. <https://doi.org/10.1038/168167a0>
5. Dodgson KS, Price RG. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem J.* 1962;84(1):106–10. <https://doi.org/10.1042/bj0840106>
6. Waffenschmidt S, Jaenicke L. Assay of reducing sugars in nanomole range with 2,2-bicinchoninate. *Anal Biochem.* 1987;165(2):337–40. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90278-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90278-8)
7. Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood.* 2013;121(18):3599–608. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-425397>
8. Ahmad F, Tufa DM, Mishra N, Jacobs R, Schmidt RE. Terminal differentiation of CD56(dim)CD16(+) natural killer cells is associated with increase in natural killer cell frequencies after antiretroviral treatment in HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2015;31(12):1206–12. <https://doi.org/10.1089/aid.2015.0115>
9. Kuznetsova TA, Persyanova EV, Ermakova SP, Khotimchenko MYu, Besednova NN. The sulfated polysaccharides of Brown Algae and products of their enzymatic transformation as potential vaccine adjuvants. *Nat Prod Com.* 2018;13(8):1083–95. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300837>
10. Zhang W, Oda T, Yu Q, Jin JO. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Mar Drugs.* 2015;13(3):1084–104. <https://doi.org/10.3390/md13031084>
11. Kim SY, Joo HG. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J Vet Sci.* 2015;16(2):145–50. <https://doi.org/10.4142/jvs.2015.16.2.145>
12. Ikewaki N, Dedeepeya VD, Raghavan K, Rao KS, Vaddi S, Osawa H, et al. β -glucan vaccine adjuvant approach for cancer treatment through immune enhancement (B-VACCIN) in specific immunocompromised populations (Review). *Oncol Rep.* 2022;47(1):14. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8225>
13. Pifferi C, Fuentes R, Fernández-Tejada A. Natural and synthetic carbohydrate-based vaccine adjuvants and their mechanisms of action. *Nat Rev Chem.* 2021;5(3):197–216. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-00244-3>
14. Seder RA, Hill AV. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature.* 2000;406(6797):793–8. <https://doi.org/10.1038/35021239>
15. McKee AS, Munks MW, Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity.* 2007;27(5):687–90. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.003>
16. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.* 2010;33(4):492–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
17. Mathers AR, Cuff CF. Role of interleukin-4 (IL-4) and IL-10 in serum immunoglobulin G antibody responses following mucosal or systemic reovirus infection. *J Virol.* 2004;78(7):3352–60. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.7.3352-3360.2004>
18. Gherardi RK, Eidi H, Crépeaux G, Authier FJ, Cadusseau J. Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines. *Front Neurol.* 2015;6:4. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00004>

Вклад авторов. Т.А. Кузнецова — планирование и проведение экспериментов *in vitro* и *in vivo*, интерпретация результатов, написание и оформление текста рукописи; Т.П. Смолина — проведение цитометрических исследований и интерпретация результатов; Е.В. Персиянова — проведение экспериментов *in vivo*;

Authors' contribution. Т.А. Kuznetsova—planning and execution of *in vitro* and *in vivo* experiments, interpretation of the results, writing and formatting of the text of the manuscript; Т.П. Smolina—performance of cytometric analyses and interpretation of the results; Е.В. Persyanova—execution of *in vivo* experiments; Л.А. Ivanushko—

Л.А. Иванушко — проведение экспериментов *in vivo*; **А.С. Сильченко** — выделение и анализ образцов фукоидана; **С.П. Ермакова** — выделение и анализ образцов фукоидана; **Н.Н. Беседнова** — интерпретация результатов, редактирование текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен этическим комитетом «Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 14.03.2019).

Благодарности. Работа выполнена в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 2019/№ 0545-2019-0006.

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

execution of *in vivo* experiments; **A.S. Silchenko**—isolation and analysis of fucoidan samples; **S.P. Ermakova**—isolation and analysis of fucoidan samples; **N.N. Besednova**—interpretation of the results, editing of the text of the manuscript.

Ethics approval. The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (Protocol No. 1 dated 14.03.2019).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out by G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology as part of publicly funded research project 2019/No. 0545-2019-0006 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

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

Об авторах / Authors

Кузнецова Татьяна Алексеевна, д-р мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-6959>
takuznets@mail.ru

Смолина Татьяна Павловна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4505-3627>
tsmol@mail.ru

Персиянова Елена Викторовна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5686-8672>
helen-pers@yandex.ru

Иванушко Людмила Александровна, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9525-668X>
L.iva_57@mail.ru

Сильченко Артем Сергеевич, канд. хим. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3502-5692>
artem.silchencko@yandex.ru

Ермакова Светлана Павловна, д-р хим. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5905-2046>
swetlana_e@mail.ru

Беседнова Наталия Николаевна, д-р мед. наук, проф., акад. РАН. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2760-9778>
besednoff_lev@mail.ru

Tatyana A. Kuznetsova, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-6959>
takuznets@mail.ru

Tatyana P. Smolina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4505-3627>
tsmol@mail.ru

Elena V. Persyanova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5686-8672>
helen-pers@yandex.ru

Ludmila A. Ivanushko, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9525-668X>
L.iva_57@mail.ru

Artem S. Silchenko, Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3502-5692>
artem.silchencko@yandex.ru

Svetlana P. Ermakova, Dr. Sci. (Chem.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5905-2046>
swetlana_e@mail.ru

Natalya N. Besednova, Dr. Sci. (Med.), Professor, Acad. of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2760-9778>
besednoff_lev@mail.ru

Поступила 29.03.2022

После доработки 18.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Received 29 March 2022

Revised 18 August 2022

Accepted 26 August 2022

УДК 615.371:615.07

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-318-330>

Научная статья | Scientific article



Оценка сопоставимости результатов определения тиомерсала колориметрическим методом и методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах

О.Н. Колесникова , В.Е. Трегубова, О.Б. Устинникова, А.А. Мовсесянц

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

✉ Колесникова Оксана Николаевна; kolesnikovao@expmed.ru

Резюме

Количественное определение консерванта тиомерсала, входящего в состав ряда иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), является обязательным требованием к их качеству. Ранее нами была разработана методика количественного определения тиомерсала в несорбированных ИЛП, основанная на методе атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (методика ААС ХП). **Цель работы:** анализ возможности применения методики ААС ХП для количественной оценки содержания тиомерсала в сорбированных препаратах и оценка сопоставимости результатов количественного определения тиомерсала, полученных с помощью колориметрической методики и методики ААС ХП. **Материалы и методы:** государственный стандартный образец содержания ионов ртути; фармацевтический стандартный образец (ФСО) содержания мертиолята в сорбированных препаратах (ФСО 3.1.00427); образцы сорбированных ИЛП различных производителей (АКДС-вакцина, препараты анатоксинов, вакцины против гепатита В и гриппа, комбинированные вакцины). Исследование проводили с применением колориметрической методики в реакции с дитионом и методики ААС ХП. **Результаты:** полученные с использованием методики ААС ХП значения относительного стандартного отклонения (3,95%) и коэффициента корреляции «объем образца – содержание тиомерсала» (0,9956) подтверждают специфичность методики; регрессионный анализ и полученное значение F -критерия Фишера, равное 0,16, свидетельствуют об отсутствии систематической ошибки методики. Диапазон процента выявления добавленного количества тиомерсала, не превышающий 10%, свидетельствует об удовлетворительной правильности методики. Установлена чувствительность методики ААС ХП: предел количественного определения и предел обнаружения ионов ртути в образце составили $6,9 \times 10^{-3}$ и $2,3 \times 10^{-3}$ мкг/мл соответственно. Значение критерия Фишера (1,29), полученное при оценке сопоставимости результатов определения тиомерсала колориметрической методикой и методикой ААС ХП, ниже табличного значения (3,96). **Выводы:** подтверждена возможность применения методики ААС ХП для количественного определения тиомерсала в сорбированных ИЛП. Установленный предел обнаружения методики позволяет оценивать остаточные количества тиомерсала в полупродуктах при производстве бесконсервантных форм ИЛП. Оценка сопоставимости результатов определения тиомерсала колориметрической методикой и методикой ААС ХП, проведенная с применением однофакторного дисперсионного анализа по критерию Фишера, показала возможность применения ФСО 3.1.00427 для контроля стабильности аналитической работы при воспроизведении методики ААС ХП.

© О.Н. Колесникова, В.Е. Трегубова, О.Б. Устинникова, А.А. Мовсесянц, 2022

Ключевые слова: тиомерсал; консервант; атомно-абсорбционная спектрометрия; иммунобиологические лекарственные препараты; сорбированные препараты

Для цитирования: Колесникова О.Н., Трегубова В.Е., Устинникова О.Б., Мовсисянц А.А. Оценка сопоставимости результатов определения тиомерсала колориметрическим методом и методом атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):318–330. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-318-330>

Comparability assessment of the results of thiomersal quantification in adsorbed immunobiological medicinal products by colourimetry and by cold vapor atomic absorption spectrometry

O.N. Kolesnikova ✉, V.E. Tregubova, O.B. Ustinnikova, A.A. Movsesyants

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

✉ Oksana N. Kolesnikova; kolesnikovao@expmed.ru

Abstract

To ensure the quality of immunobiologicals, it is required to quantify the thiomersal preservative present in a number of them. The authors have previously developed an analytical procedure for thiomersal quantification in non-adsorbed immunobiological medicinal products, which is based on cold vapor atomic absorption spectrometry (CV AAS). **The aim of the study** was to analyse the possibility of using the CV AAS procedure for thiomersal content determination in adsorbed immunobiologicals and evaluate the comparability of thiomersal quantification results obtained by colourimetry and CV AAS. **Materials and methods:** the study used the national reference standard of mercury ions content and the pharmacopoeial reference standard of thiomersal content in adsorbed medicinal products (PhRS 3.1.00427), as well as samples of immunobiologicals by different manufacturers: a DTP vaccine, anatoxins, hepatitis B and influenza vaccines, and combined vaccines. The study involved CV AAS and the colourimetric reaction between mercury and dithizone. **Results:** the specificity of the CV AAS procedure is demonstrated by the coefficient of variation (3.95%) and the coefficient of correlation between the test sample volume and thiomersal content (0.9956). The regression analysis and the Fisher's test value of 0.16 indicate the absence of bias. The trueness of the method is satisfactory, as the percent recovery differs from the total spiked amount by less than 10%. For the sensitivity of the CV AAS procedure, its quantification and detection limits are 6.9×10^{-3} µg/mL and 2.3×10^{-3} µg/mL, respectively. The Fisher's test value obtained in the comparability assessment of the results of thiomersal quantification by colourimetry and CV AAS (1.29) is lower than the conventional tabulated one (3.96). **Conclusions:** according to the study, it is possible to use the CV AAS procedure for thiomersal quantification in adsorbed immunobiologicals. The established detection limit allows evaluating residual amounts of thiomersal in in-process intermediates during the production of preservative-free immunobiological dosage forms. The comparability assessment of the results of thiomersal quantification by colourimetry and CV AAS, carried out using one-way ANOVA and Fisher's test, showed the possibility of using PhRS 3.1.00427 to control the consistency of operation when reproducing the CV AAS procedure.

Key words: thiomersal; preservative; atomic absorption spectrometry; immunobiologicals; adsorbed preparations

For citation: Kolesnikova O.N., Tregubova V.E., Ustinnikova O.B., Movsesyants A.A. Comparability assessment of the results of thiomersal quantification in adsorbed immunobiological medicinal products by colourimetry and by cold vapor atomic absorption spectrometry. *БИОпрепараты. Профилактика,*

diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2022;22(3):318–330.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-318-330>

Введение

Тиомерсал (мертиолят) — ртутьорганическое соединение, обладающее антисептическими и инактивирующими свойствами, разрешенное к использованию в качестве консерванта при производстве иммунобиологических препаратов (ИЛП). Наличие консерванта обеспечивает защиту данных препаратов от контаминации в процессе их производства, хранения, транспортировки и применения¹.

До недавнего времени тиомерсал был самым распространенным консервантом. В настоящий момент, несмотря на то что эффективность тиомерсала в 40–50 раз выше, чем у фенола, Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США, Всемирная организация здравоохранения и другие регуляторные органы рекомендуют ограничивать его применение, чтобы уменьшить общую дозу тиомерсала, получаемого со всеми прививками² [1–9]. Кроме того, данная рекомендация связана с увеличением содержания ртути в продуктах питания, особенно морепродуктах из-за общей неблагоприятной экологической ситуации [1, 8, 9]. В настоящее время применение тиомерсала остается актуальным для многодозовых форм некоторых вакцин, в которых применение фенола невозможно из-за его инактивирующего действия на антигены³ [1, 10].

Тиомерсал входит в состав таких препаратов, как АКДС-вакцины и препараты анатоксинов, вакцины против гепатита В и гриппа, комбинированные вакцины отечественного и зарубеж-

ного производства. Содержание тиомерсала в готовых формах ИЛП находится в пределах от 30 до 120 мкг/мл² [1, 10]. Кроме готовых форм тиомерсал применяется в качестве инактивирующего агента в процессе производства и в качестве консерванта для полупродуктов препаратов, готовые формы которых имеют статус бесконсервантных⁴. Все вышеуказанные препараты, за исключением гриппозных вакцин, содержат в качестве адъюванта гель соединений алюминия в количестве от 0,35 до 1,1 мг/мл в зависимости от типа препарата.

Методики количественного определения тиомерсала в ИЛП, как правило, основаны на определении ртути. Традиционной методикой контроля количественного содержания тиомерсала является колориметрическая методика в реакции с дитизоном⁵. Однако в последнее время наблюдается тенденция перехода на более высокотехнологичные методы количественного анализа, одним из которых является элементный анализ. В качестве альтернативного способа определения тиомерсала в ИЛП может быть использован метод атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС ХП), который предполагает применение современного высокочувствительного оборудования, позволяющего частично автоматизировать анализ и увеличить пропускную способность метода, уменьшить влияние оператора на результаты анализа и обеспечить прослеживаемость работы в соответствии с требованиями к аккредитованным лабораториям⁶.

¹ Points to consider on the reduction, elimination or substitution of thiomersal in vaccines (CPMP/BWP/2517/00). EMA; 2001. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/points-consider-reduction-elimination-substitution-thiomersal-vaccines_en.pdf

Thimerosal and Vaccines. FDA; 2018. <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/ucm-096228.htm#toc>

Immunization safety review: vaccines and autism. Institute of Medicine Immunization Safety Review Committee. Washington: National Academies Press; 2004.

Global Advisory Committee on Vaccine Safety, June 2012. WHO; 2012. <https://www.who.int/publications/i/item/WER8730>

² Там же.

³ Points to consider on the reduction, elimination or substitution of thiomersal in vaccines (CPMP/BWP/2517/00). EMA; 2001. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/points-consider-reduction-elimination-substitution-thiomersal-vaccines_en.pdf

Thimerosal and Vaccines. FDA; 2018. <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/ucm-096228.htm#toc>

⁴ Points to consider on the reduction, elimination or substitution of thiomersal in vaccines (CPMP/BWP/2517/00). EMA; 2001. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/points-consider-reduction-elimination-substitution-thiomersal-vaccines_en.pdf

⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0025.18 Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁶ ГОСТ ISO/IEC17025-2019 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.

Ранее авторами была разработана методика количественного определения тиомерсала по атомарной ртути для несорбированных иммунобиологических препаратов [11]. Методика основана на методе атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (методика ААС ХП) с применением атомно-абсорбционного анализатора ртути с проточно-инжекционной системой. В процессе разработки условий пробоподготовки образцов был подобран состав реакционной смеси и режим минерализации, а также степень разведения образцов. В результате сравнительного определения тиомерсала колориметрическим методом и методом ААС ХП было выявлено отсутствие статистически значимых различий полученных данных.

Однако применение данной методики для определения тиомерсала в препаратах, содержащих адъювант — гель гидроксида алюминия, требует подтверждения ее пригодности, поскольку нельзя исключить возможное неспецифическое влияние высоких концентраций ионов алюминия на определение ионов ртути.

Кроме того, анализ сопоставимости результатов определения тиомерсала методикой ААС ХП и фармакопейной колориметрической методикой позволит решить вопрос внутрилабораторного контроля качества, а именно — оценить возможность использования фармакопейного стандартного образца (ФСО) содержания мертиолята в сорбированных препаратах (ФСО 3.1.00427), аттестованного колориметрической методикой и предназначенного для контроля стабильности аналитической работы⁷.

Цель работы — анализ возможности применения методики ААС ХП для количественной оценки содержания тиомерсала в сорбированных препаратах и оценка сопоставимости результатов количественного определения тиомерсала, полученных с помощью колориметрической методики и методики ААС ХП.

Материалы и методы

Материалы:

- государственный стандартный образец (ГСО) содержания ионов ртути (8004-93, ГДВИ.410408.009ПС);
- ФСО содержания мертиолята в сорбированных препаратах (ФСО 3.1.00427);
- тиомерсал (Sigma Aldrich, кат. № Т4687) (го-

товили растворы тиомерсала с концентрацией 50, 100, 150 мкг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе (ФБР), в растворе натрия хлорида 0,9% и в воде).

Образцы препаратов:

- образец 1: АКДС-вакцина (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата — 6);
- образец 2: АС-анатоксин (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата — 6);
- образец 3: АД-М-анатоксин (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата — 4);
- образец 4: Анатоксин стафилококковый (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, филиал «Медгамал») (число серий препарата — 4);
- образец 5: АД-анатоксин (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата — 4);
- образец 6: АД-М-анатоксин (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата — 4);
- образец 7: Бубо®-Кок, вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша и гепатита В (ЗАО МПК «Комбиотех», Россия) (число серий препарата — 2);
- образец 8: вакцина АКДС-Геп В, бесконсервантная форма (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата — 3);
- образец 9: АКДС-вакцина, бесконсервантная форма (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата — 2);
- образец 10: Тетраанатоксин (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата — 1);
- образец 11: АКДС-Геп В (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата — 1);
- образец 12: Совигрипп® (АО «НПО «Микроген», Россия) (число серий препарата — 1);
- образец 13: Ультрикс® (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России) (число серий препарата — 1).

Оборудование:

- атомно-абсорбционный анализатор ртути методом холодного пара FIMS-400 (PerkinElmer), оснащенный кварцевой абсорбционной ячейкой и проточно-инжекционной системой с программным обеспечением AAWinLab (PerkinElmer);
- спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония);
- весы аналитические XSE205 Dual Range (Mettler Toledo AG, Швейцария).

Методы

Атомно-абсорбционный метод спектроскопии холодного пара (ААС ХП) основан

⁷ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0025.18 Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

на способности восстановленных атомов ртути выделяться в виде пара [11]. Методика разработана для приборов с проточно-инжекционной системой, при помощи которой происходит смешивание испытуемых проб с реакционной смесью, в результате чего высвобождаются пары восстановленной атомарной ртути, которые, попадая в измерительную ячейку, абсорбируют ультрафиолетовое излучение при длине волны 253,7 нм. Величина абсорбции – аналитический сигнал, детектируемый прибором, который прямо пропорционален концентрации паров ртути. Реагенты для минерализации: серная кислота 50%, перманганат калия 5%, сульфат гидроксилamina 20%. Калибровочная характеристика: растворы ГСО ионов ртути с концентрациями от 10 до 40 мкг/л с шагом 5 мкг/л.

Количество тиомерсала рассчитывали по формуле (1):

$$C = \frac{X \times A \times 100}{N \times 49,55 \times 1000}, \quad (1)$$

где C – концентрация тиомерсала, мкг/мл; X – концентрация ртути, найденная по градуировочному графику, мкг/л; N – объем препарата, взятый на испытание, мкл; 1000 – пересчет концентрации в мкг/мл; 100/49,55 – коэффициент пересчета концентрации ртути на тиомерсал.

Колориметрическая методика определения тиомерсала в реакции с дитизоном основана на выделении ионов ртути и последующей реакции с дитизоном в безводной фазе с образованием комплекса дитизоната ртути⁸. Детектирование проводили при длине волны 597 нм.

Для обработки полученных результатов использовали статистические методы расчета среднего арифметического, стандартного отклонения, коэффициента вариации, а также однофакторный дисперсионный анализ с расчетом критерия Фишера, сравнение двух групп данных с расчетом критерия Стьюдента, регрессионный анализ с расчетом критерия Фишера [12, 13].

Результаты и обсуждение

Количественное определение тиомерсала в сорбированных иммунобиологических препаратах с применением методики ААС ХП

Выбор рабочего диапазона методики ААС ХП при ее разработке для несорбированных препаратов был основан на чувствительности

оборудования и содержании тиомерсала в испытуемых образцах. Статистически был обоснован диапазон концентрации ионов ртути от 10 до 40 нг/мл [11]. Поскольку требование к содержанию тиомерсала для несорбированных и сорбированных препаратов совпадают, было принято решение об использовании данного диапазона.

Оптимизированная для несорбированных препаратов пробоподготовка, заключающаяся в уменьшении объема реакционной смеси по сравнению с колориметрическим методом, была использована для сорбированных препаратов, поскольку гель гидроксида алюминия подвержен минерализации в присутствии серной кислоты и перманганата калия.

В целом, за исключением наличия геля гидроксида алюминия, состав сорбированных и несорбированных препаратов не имеет существенных отличий, способных оказать влияние на метрологические характеристики методики (препараты обоих типов содержат белковый компонент, буферные растворы различного состава, а также возможно наличие остаточного формальдегида).

Для оценки возможности применения методики определения тиомерсала ААС ХП, разработанной и валидированной ранее для контроля тиомерсала в несорбированных препаратах, проводили испытания образцов, содержащих гель гидроксида алюминия в качестве адъюванта (табл. 1).

Количество тиомерсала, определяемое методикой ААС ХП в исследуемых образцах, соответствовало требованиям нормативной документации, включая образцы бесконсервантных препаратов.

Оценка специфичности методики определения тиомерсала методом ААС ХП

Оценку специфичности методики⁹, в том числе влияния геля гидроксида алюминия, на результат определения тиомерсала методом ААС ХП проводили, анализируя пробы, содержащие образец 1 (с теоретическим содержанием тиомерсала 100±15 мкг/мл и ионов алюминия около 1,0 мг/мл) в объеме от 10 до 40 мкл с шагом 5 мкл с добавлением 0,15 мл 50% раствора серной кислоты, 0,7 мл 50% раствора калия перманганата и 0,2 мл 20% раствора гидроксилamina сульфата. Общий объем

⁸ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0025.18 Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁹ Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 1. Испытание сорбированных вакцин на содержание тиомерсала с использованием методики атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара**Table 1.** Testing of adsorbed vaccines for thiomersal content by cold vapor atomic absorption spectrometry

Номер образца (количество серий) <i>Sample number (number of batches)</i>	Требование НД к содержанию тиомерсала, мкг/мл <i>Product specification requirements for thiomersal content, µg/mL</i>	Среднее значение содержа- ния тиомерсала, мкг/мл <i>Average thiomersal content, µg/mL</i>	Диапазон значений содержания, мкг/мл <i>Content range, µg/mL</i>
Образцы вакцин, содержащие тиомерсал <i>Samples of thiomersal-containing vaccines</i>			
Образец 1 (6 серий) <i>Sample 1 (6 batches)</i>	85–115	98	88,7–105,0
Образец 2 (6 серий) <i>Sample 2 (6 batches)</i>		89	85,2–94,4
Образец 3 (4 серии) <i>Sample 3 (4 batches)</i>		92	86,8–94,0
Образец 4 (4 серии) <i>Sample 4 (4 batches)</i>		95	91,6–98,9
Образец 5 (4 серии) <i>Sample 5 (4 batches)</i>		86,2	85,2–87,1
Образец 6 (4 серии) <i>Sample 6 (4 batches)</i>		85,6	85,0–86,3
Образец 7 (2 серии) <i>Sample 7 (2 batches)</i>	70–100	76	73,9–77,7
Образцы бесконсервантных вакцин <i>Samples of preservative-free vaccines</i>			
Образец 8 (3 серии) <i>Sample 8 (3 batches)</i>	Должен отсутствовать <i>No thiomersal present</i>	Ниже предела обнаружения <i>Below the detection limit</i>	–
Образец 9 (2 серии) <i>Sample 9 (2 batches)</i>		Ниже предела обнаружения <i>Below the detection limit</i>	–

Примечание. НД – нормативная документация; «–» – неприменимо.

Note. – not applicable.

реакционной смеси – 50 мл. За результат, полученный для каждой пробы, принимали среднее значение трех независимых испытаний (табл. 2, рис. 1).

Увеличение объема образца, то есть увеличение концентрации тиомерсала и геля гидроксида алюминия в составе пробы (табл. 2), приводит к возрастанию величины аналитического сигнала и не влияет на выявление содержания тиомерсала в пересчете на разведение образца. При этом полученное относительное стандартное отклонение 3,95 соответствует относительному стандартному отклонению методики, полученному в ходе ее разработки для несорбированных препаратов – 3,94 [11].

В то же время регрессионная зависимость величины аналитического сигнала от объема образца (содержания тиомерсала в пробе) имеет линейный характер и коэффициент корреляции 0,991 (рис. 1).

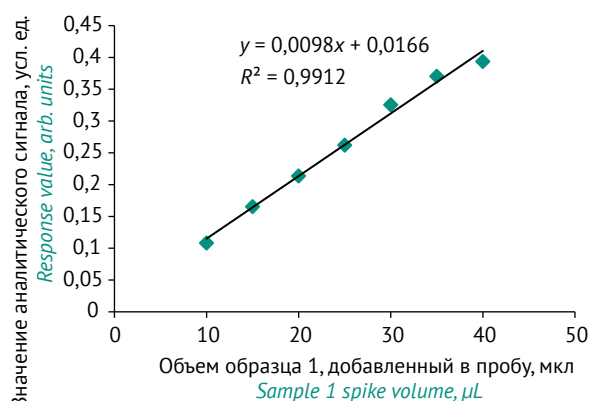


Рис. 1. Регрессионная зависимость величины аналитического сигнала от объема образца 1, полученная с использованием методики атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара.

Fig. 1. The regression curve for the relationship between the response values obtained by cold vapor atomic absorption spectrometry and the volume of sample 1 spikes in the test sample.

Таблица 2. Оценка специфичности методики определения тиомерсала методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара**Table 2.** Evaluation of the specificity of the cold vapor atomic absorption spectrometry procedure for thiomersal quantification

Объем образца 1, мкл Sample 1 volume, μL	D ($n=3$)	X , мкг/л $\mu\text{g/L}$	C , мкг/мл $\mu\text{g/mL}$	Среднее значение содержания тиомерсала, мкг/мл Average thiomersal content, $\mu\text{g/mL}$	Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, $\mu\text{g/mL}$	Относительное стандартное отклонение, % Coefficient of variation, %	r
10	0,1082	8,74	88,2	94,24	3,72	3,95	0,9956
15	0,1654	14,17	95,5				
20	0,2136	18,78	94,8				
25	0,2620	23,39	94,4				
30	0,3255	29,44	99,0				
35	0,3704	33,71	97,2				
40	0,3935	35,91	90,6				

Примечание. D — среднее значение величины аналитического сигнала ($n=3$); X — содержание ионов ртути в пробе, рассчитанное по калибровочной характеристике; C — содержание тиомерсала в образце 1 с учетом разведения; r — коэффициент корреляции «Объем образца 1 — Содержание тиомерсала, рассчитанное по калибровке».

Note. D —mean response ($n=3$); X —mercury ion content in the sample, calculated using a calibration curve; C —thiomersal content in sample 1, adjusted for the dilution; r —coefficient of correlation between the volume of Sample 1 and the thiomersal content calculated from the calibration curve.

Оценка систематической ошибки методики определения тиомерсала с применением метода ААС ХП

Доказательство отсутствия систематической ошибки находили с помощью регрессионного анализа и расчета F -критерия Фишера (рис. 2, табл. 3). Для этого строили регрессионную зависимость методом наименьших квадратов между теоретическими (x_i) и найденными (y_i) значениями концентраций тиомерсала в каждом растворе. Теоретические значения определяли методом расчета, принимая за содержание тиомерсала в образце среднее значение ($n=21$) — 94,24 мкг/л. Статистическую незначимость коэффициента сдвига (свободного члена уравнения), характеризующего систематическую ошибку метода, определяли, рассчитывая критерий Фишера по формуле (2) [14]:

$$F(P, f_1=n-1, f_2=n-2) = \frac{S_{0-1}^2(n-1) - S_{0-2}^2(n-2)}{S_{0-2}^2(n-2)}, \quad (2)$$

где S — дисперсии, полученные при обсчете зависимостей без свободного члена и со свободным членом соответственно и рассчитанные по формулам (3) и (4):

$$S_{0-1}^2 = (\sum y_i^2 - b \sum x_i y_i) / (n-1) = 0,00913855, \quad (3)$$

$$S_{0-2}^2 = (\sum y_i^2 - a \sum y_i - b \sum x_i y_i) / (n-2) = 0,00943465, \quad (4)$$

где a — свободный член регрессионной зависимости, b — коэффициент наклона, n — количество точек [13].

Критическое табличное значение при доверительной вероятности 95% со степенями свободы $f_1=6, f_2=5$ составляет $F_{\text{крит}}=4,95$. Рассчитанное значение критерия Фишера с использованием уравнения (2) — $F(95\%, f_1=6, f_2=5)=0,16$ ниже критического значения, что показывает статистическую незначимость коэффициента a и отсутствие систематической ошибки определения тиомерсала в сорбированных препаратах методикой ААС ХП с вероятностью, равной 95%.

Оценка правильности определения тиомерсала методикой ААС ХП

Оценку правильности проводили, анализируя пробы, содержащие помимо реагентов для минерализации образцы препаратов с добавлением известного количества тиомерсала (модельная смесь с известным содержанием определяемого вещества)¹⁰. Исследовали образцы сорбированных препаратов (образцы 1–4 и 10), образец несорбированного препарата 12 и растворы тиомерсала с известными концентрациями 50, 100 и 150 мкг/мл, в ФБР pH 7,2. Для каждого образца и раствора готовили пробы, содержащие 10, 20 и 40 мкг добавленного тиомерсала, и пробу без его добавления. Рассчитывали процент выявления тиомерсала. За результат, полу-

¹⁰ Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

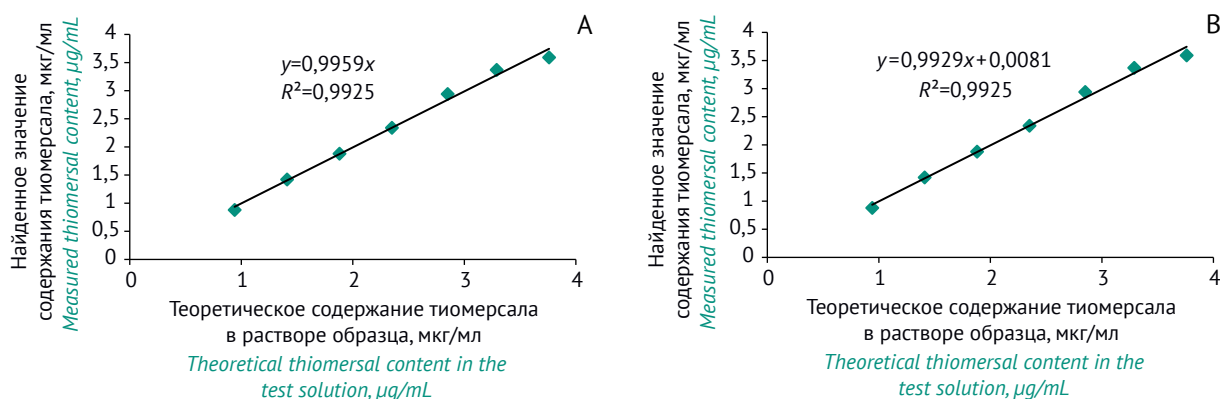


Рис. 2. Регрессионная зависимость между теоретическими (x_i) и найденными (y_i) значениями концентраций тиомерсала с использованием метода атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара, без свободного члена уравнения (А), со свободным членом уравнения (В).

Fig. 2. The regression curve for the relationship between theoretical (x_i) and measured (y_i) thiomersal concentrations obtained using cold vapor atomic absorption spectrometry, without the intercept term (A) and with the intercept term (B).

ченный для каждой пробы, принимали среднее значение трех независимых испытаний. За ожидаемое значение концентрации в исследуемом образце принимали расчетное суммарное значение концентрации: количество, найденное в образце (без добавки), и известное количество тиомерсала, добавленное в пробу (табл. 4).

Анализ результатов (табл. 4) показывает, что процент выявления тиомерсала в сорбированных образцах находится в диапазоне от 93,1 до 106,7%; процент выявления тиомерсала в несорбированном образце и растворах находится в диапазоне от 90,9 до 108,8%. Оба диапазона процента выявления не превышают 10% от ожидаемой величины. Полученные дан-

ные подтверждают, что присутствие алюминия в высоких концентрациях в сорбированных препаратах не влияет на точность количественного определения тиомерсала.

Предел количественного определения и предел обнаружения

Для подтверждения возможности применения методики ААС ХП для определения следовых количеств тиомерсала рассчитывали предел количественного определения (ПКО) и предел обнаружения (ПО) ионов ртути в образце по следующим формулам: $ПО=3,3 \times S/b$ и $ПКО=10 \times S/b$, где S – стандартное отклонение коэффициента сдвига, b – среднее арифметическое значение

Таблица 3. Оценка систематической ошибки методики определения тиомерсала с применением метода атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара

Table 3. Evaluation of the bias of the procedure for thiomersal quantification using cold vapor atomic absorption spectrometry

Растворы образца Sample solutions	Теоретическое значение содержания тиомерсала (x_i), мкг/мл Theoretical thiomersal content (x_i), µg/mL	Найденное значение содержания тиомерсала (y_i), мкг/мл Measured thiomersal content (y_i), µg/mL	Уравнения регрессионной зависимости между значениями x_i и y_i без учета (А) и с учетом (В) коэффициента сдвига Regression curve for the relationship between x_i and y_i , without the intercept (A) and with it (B)
1	0,94	0,88	$y=0,9959x$ (A) $R^2=0,9925$
2	1,41	1,42	
3	1,88	1,88	
4	2,35	2,34	$y=0,9929x+0,0081$ (B) $R^2=0,9925$
5	2,85	2,94	
6	3,29	3,37	
7	3,76	3,59	

Таблица 4. Расчет процента выявления тиомерсала в испытуемом растворе с использованием методики атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара**Table 4.** Calculation of thiomersal percent recovery from the test solution using cold vapor atomic absorption spectrometry

Исследуемый образец <i>Test sample</i>	Добавленное количество тиомерсала, мкг <i>Spiked amount of thiomersal, µg</i>	Концентрация тиомерсала в испытуемом образце, мкг/мл <i>Thiomersal concentration in the test sample, µg/mL</i>	Процент выявления, % <i>Percent recovery, %</i>
Образец 1, предварительно разведенный 1:1 <i>Sample 1, pre-diluted, 1:1</i>	0	44,7	–
	10	53,3	97,4
	20	65,3	100,9
	40	85,6	101,1
Образец 2, предварительно разведенный 1:1 <i>Sample 2, pre-diluted, 1:1</i>	0	45,5	–
	10	56,6	102,0
	20	69,8	106,6
	40	90,7	106,1
Образец 3, предварительно разведенный 1:1 <i>Sample 3, pre-diluted, 1:1</i>	0	46,1	–
	10	56,5	100,7
	20	68,0	102,9
	40	91,9	106,7
Образец 4 <i>Sample 4</i>	0	107,2	–
	10	116,1	99,1
	20	124,4	97,8
	40	141,3	96,0
Образец 10 <i>Sample 10</i>	0	89,8	–
	10	93,6	93,8
	20	105,5	96,1
	40	120,9	93,1
Образец 11 <i>Sample 11</i>	0	93	–
	10	102,2	99,2
	20	104,1	92,1
	40	120,9	90,9
Растворы тиомерсала известной концентрации в ФБР pH 7,2 <i>Thiomersal spiking solutions in PBS, pH 7.2</i>	50 мкг/мл <i>50 µg/mL</i>	53,98	108,0
	100 мкг/мл <i>100 µg/mL</i>	108,84	108,8
	150 мкг/мл <i>150 µg/mL</i>	152,52	101,7

Примечание. ФБР – фосфатно-солевой буферный раствор; «–» – неприменимо.

Note. PBS – phosphate-buffered saline; – not applicable.

коэффициента наклона калибровочной характеристики¹¹ (табл. 5).

Согласно формулам расчета методика имеет следующие характеристики:

$$ПО=0,005872 \times 3,3/0,0171=1,13 \text{ мкг/л,}$$

$$ПКО=0,005872 \times 10/0,0171=3,43 \text{ мкг/л,}$$

что в пересчете на тиомерсал составляет $2,3 \times 10^{-3}$ и $6,9 \times 10^{-3}$ мкг/мл соответственно. Таким образом, чувствительность методики подтверждает возможность ее применения для обнаружения следовых количеств тиомерсала в готовых бесконсервантных формах.

Таблица 5. Уравнения регрессионной зависимости аналитического сигнала от концентрации ионов ртути для методики атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара

Table 5. Regression equations for the relationship between the response and concentrations of mercury ions observed with cold vapor atomic absorption spectrometry

Уравнение регрессионной зависимости <i>Regression equation</i>	Коэффициент детерминации (R^2) <i>Coefficient of determination (R^2)</i>	Среднее значение углового коэффициента <i>Mean slope value</i>	Стандартное отклонение свободного члена уравнения <i>Standard deviation of the intercept</i>
$y=0,0175x+0,0253$	0,9919	0,0171	0,0059
$y=0,0166x+0,0260$	0,9923		
$y=0,0170x+0,0231$	0,9955		
$y=0,0178x+0,0171$	0,9991		
$y=0,0160x+0,0176$	0,9931		
$y=0,0178x+0,0171$	0,9960		
$y=0,0169x+0,0176$	0,9963		
$y=0,0170x+0,0130$	0,9950		
$y=0,0174x+0,0071$	0,9994		
$y=0,0170x+0,0133$	0,9979		

Таблица 6. Результаты сравнительных испытаний определения тиомерсала методикой атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара и колориметрической методикой

Table 6. Results of comparative thiomersal determinations using cold vapor atomic absorption spectrometry and colourimetry

Исследуемый образец <i>Test sample</i>	Значение содержания тиомерсала, определяемого методикой, мкг/мл <i>Thiomersal content determined by one of the following methods, µg/mL</i>		Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	RSD, %
	колориметрическая методика <i>Colourimetry</i>	методика атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара <i>Cold vapor atomic absorption spectrometry</i>		
Образец 1 <i>Sample 1</i>	109,8	114,8	3,5	3,1
Образец 2 <i>Sample 2</i>	99,6	99,5	0,1	0,1
Образец 3 <i>Sample 3</i>	102,9	94,2	6,2	6,2
Образец 10 <i>Sample 10</i>	97,7	88,2	6,4	6,9
Образец 11 <i>Sample 11</i>	89,5	92,2	1,9	2,1
Образец 12 <i>Sample 12</i>	88,2	88,8	0,4	0,5
Образец 13 <i>Sample 13</i>	102,4	105,5	2,2	2,1

¹¹ Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Сравнительный анализ результатов испытаний образцов колориметрической методикой и методикой ААС ХП

Сравнительные испытания колориметрической и ААС ХП методик проводили с применением образцов, отличающихся составом действующих и вспомогательных веществ, в том числе наличием геля гидроксида алюминия (образцы 1–3, 10, 11).

За результат содержания тиомерсала в каждом из образцов принимали среднее значение двух независимых параллельных измерений. Рассчитывали стандартное отклонение между значениями, полученными двумя методиками (табл. 6).

Результаты, представленные в таблице 6, отличаются не более чем на 6,9% для сорбированных и несорбированных препаратов. Полученные данные также подтверждают специфичность

и точность определения тиомерсала методом ААС ХП в сорбированных препаратах.

Оценка сопоставимости методик и возможности применения фармакопейного стандартного образца содержания мертиолята в сорбированных препаратах (ФСО 3.1.00427), аттестованного колориметрической методикой, для методики ААС ХП

Для оценки сопоставимости результатов определения тиомерсала использовали результаты анализа ФСО 3.1.00427, полученные колориметрической методикой и методикой ААС ХП с помощью однофакторного дисперсионного анализа, рассчитывая значение критерия Фишера. Определяли наличие статистически значимых отличий двух равнозначных выборок ($n=40$ для каждой выборки) (табл. 7).

Таблица 7. Статистические показатели при сравнительном анализе определения тиомерсала с использованием колориметрической методики и методики атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара

Table 7. Statistical indicators for the comparative analysis of thiomersal determinations using colourimetry and cold vapor atomic absorption spectrometry

Наименование статистического показателя <i>Statistical indicator</i>		Значение статистического показателя, определяемого методикой <i>Statistical indicator value determined by one of the following methods</i>	
		Методика атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара <i>Cold vapor atomic absorption spectrometry</i>	Колориметрическая методика <i>Colourimetry</i>
Среднее значение ($n=40$), мкг/мл <i>Mean ($n=40$), $\mu\text{g/mL}$</i>	$\bar{X}_{\text{ср}}$	89,06	87,80
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, $\mu\text{g/mL}$</i>	S	4,89	5,06
Дисперсия <i>Variance, $\mu\text{g/mL}$</i>	S^2	23,9	25,6
Среднее значение по двум выборкам ($n=40$ для каждой), мкг/мл <i>Mean for both methods ($n=40$ for each), $\mu\text{g/mL}$</i>	$\bar{X}_{\text{ср}}$	88,43	
Стандартное отклонение средних значений, мкг/мл <i>Standard deviation of means, $\mu\text{g/mL}$</i>	$S_{\text{ср}}$	0,89	
Дисперсия средних <i>Variance of means</i>	S^2	0,80	
Внутригрупповая дисперсия <i>Intra-group variance</i>	$S_{\text{внут}}$	24,76	
Межгрупповая дисперсия <i>Inter-group variance</i>	$S_{\text{меж}}$	31,83	
Значение критерия Фишера <i>Fisher's test value</i>	F	1,29	
Межгрупповое число степеней свободы <i>Inter-group number of degrees of freedom</i>	$V_{\text{меж}}$	1	
Внутригрупповое число степеней свободы <i>Intra-group number of degrees of freedom</i>	$V_{\text{внут}}$	78	
Табличное значение критерия Фишера (доверительная вероятность 0,95) <i>Tabulated F-value (confidence level of 0.95)</i>	$F_{\text{крит}}$	3,96	

Согласно статистическим расчетам, представленным в таблице 7, полученное экспериментальное значение критерия Фишера, равное 1,29, ниже критического табличного значения (3,96), что говорит об отсутствии статистически значимых различий между двумя выборками.

Была проведена статистическая оценка двух групп данных (результатов, полученных с применением методики ААС ХП и колориметрической методики) с помощью критерия Стьюдента, используя величины средних выборочных значений и значений выборочных дисперсий, указанных в таблице 7. Расчетная величина критерия Стьюдента составила 1,14; что при табличном значении критерия Стьюдента, равном 2,021 (для выборки $n=40$ и доверительной вероятности 0,95), также свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий между выборками.

Полученные данные сравнительного анализа подтверждают правильность определения тиомерсала методикой ААС ХП.

Таким образом, оценка сопоставимости результатов, полученных методикой ААС ХП и колориметрической методикой, подтверждает возможность использования ФСО 3.1.00427 содержания мертиолята в сорбированных препаратах, аттестованного колориметрической методикой (с диапазоном содержания тиомерсала 82,34–96,72 мкг/мл, при доверительной вероятности 0,95) при воспроизведении методики ААС ХП.

олята в сорбированных препаратах, аттестованного колориметрической методикой (с диапазоном содержания тиомерсала 82,34–96,72 мкг/мл, при доверительной вероятности 0,95) при воспроизведении методики ААС ХП.

Заключение

Подтверждена пригодность методики ААС ХП для количественного определения тиомерсала в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах. Чувствительность методики, установленная как предел обнаружения, равный $2,3 \times 10^{-3}$ мкг/мл, позволяет использовать методику для оценки остаточных количеств тиомерсала в бесконсервантных препаратах в случае применения тиомерсала в технологическом процессе на стадиях промежуточных продуктов.

Оценка сопоставимости результатов, полученных колориметрической методикой и методикой ААС ХП, подтверждает отсутствие статистически значимых различий между двумя равнозначными выборками данных. Это позволяет использовать ФСО 3.1.00427 содержания мертиолята в сорбированных препаратах для контроля стабильности аналитической работы при воспроизведении методики ААС ХП.

Литература/References

1. Baker JP. Mercury, vaccines, and autism: one controversy, three histories. *Am J Public Health*. 2008;98(2):244–53. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2007.113159>
2. Wolfe RM, Sharp LK. Anti-vaccinationists past and present. *BMJ*. 2002;325(7361):430–2. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7361.430>
3. Wiedermann U, Garner-Spitzer E, Wagner A. Primary vaccine failure to routine vaccines: why and what to do? *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(1):239–43. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1093263>
4. Sugarman SD. Cases in vaccine court—legal battles over vaccines and autism. *N Engl J Med*. 2007;357(13):1275–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMp078168>
5. Pichichero ME, Cernichiari E, Lopreiato J, Treanor J. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study. *Lancet*. 2002;360(9347):1737–41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11682-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11682-5)
6. Pichichero ME, Gentile A, Giglio N, Umido V, Clarkson T, Cernichiari E, et al. Mercury levels in newborns and infants after receipt of thiomersal-containing vaccines. *Pediatrics*. 2008;121(2):e208–14. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-3363>
7. Pichichero ME, Gentile A, Giglio N, Alonso MM, Fernandez Mentaberry MV, Zareba G, et al. Mercury levels in premature and low birth weight newborn infants after receipt of thiomersal-containing vaccines. *J Pediatr*. 2009;155(4):495–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.04.011>
8. da Cunha GK, de Matos MB, Trettim JP, Rubin BB, de Avila Quevedo L, Pinheiro KAT, et al. Thiomersal-containing vaccines and deficit in child development: population-based study in southern Brazil. *Vaccine*. 2020;38(9):2216–20. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.12.044>
9. Kern JK, Geier DA, Homme KG, Geier MR. Examining the evidence that ethylmercury crosses the blood-brain barrier. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2020;74:103312. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103312>
10. Hinman AR, Orenstein WA, Schuchat A. Vaccine-preventable diseases, immunizations, and MMWR — 1961–2011. *MMWR Suppl*. 2011;60(4):49–57.
11. Колесникова ОН, Устинникова ОБ, Рунова ОБ, Бондарев ВП. Определение мертиолята в несорбированных ИЛП методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (ААС ХП) по ионам ртути. Часть 1: отработка методики и оценка статистической значимости результатов определения ртути колориметрическим методом и методом ААС-ХП. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(2):59–63. [Kolesnikova ON, Ustinnikova OB, Runova OB, Bondarev VP. Determination of thiomersal in non-adsorbed immunobiological preparations by cold vapor atomic absorption spectroscopy (CV AAS) for the ions of mercury. Part 1: method development and evaluation of statistical significance of differences in the results of mercury ions determination by colorimetric method and

- cold vapor atomic absorption spectroscopy method. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(2):59–63 (In Russ.)]
12. Glantz SA, ed. *Primer of biostatistics*. New York: McGraw-Hill; 1992.
13. Doerffel K. *Statistik in der analytischen Chemie*. Leipzig: Dt. Verl. für Grundstoffindustrie; 1990.
14. Эпштейн НА. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2004;38(4):40–56. [Epstein NA. Suitability evaluation (validation) of HPLC methods in pharmaceutical analysis (Review). *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal* = *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2004;38(4):40–56]

Вклад авторов. **О.Н. Колесникова** — формирование цели и задач исследования, выполнение экспериментальных исследований по всем разделам рукописи, статистическая обработка данных, обсуждение результатов исследования, написание текста рукописи; **В.Е. Трегубова** — выполнение экспериментальных работ в части оценки сопоставимости методик; **О.Б. Устинникова** — концепция и дизайн исследования, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; **А.А. Мовсесянц** — концепция исследования, утверждение окончательной версии статьи 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' contribution. **O.N. Kolesnikova**—formulation of the aim and objectives of the study, execution of experiments for all article sections, statistical data processing, discussion of the study results, writing of the text of the manuscript; **V.E. Tregubova**—execution of experiments for the comparability assessment; **O.B. Ustinnikova**—elaboration of the study concept and design, discussion of the study results, editing of the text of the manuscript; **A.A. Movsesyants**—elaboration of the study concept, approval of the final version 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. A.A. Movsesyants is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Колесникова Оксана Николаевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8664-5800>
kolesnikovao@expmed.ru

Трегубова Варвара Евгеньевна, канд. хим. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6685-0847>
Tregubova@expmed.ru

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

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

Oksana N. Kolesnikova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8664-5800>
kolesnikovao@expmed.ru

Varvara E. Tregubova, Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6685-0847>
Tregubova@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 28.12.2021

После доработки 25.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Received 28 December 2021

Revised 25 August 2022

Accepted 26 August 2022

УДК 615.076:57.083.138.6:579.887

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-331-346>

Научная статья | Scientific article



Анализ стабильности стандартного образца тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230, используемого при испытании на присутствие микоплазм биологических лекарственных препаратов

С.М. Суханова, З.Е. Бердникова✉, О.В. Фадейкина, Е.М. Петручук, А.С. Тихонова

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

✉ Бердникова Зинаида Евтропиевна; Berdnikova@expmed.ru

Резюме

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) для получения достоверных результатов при проведении испытания лекарственных средств на присутствие микоплазм микробиологическим методом предварительно оценивают пригодность питательной среды с помощью стандартного образца (СО) тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230. Стабильность физико-химических свойств и аттестуемой характеристики (титра) СО сохраняется при соблюдении регламентированного температурного режима в течение одного года. Отклонения от указанных условий и транспортирование в условиях окружающей среды могут привести к изменению свойств СО и стать причиной несоответствия качества биологических лекарственных препаратов по показателю «Испытание на присутствие микоплазм». Необходимость проведения исследования не только долгосрочной стабильности материала СО, но и при возможных кратковременных отклонениях от установленных условий хранения подчеркивают и эксперты Комитета по стандартным образцам Международной организации по стандартизации, Государственной системы обеспечения единства измерений, а также Комитета экспертов ВОЗ. **Цель работы:** изучение стабильности стандартного образца тест-штамма *M. arginini* G230 при длительном хранении в регламентируемых условиях и при кратковременном воздействии повышенных температур. **Материалы и методы:** использованы СО тест-штамма *M. arginini* G230 производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, питательные среды и растворы по ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Стабильность свойств СО, включая аттестуемую характеристику (титр) определяли фармакопейными методами согласно ГФ РФ. Эксперимент проводили в условиях кратковременного воздействия на образцы двух режимов повышенных температур. Контрольные образцы хранили при температуре минус 20±2 °С. Статистическую обработку данных проводили методом предельных разведений по таблице Мак-Креди и рассчитывали среднее арифметическое значение наиболее вероятного числа микроорганизмов (НВЧ) в предельном разведении (титр). **Результаты:** показана стабильность свойств образцов СО, хранившихся в регламентируемых условиях в течение срока, превышающего срок годности (до 16 месяцев). Стабильность основных свойств СО сохраняется после воздействия повышенных температур 25±2 и 37±2 °С в течение 30 сут. Установлено снижение значения аттестованной характеристики (титра) образцов, подвергшихся воздействию температуры 37±2 °С в течение 10 и 30 сут. **Выводы:** показана возможность транспортирования образцов до 30 сут при температуре не выше 25±2 °С без изменения их качества в течение 1 года. Температурный режим 37±2 °С не может быть использован для хранения и/или транспортирования образцов СО.

Ключевые слова: тест-штамм *Mycoplasma arginini* G230; отраслевой стандартный образец (ОСО); фармацевтический стандартный образец (ФСО); «short-term stability» (кратковременная стабильность); «stability in transit» (стабильность при транспортировании); контаминация; безопасность лекарственных средств; стабильность; аттестуемая характеристика; условия транспортирования

Для цитирования: Суханова С.М., Бердникова З.Е., Фадейкина О.В., Петручук Е.М., Тихонова А.С. Анализ стабильности стандартного образца тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230, используемого при испытании на присутствие микоплазм биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):331–346. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-331-346>

Stability analysis of the reference standard of *Mycoplasma arginini* strain G230 used for testing biologicals for mycoplasmas

S.M. Sukhanova, Z.E. Berdnikova✉, O.V. Fadeikina, E.M. Petruchuk, A.S. Tikhonova

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

✉ Zinaida E. Berdnikova; Berdnikova@expmed.ru

Abstract

The State Pharmacopoeia of the Russian Federation (Ph.Rus.) requires a preparatory evaluation of culture medium suitability using the reference standard (RS) of the *Mycoplasma arginini* G230 test strain in order to ensure reliable results when testing medicines for mycoplasmas using a microbiological (culture) method. The RS retains the stability of physico-chemical properties and the certified characteristic value (titre) for one year if stored under the specified temperature conditions (-20°C to -30°C). Deviations from this range and transportation in ambient conditions can alter the properties of the RS and consequently result in biologicals substandard in terms of mycoplasmas. Experts from the Reference Materials Committee of the International Organisation for Standardisation (ISO), the State System for Ensuring the Uniformity of Measurements, and the WHO Expert Committee on Biological Standardisation emphasise the need to study the stability of RSs not only under the specified long-term storage conditions, but also with short-term deviations from such conditions. **The aim of the study** was to analyse the stability of the *M. arginini* G230 test strain RS under the specified long-term storage conditions and with short-term exposure to elevated temperatures. **Materials and methods:** the study used the RS of *M. arginini* G230 by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products and culture media and solutions required per the Ph.Rus. general chapter on mycoplasma tests (OFS.1.7.2.0031.15). The stability of RS's characteristics, including the certified value (titre), was determined using Ph.Rus. methods. The experiment involved two testing regimes with short-term exposure to elevated temperatures. Control samples were stored at $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Statistical data processing was carried out by the serial dilution method using McCrady's table with the calculation of the arithmetic mean of the most probable number (MPN) for the limiting dilution (titre). **Results:** as demonstrated in the study under the specified conditions, the RS retains its characteristics for a period exceeding its shelf life (for up to 16 months). The main characteristics of the RS remain stable after 30-day exposure to elevated temperatures ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$ and $37\pm 2^{\circ}\text{C}$). The certified value (titre) of the RS decreases after exposure to $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 10 and 30 days. **Conclusions:** the study proved the possibility of storing and transporting the RS at a temperature lower than $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ for up to 30 days with no subsequent changes to the quality within the 1-year shelf life. The conditions of $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ cannot be used for the purpose.

Key words: *Mycoplasma arginini* G230 test strain; industry reference material (IRM); pharmacopoeia reference standard (PhRS); short-term stability; stability in transit; contamination; medicinal product safety; stability; certified characteristic; transportation conditions

For citation: Sukhanova S.M., Berdnikova Z.E., Fadeikina O.V., Petruchuk E.M., Tikhonova A.S. Stability analysis of the reference standard of *Mycoplasma arginini* strain G230 used for testing biologicals for mycoplasmas. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):331–346. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-331-346>

Введение

Контаминация микоплазмами остается актуальной проблемой для производства биологических лекарственных препаратов (БЛП). Проведение испытаний, подтверждающих отсутствие микоплазм на всех этапах производства БЛП, является обязательным требованием регуляторных органов во всем мире. Оценка рисков микробного загрязнения на всех этапах производства и выявление микоплазм чувствительными методами гарантируют получение безопасных и эффективных лекарственных препаратов. Обнаружение данного вида контаминации и правильная интерпретация результатов требуют, помимо тщательного выполнения всех этапов подготовительных работ, высокого уровня квалификации персонала [1–3].

В настоящее время в соответствии с требованиями международных стандартов испытание на присутствие микоплазм проводят двумя методами: микробиологическим (культуральным) методом и цитохимическим (метод индикаторной клеточной культуры)¹.

Согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV) испытание микробиологическим методом предусматривает использование питательных сред лабораторного приготовления, чувствительность которых определяют с помощью разработанного и утвержденного в нашей стране в 1980-х гг. отраслевого стандартного образца тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230 (СО). Многолетний опыт использования свидетельствует о стабильности свойств СО тест-штамма

M. arginini G230, что обеспечивает возможность применения его для оценки качества различных партий питательных сред [4].

Принимая во внимание вариабельность сырья биологического происхождения (триптический гидролизат бычьего сердца, мясной и дрожжевой экстракты, агар микробиологический и др.), входящего в состав питательной среды, возможны ошибки при приготовлении и хранении. Способ оценки ее пригодности с обязательным подтверждением соответствия каждой партии среды установленным требованиям отвечает современным подходам к анализу рисков и позволяет повысить достоверность и сопоставимость результатов испытаний² [5].

С 1 июля 2021 г. в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации «О метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения»³ СО тест-штамма *M. arginini* G230 включен в Реестр Фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации под названием «ФСО ГФ РФ Стандартный образец тест-штамма *M. arginini* G230» и реестровым номером ФСО 3.2.00378 (СО 42-28-378)⁴. СО представляет собой лиофилизированную культуру *M. arginini* G230 с гарантированным в течение срока годности значением титра микоплазм. Согласно паспортным данным стабильность значений аттестованной характеристики СО сохраняется в течение срока годности (один год) при соблюдении условий транспортирова-

¹ 2.6.7. Mycoplasmas. European Pharmacopoeia. 10th. ed.; 2018. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018. <63> Mycoplasma tests. USP 41–NF 36.

² Руководства ICH для фармацевтической отрасли. Качество. СПб.: ЦОП «Профессия»; 2017.

³ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20.03.2020 № 202 «О Метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения» (вместе с «Положением о Метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения»). <https://legalacts.ru/doc/prikaz-minzdrava-rossii-ot-20032020-n-202-o-metrologicheskoi/>

⁴ Реестр фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации. https://www.regmed.ru/content/page/Registry-SPhRS_lemma

ния, хранения и порядка применения. Важно отметить, что регламентированным условием хранения СО является температура минус 20 ± 2 °С, а кратковременное хранение и/или транспортирование допускается при температуре от 2 до 8 °С продолжительностью не более 7 сут.

В настоящее время разработчик данного СО выполняет заявки на поставку от организаций, которые находятся в климатических зонах с континентальным климатом, где температура в летние месяцы может подниматься выше 30–35 °С, что значительно превышает допустимые нормы для его хранения и транспортирования. Возможные отклонения температурного режима от регламентированных условий при транспортировании СО в условиях окружающей среды могут стать причиной недостоверной оценки ростовых свойств питательных сред и, как следствие, несоответствия испытания БЛП на присутствие микоплазм. Вместе с тем использование для транспортирования СО специальных контейнеров, поддерживающих необходимый температурный режим, влечет за собой значительное удорожание продукции. Учитывая данные обстоятельства, в настоящее время отгрузка СО осуществляется только самовывозом с указанием соблюдения регламентированных условий, что, очевидно, создает дополнительные сложности для заказчика. В настоящее время частично снизить затраты заказчика при самовывозе возможно при увеличении объема разовой поставки, однако ограничивающим фактором в данном случае будет относительно небольшой установленный регламентированный срок годности образцов СО.

Необходимость решения проблем, связанных с процессом транспортирования СО, послужила основанием для изучения влияния температурного фактора на стабильность свойств СО тест-штамма *M. arginini* G230, что согласуется с рекомендациями документов Комитета по стандартным образцам Международной организации по стандартизации⁵, Государственной системы обеспечения единства измерений⁶, Комитета экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов⁷ по проведению исследования стабильности материала СО в условиях возможных

кратковременных отклонений («short-term stability» — кратковременная стабильность), при транспортировании («stability in transit» — стабильность при транспортировании).

Таким образом, расширенное изучение сохранения стабильности свойств и в первую очередь аттестованной характеристики СО тест-штамма *M. arginini* G230 при длительном хранении в регламентируемых условиях и кратковременном хранении при повышенных температурах является своевременным и актуальным.

Цель работы — изучение стабильности стандартных образцов тест-штамма *M. arginini* G230 при длительном хранении в регламентируемых условиях и при кратковременном воздействии повышенных температур.

Задачи исследования:

- проведение ретроспективного анализа свойств СО тест-штамма *M. arginini* G230 при более длительном хранении в регламентированных условиях;
- изучение стабильности свойств СО тест-штамма *M. arginini* G230 при моделировании кратковременного воздействия повышенных температур 25 ± 2 и 37 ± 2 °С;
- оценка возможности изменения условий транспортирования и продления срока годности СО тест-штамма *M. arginini* G230.

Материалы и методы

Материалы

Аттестованные СО тест-штамма *M. arginini* G230 (регламентированные условия хранения при температуре от минус 20 °С до минус 30 °С) — 6 серий: сер. 7 (изготовлена 03.2014), сер. 8 (изготовлена 09.2015), сер. 9/1 (изготовлена 04.2017), сер. 9/2 (изготовлена 09.2018), сер. 10 (изготовлена 07.2019), сер. 12 (изготовлена 06.2020).

В соответствии с требованиями ГФ РФ XIV⁸ в исследованиях использовали питательные среды лабораторного изготовления (среда Каган жидкая и полужидкая), раствор 0,9% натрия хлорида, а также сыворотку крови лошади производства ООО «Биолот» (Россия) или ООО НПП «ПанЭко» (Россия), имеющие действующий срок годности.

⁵ ISO Guide 35:2017. Reference material — General and statistical principles for certification. ISO/TC 334/Ver. 4. 2017.

⁶ ГОСТ ISO Guide 35–2015 Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации).

⁷ Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards, Annex 2. TRS No 932. WHO; 2004. Guidelines on stability evaluation of vaccines, Annex 3. TRS No 962. WHO; 2011.

⁸ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Оборудование

Результаты получены с применением испытательного оборудования, прошедшего квалификацию/аттестацию:

- термостат ТС-1/20 (СКТБ СПУ, Россия), диапазон: от температуры окружающей среды до 60 °С; класс точности, погрешности: ± 1 °С;
- термощаф с охлаждением ТС-1/80 (СКТБ СПУ, Россия), диапазон: от 5 до 60 °С; класс точности, погрешности: $\pm 1,5$ °С;
- термощаф (инкубатор) тип В 115 (Binder GmbH, Швеция), диапазон: от 5 до 100 °С; класс точности погрешности: при 37 °С: $\pm 0,5$ °С; при 50 °С: $\pm 1,1$ °С;
- шкаф ламинарный БАВ п-01-1,2 (ЗАО «Ламинаторные системы», Россия), класс защиты II;
- морозильная камера Саратов 127 (ООО «СЭПО-ЗЭМ», Россия), температура не выше минус 15 °С.

Методы

Оценку качества СО по показателям «Описание лиофилизата», «Время растворения» и «Внешний вид растворенного образца» проводили визуальным методом. Наличие вакуума оценивали визуально в поле высокочастотного разряда согласно ГФ РФ XIV⁹.

Стерильность образцов определяли методом прямого посева в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV¹⁰.

Оценку ростовых свойств питательной среды проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм.

Контроль ростовых свойств полужидкой питательной среды и установление контрольных разведений проводили путем внесения СО из каждого разведения, начиная с последнего (10^{-10}), по $1,0 \pm 0,1$ мл в 2–3 пробирки с 10 мл среды и инкубирования при температуре 37 ± 1 °С в течение 7 сут. По окончании инкубирования определяли разведения, в которых выявляли около 10 – 100 КОЕ тест-штамма *M. arginini* G230 и устанавливали их в качестве контрольных разведений. Среда признавали годной, если не позднее 7 сут инкубации визуально обнаруживали рост тест-штамма *M. arginini* G230 в разведении не ниже 10^{-6} при посеве 10 – 100 КОЕ.

Определение значения аттестуемой характеристики (титр). Значение титра (аттестуемая характеристика) СО тест-штамма *M. arginini*

G230 (КОЕ/мл) определяли методом десятикратных разведений с последующим высевом каждого разведения в три пробирки на полужидкую питательную среду и инкубированием посевов при температуре 37 ± 1 °С в течение не более 7 сут. Учет результатов проводили на 7 сут путем визуального просмотра пробирок в прямом проходящем свете, обнаруживая наличие в зоне посева колонии микоплазм в виде беловатых полупрозрачных округлых образований или тонкой паутинки или облачков. Фиксировали контрольное разведение, в котором отмечали рост микоплазм, принимая его за значение титра.

Расчет титра проводили методом предельных разведений с составлением числовой характеристики по таблице Мак-Креди¹¹. В таблице 1 выборочно представлены примеры для наиболее часто встречающихся числовых характеристик при экспресс-обработке результатов учета микроорганизмов по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди). Числовая характеристика согласно данной таблице формируется из трех цифр (слева направо): первая цифра соответствует числу пробирок с ростом микоплазм, взятых в том наименьшем разведении, в котором микоплазмы выросли во всех пробирках (например, три

Таблица 1. Пример экспресс-обработки результатов учета микроорганизмов по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди выборочно)

Table 1. An example of rapid processing of the results of microorganism quantification using the most probable number method (McCready's table with omissions)

Числовая характеристика (наиболее часто встречающаяся) <i>Numerical characteristic (most common)</i>	Наиболее вероятное число (НВЧ) микроорганизмов при посеве в 3 пробирках <i>Most probable number (MPN) of microorganisms when inoculated in three test tubes</i>
300	2,5
310	4,5
311	7,5
321	15,0
322	20,0
330	25,0
331	4,5
333	140,0

⁹ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т 2; 2018.

¹⁰ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹¹ ГОСТ 54653-2011 Удобрения органические. Методы микробиологического анализа.

пробирки из разведения 10^{-6}). Следующие две цифры обозначают число пробирок с ростом микоплазм в двух последующих разведениях (например, в двух пробирках из трех разведений 10^{-7} и в одной пробирке из разведения 10^{-8}). Числовая характеристика результата в таком случае составляет 321. По таблице Мак-Креди находили наиболее вероятное число (НВЧ), соответствующее полученной цифровой характеристике (в нашем примере 15), умножали его на разведение, которому соответствует первая

цифра числовой характеристики (в нашем примере $15,0 \times 10^6$ или $1,5 \times 10^7$).

Определение титра СО *M. arginini* G230 по таблице Мак-Креди на примере серии 8 представлено в таблице 2.

Влияние кратковременного воздействия повышенных температур. Изучение проводили на 3 сериях СО согласно требованиям ГФ РФ XIV по двум схемам: полная (для серии 9/2) – моделирование кратковременного воздействия двух температурных режимов: 25 ± 2 и 37 ± 2 °C

Таблица 2. Пример учета первичных данных и определения титра стандартного образца *M. arginini* G230 (серия 8) по таблице Мак-Креди

Table 2. An example of primary data processing and *M. arginini* G230 RS (batch 8) titre determination using McCrady's table

№ пробирки <i>Test tube number</i>	Разведение <i>Dilution</i>	Наличие роста штамма <i>M. arginini</i> G230 на 7 сут инкубирования при посеве в трех параллельных пробирках (ампулы А1–А5) <i>Growth of M. arginini strain G230 inoculated in three parallel test tubes (ampoules A1–A5) on incubation day 7</i>				
		A1	A2	A3	A4	A5
1	10^{-1}	+++	+++	+++	+++	+++
2	10^{-2}	+++	+++	+++	+++	+++
3	10^{-3}	+++	+++	+++	+++	+++
4	10^{-4}	+++	+++	+++	+++	+++
5	10^{-5}	+++	+++	+++	+++	+++
6	10^{-6}	+++	+++	+++	+++	+++
7	10^{-7}	+++	+++	+++	+++	+++
8	10^{-8}	+++	+++	+-	+-	+++
9	10^{-9}	---	---	---	---	---
10	10^{-10}	---	---	---	---	---
Полученные данные и расчет НВЧ <i>Obtained data and MPN calculation</i>						
Предельное разведение, в котором обнаружен рост микоплазм <i>Highest dilution with mycoplasma growth</i>		10^{-8}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-8}
Числовая характеристика по таблице Мак-Креди <i>Numerical characteristic as per McCrady's table</i>		300	300	310	310	300
НВЧ микроорганизмов при посеве в трех пробирках, КОЕ/мл <i>MPN of microorganisms when inoculated in three test tubes, CFU/mL</i>		$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$0,45 \times 10^8$	$0,45 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
Среднее арифметическое значение НВЧ микроорганизмов, КОЕ/мл <i>Arithmetic mean of MPNs of the microorganisms, CFU/mL</i>		$1,7 \times 10^8$				

Примечание. «+» наличие роста микоплазм; «-» отсутствие роста микоплазм. НВЧ – наиболее вероятное число, КОЕ – колониобразующие единицы.

Note. + growth of mycoplasmas; - no growth of mycoplasmas. MPN—most probable number, CFU—colony-forming unit.

и сокращенная (для серий 10 и 12) – моделирование кратковременного воздействия температуры 25 ± 2 °C.

Образцы СО, хранившиеся в регламентированных условиях до и после воздействия повышенных температур, считали прошедшими испытание, если значение титра соответствовало требованиям спецификации и было не ниже 10^7 КОЕ/мл.

Полная схема. Образцы СО в начале срока годности выдерживали при четырех термовременных режимах: при 25 ± 2 °C в течение 10 и 30 сут и аналогично при 37 ± 2 °C, а затем исследовали их в два этапа.

На 1-м этапе половину образцов анализировали непосредственно по истечении каждого периода температурного воздействия по показателям согласно спецификации (по 4 ампулы СО на каждом этапе).

На 2-м этапе аналогично исследовали вторую половину образцов СО, которую после воздействия двух режимов повышенных температур (10 и 30 сут) хранили в регламентированных условиях при температуре минус 20 ± 2 °C до истечения срока годности.

Контрольными образцами в испытаниях служили образцы, хранившиеся в течение всего срока годности в регламентированных условиях при температуре минус 20 ± 2 °C (контрольные образцы) (рис. 1).

Сокращенная схема. Образцы СО серий 10 и 12 (по 6 ампул каждой серии) выдерживали при температуре 25 ± 2 °C в течение 30 сут, затем хранили при температуре минус 20 ± 2 °C до истечения срока годности и далее проводили исследование в сравнении с контрольными образцами.

Критерии приемлемости результатов. При интерпретации результатов, учитывая особенность методики, обусловленную вариабельностью компонентов среды, числовые значения коэффициента титра, рассчитанные по таблице Мак-Креди (например, $1,1 \times 10^7$, $0,8 \times 10^7$) и находящиеся в пределах одного порядка, принимали как сопоставимые, а последующий анализ проводили, принимая во внимание только значения контрольных разведений (10^{-7} , 10^{-6}), без учета коэффициента.

Статистическая обработка результатов. Рассчитывали среднее арифметическое значение ($\bar{X}_{cp}$) наиболее вероятного числа (НВЧ) микроорганизмов; стандартное отклонение (S) результатов определения НВЧ микроорганизмов [6].

Результаты и обсуждение

Для проведения исследования использовали аттестованные серии СО тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230, отвечающие требованиям спецификации по всем показателям. Аттестацию проводили в соответствии с общими

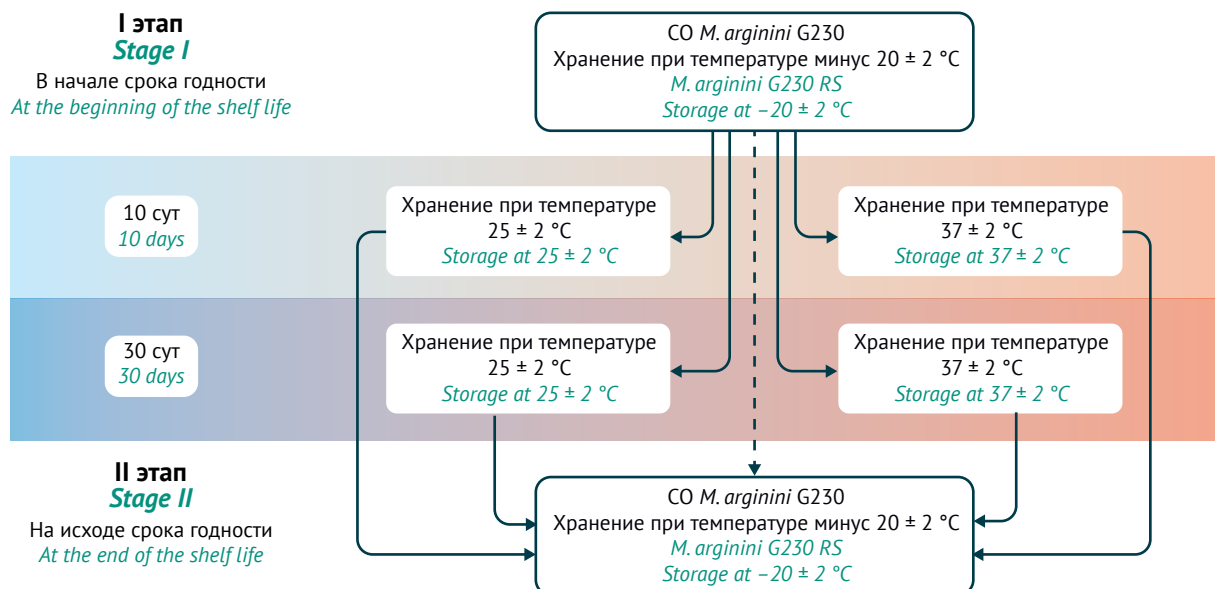


Рис. 1. Полная схема исследования влияния повышенных температур на стандартный образец (СО) тест-штамма *M. arginini* G230 (серия 9/2).

Fig. 1. The complete scheme of the study of elevated temperature effects on the reference standard (RS) of *M. arginini* G230 (batch 9/2).

Таблица 3. Требования к качеству стандартного образца тест-штамма *M. arginini* G230

Table 3. Quality requirements for the reference standard of the *M. arginini* G230 test strain

Показатель <i>Parameter</i>	Метод <i>Method</i>	Норма <i>Requirement</i>
Описание (внешний вид) лиофилизата <i>Description (appearance) before reconstitution</i>	Визуальный <i>Visual</i>	Ллиофилизированная мелкопористая масса светло-желтого цвета в виде рыхлой таблетки <i>Light-yellow finely porous lyophilised mass in the form of a friable tablet</i>
Наличие вакуума (герметизация) <i>Presence of vacuum (Container closure integrity)</i>	Визуальный ГФ РФ XIV ОФС.1.8.1.0002.15 Иммунобиологические лекарственные препараты <i>Visual</i> <i>Ph.Rus. 14, OFS.1.8.1.0002.15 Immunobiological medicinal products</i>	Наличие вакуума в ампулах проверяют в поле высокочастотного разряда. Свечение ампул должно быть голубым или розово-голубым <i>Ampoules are checked for vacuum in a high-voltage high-frequency field. The glow is blue or pink-blue</i>
Растворимость Время растворения <i>Solubility</i> <i>Reconstitution time</i>	Визуальный <i>Visual</i>	Время растворения в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида не должно превышать 1 мин <i>Reconstitution time in sterile 0.9% sodium chloride is less than 1 min</i>
Описание растворенного образца <i>Description after reconstitution</i>	Визуальный <i>Visual</i>	Суспензия светло-желтого цвета без осадка и примесей <i>Light-yellow suspension free of sediment and impurities</i>
Стерильность <i>Sterility</i>	Метод прямого посева ГФ РФ XIV ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность <i>Direct inoculation</i> <i>Ph.Rus. 14, OFS.1.2.4.0003.15.Sterility</i>	Бактерии и грибы должны отсутствовать <i>No bacteria and fungi are present</i>
Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Весовой ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании <i>Weighing</i> <i>Ph.Rus. 14, OFS.1.2.1.0010.15 Loss on drying</i>	Не более 3 <i>Not more than 3</i>
Аттестуемая характеристика (титр), КОЕ/мл <i>Certified value (titre), CFU/mL</i>	Расчет титра методом предельных разведений с составлением числовой характеристики по таблице Мак-Креди или по среднему арифметическому значению <i>Titre calculation by the most probable number method involving numerical characterisation using McCrady's table or the arithmetic mean</i>	Не ниже 1×10^7 <i>Not less than 1×10^7</i>

Примечание. ГФ РФ XIV – Государственная фармакопея Российской Федерации (XIV изд.), ОФС – общая фармакопейная статья, КОЕ – колониеобразующая единица.

Note. Ph.Rus. 14 – State Pharmacopoeia of the Russian Federation (14 ed.), OFS – general chapter identifier, CFU – colony-forming unit.

подходами, принятыми в области разработки стандартных образцов биологических лекарственных средств, по показателям: «Описание лиофилизата», «Наличие вакуума», «Время растворения», «Описание растворенного образца», «Стерильность», «Аттестуемая характеристика (титр)» [7, 8]. Основные характеристики и требования к качеству СО тест-штамма *M. arginini* G230 представлены в таблице 3.

Наш многолетний (более 30 лет) опыт использования и изучения СО тест-штамма *M. arginini* G230 (более 40 серий) свидетельствует об устойчивой стабильности его свойств при соблюдении установленных условий хранения и транспортирования образцов в течение регламентированного срока годности (12 мес.).

Для решения задачи по установлению возможности увеличения срока годности проводили ретроспективный анализ стабильности основных свойств и аттестованной характеристики СО тест-штамма *M. arginini* G230. Были изучены данные по трем аттестованным сериям СО, хранившимся в регламентированных условиях в течение срока, превышающего установленный срок годности (до 2 лет и более). Установлено, что при хранении образцов в регламентированных условиях и при более длительном хранении изменений свойств или отклонений по основным показателям качества не происходит. Образцы СО соответствуют установленным критериям и представляют собой лиофилизированную массу в виде рыхлой таблетки светло-желтого

Таблица 4. Рост тест-штамма *M. arginini* G230 в контрольном разведении при контроле ростовых свойств партий питательных сред (2014–2019 гг.)

Table 4. Growth of *M. arginini* test strain G230 in the control dilution, observed when monitoring growth promoting properties of culture media batches (2014–2019)

№ серии CO <i>RS batch number</i>	Дата учета результата испытания <i>Test result calculation date</i>	№ партии питательной среды <i>Culture medium lot number</i>	Рост тест-штамма <i>M. arginini</i> G230 в контрольном разведении <i>Growth of M. arginini strain G230 in the control dilution</i>	Соответствует / не соответствует <i>Compliant / non-compliant</i>
Серия 7, срок наблюдения 17 мес. (изг. 03.2014) <i>Batch 7, 17 months of observation (mfd. 03.2014)</i>				
2014 г.				
7	03.2014 (аттестация) <i>(certification)</i>	ПС/292/03/14	10 ⁻⁸	Соответствует <i>Compliant</i>
7	04.2014	ПС/334/04/14	10 ⁻⁷	Соответствует <i>Compliant</i>
7	05.2014	ПС/418/05/14	10 ⁻⁷	Соответствует <i>Compliant</i>
7	12.2014	ПС/270/10/14	10 ⁻⁷	Соответствует <i>Compliant</i>
2015 г.				
7	02.2015	ПС/30/02/15	10 ⁻⁷	Соответствует <i>Compliant</i>
7	03.2015	ПС/89/02/15	10 ⁻⁷	Соответствует <i>Compliant</i>
7	04.2015	ПС/113/03/15	10 ⁻⁷	Соответствует <i>Compliant</i>
7	08.2015	ПС/377/08/15	10 ⁻⁷	Соответствует <i>Compliant</i>
Серия 8, срок наблюдения 18 мес. (изг. 09.2015) <i>Batch 8, 18 months of observation (mfd. 09.2015)</i>				
8	09.2015 (аттестация) <i>(certification)</i>	ПС/01/09/15	10 ⁻⁷	Соответствует <i>Compliant</i>
2016 г.				
8	06.2016	ПС/18/л/06/16	10 ⁻⁷	Соответствует <i>Compliant</i>
8	08.2016	ПС /117/л/08/16	10 ⁻⁷	Соответствует <i>Compliant</i>
8	12.2016	ПС/299/л/12/16	10 ⁻⁶	Соответствует <i>Compliant</i>
2017 г.				
8	03.2017	ПС/430/л/03/17	10 ⁻⁸	Соответствует <i>Compliant</i>
8	03.2017	ПС/431/л/03/17	10 ⁻⁸	Соответствует <i>Compliant</i>
Серия 9/1, срок наблюдения: 28 мес. (изг. 04.2017) <i>Batch 9/1, 28 months of observation (mfd. 04.2017)</i>				
9/1	05.2017 (аттестация) <i>(certification)</i>	ПС/32/л/05/17	10 ⁻⁷	Соответствует <i>Compliant</i>

Продолжение таблицы 4
Table 4 (continued)

№ серии СО RS batch number	Дата учета результата испытания Test result calculation date	№ партии питательной среды Culture medium lot number	Рост тест-штамма <i>M. arginini</i> G230 в контрольном разведении Growth of <i>M. arginini</i> strain G230 in the control dilution	Соответствует / не соответствует Compliant / non-compliant
2018 г.				
9/1	05.2018	ПС/159/л/05/ 18	10^{-7}	Соответствует Compliant
9/1	11.2018	ПС/456/л/11/18	10^{-8}	Соответствует Compliant
9/1	04.2018	ПС/143/л/04/ 18	10^{-7}	Соответствует Compliant
2019 г.				
9/1	04.2019	ПС/163/л/03/19	10^{-7}	Соответствует Compliant
9/1	06.2019	ПС/294/л/06/19	10^{-7}	Соответствует Compliant
9/1	07.2019	ПС/294/л/06/19	10^{-8}	Соответствует Compliant
9/1	08.2019	ПС/333/л/07/19	10^{-7}	Соответствует Compliant

Примечание. СО — стандартный образец.
Note. RS—reference standard.

цвета. Наличие вакуума в ампулах сохраняется. После растворения образцы представляют собой суспензию светло-желтого цвета, время растворения не превышает 1 мин, посторонние бактерии и грибы отсутствуют.

Результаты определения значения аттестованной характеристики (рост в контрольном разведении) (табл. 4), свидетельствуют, что значения титра образцов трех изученных серий СО тест-штамма *M. arginini* G230, полученные на разных партиях питательных сред, также соответствуют установленным требованиям спецификации и сохраняются в пределах не ниже 10^7 КОЕ/мл в течение срока, превышающего установленный срок годности (серия 7 — 17 мес., серия 8 — 18 мес., серия 9/1 — 28 мес.).

Таким образом, данные по анализу качества по показателям спецификации и значению титра образцов трех серий СО тест-штамма *M. arginini* G230, хранившихся в регламентированных условиях, позволяют сделать вывод об устойчивой стабильности свойств СО по всем показателям качества в течение срока, превышающего срок годности (до 16 мес.).

На следующем этапе работы было проведено изучение стабильности свойств СО тест-штамма *M. arginini* G230 при возможных отклонениях температуры от регламентированной при транспортировании в условиях окружающей среды.

Условия моделировали кратковременным воздействием двух режимов повышенных температур: 25 ± 2 и 37 ± 2 °С.

В качестве объекта использовали образцы трех аттестованных серий (сер. 9/2, 10 и 12) СО тест-штамма *M. arginini* G230 с титром не ниже 1×10^7 КОЕ/мл в каждой из указанных серий.

Анализ соответствия качества образцов после воздействия температуры 25 ± 2 °С в течение 10 и 30 сут (серия 9/2) и образцов серий 10 и 12 в течение 30 сут по показателям: «Описание лиофилизата», «Время растворения», «Описание растворенного образца», «Стерильность», «Наличие вакуума», полученных как в начале срока годности (1-й этап), так и в конце срока годности (2-й этап), показал сохранение стабильности основных свойств СО. Образцы всех исследованных серий, подвергнутые воздействию температурного режима 25 ± 2 °С в течение 30 сут, соответствовали требованиям спецификации в конце установленного срока годности и представляли собой лиофилизированную массу светло-желтого цвета в виде рыхлой таблетки, герметизированную в вакуумированных ампулах. Время растворения в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида не превышало 1 мин. Растворенные образцы представляли собой суспензию светло-желтого цвета. Посторонние бактерии и грибы обнаружены не были. Результаты определения значения

Таблица 5. Результаты влияния повышенных температур на значение аттестованной характеристики стандартного образца тест-штамма *M. arginini* G230**Table 5.** The effects of elevated temperatures on the value of the certified characteristic of the *M. arginini* G230 test strain RS

№ серии (титр при аттестации), количество ам- пул в испытании/ дата учета <i>Batch No. (titre at the time of certification), number of tested ampoules/ calculation date</i>	Температура хранения образцов СО, °С <i>RS samples storage t, °C</i>	Титр образцов СО тест-штамма <i>M. arginini</i> G230, ($\bar{X}_{cp} \pm S$), НВЧ/мл, хранение при повышенных температурах в течение <i>Titre of M. arginini G230 RS samples, ($\bar{X}_{mean} \pm S$), MPN/mL, stored at elevated temperatures during</i>			
		10 сут <i>10 days</i>		30 сут <i>30 days</i>	
		при испытании <i>when tested</i>			
		в начале срока годности (01.10.2018) <i>at the beginning of the shelf life (01.10.2018)</i>	в конце срока годности (28.08.2019) <i>at the end of the shelf life (28.08.2019)</i>	в начале срока годности (22.10.2018) <i>at the beginning of the shelf life (22.10.2018)</i>	в конце срока годности <i>at the end of the shelf life</i>
9/2 (10 ⁷ КОЕ/мл) <i>(10⁷ CFU/mL)</i> <i>n=4/</i> 01.09.2018	25±2	(1,1±0,7)×10 ⁷	(3,0±0,6)×10 ⁷	(1,1±0,6)×10 ⁷	^a (3,5±1,4)×10 ⁷
	37±2	(0,8±0,6)×10 ⁶	(3,1±1,2)×10 ⁶	(0,6±0,3)×10 ⁶	^a (3,0±1,7)×10 ⁶
	–20±2 (контроль) <i>(control)</i>	>10 ⁷	>10 ⁷	>10 ⁷	^a >10 ⁷
10 (10 ⁷ КОЕ/мл) <i>(10⁷ CFU/mL)</i> <i>n=6/</i> 23.07.2019	25±2	–	–	–	^b (0,8±0,3)×10 ⁷
	–20±2 (контроль) <i>(control)</i>	–	–	–	^b >10 ⁷
12 (10 ⁷ КОЕ/мл) <i>(10⁷ CFU/mL)</i> <i>n=6/</i> 19.06.2020	25±2	–	–	–	^c (3,1±1,6)×10 ⁷
	–20±2 (контроль) <i>(control)</i>	–	–	–	^c >10 ⁷

Примечание. «–» – испытание не предусмотрено. СО – стандартный образец, НВЧ – наиболее вероятное число, КОЕ – колониобразующие единицы.

^a Дата учета результата (для серии 9/2) – 28.08.2019.

^b Дата учета результата (для серии 10) – 20.07.2020.

^c Дата учета результата (для серии 12) – 14.06.2021.

Note. – not applicable, RS–reference standard, MPN–most probable number, CFU–colony-forming unit.

^a Calculation date: 28 August 2019.

^b Calculation date: 20 July 2020.

^c Calculation date: 14 June 2021.

титра образцов серии 9/2 в начале и в конце срока годности, а также образцов серий 10 и 12 по истечении срока годности после воздействия температуры 25±2 °С в течение 30 сут (табл. 5) наглядно демонстрируют, что значения титра образцов сохраняются в течение регламентированного срока годности в пределах, установленных при аттестации (не ниже 10⁷ КОЕ/мл) и свидетельствуют об отсутствии значимого влияния данного термовременного режима на жизнеспособность и титр микоплазм.

Анализ результатов оценки качества образцов СО серии 9/2 после воздействия второго

температурного режима 37±2 °С в течение 10 и 30 сут также показал отсутствие изменений свойств по показателям спецификации, все образцы соответствовали установленным требованиям, за исключением значения аттестованной характеристики. При проведении анализа воздействия данного режима на значение титра было установлено отклонение от нормативных требований. В частности, хранение образцов серии 9/2 при температуре 37±2 °С в течение 10 и 30 сут существенно повлияло на жизнеспособность микоплазм и привело к снижению титра (до 10⁶ КОЕ/мл), что на порядок ниже зна-

чения ($1,0 \times 10^7$ КОЕ/мл), полученного при аттестации в начале срока годности СО. Учитывая, что при дальнейшем хранении в регламентированных условиях значение титра СО во всех испытаниях сохранялось (10^6 КОЕ/мл), можно предположить, что потеря жизнеспособности микроорганизмов произошла непосредственно в течение первых десяти суток после воздействия повышенной температуры 37 ± 2 °С.

На основании полученных результатов о негативном влиянии данного термовременного режима на титр СО серии 9/2 дальнейшее продолжение исследований по полной схеме на образцах двух других серий (10 и 12) было признано нецелесообразным.

Таким образом, изучение стабильности СО тест-штамма *M. arginini* G230 при моделировании кратковременного воздействия повышенных температур показало, что основные свойства и титр СО тест-штамма *M. arginini* G230 сохраняются после воздействия температуры 25 ± 2 °С в течение 30 сут, что позволяет без потери качества транспортировать СО в указанных условиях и использовать его при соблюдении регламентированных условий хранения до окончания установленного срока годности. Вместе с тем воздействие в течение 10 сут более высокой температуры 37 ± 2 °С приводит к существенному снижению титра СО и не может рассматриваться в качестве допустимого режима хранения и/или транспортирования.

Литература/References

1. Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes*. 2011;25(2-3):69-77. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.01.002>
2. Fratz-Berilla EJ, Angart P, Graham RJ, Powers DN, Mohammad A, Kohnhorst C, et al. Impacts on product quality attributes of monoclonal antibodies produced in CHO cell bioreactor cultures during intentional mycoplasma contamination events. *Biotechnol Bioeng*. 2020;117(9):2802-15. <https://doi.org/10.1002/bit.27436>
3. Olarerin-George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(5):2535-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv136>
4. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Тихонова АС. Совершенствование методики оценки качества питательной среды для выявления микоплазм. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(3):161-8. [Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Tikhonova AS. Ways to improve quality control of culture medium used for mycoplasma

Выводы

1. Ретроспективный анализ СО тест-штамма *M. arginini* G230, используемого для оценки пригодности питательной среды, показал, что при соблюдении регламентированных условий хранения и транспортирования стабильность свойств сохраняется в течение срока, превышающего срок годности (до 16 мес.).
2. Установлено, что воздействие на образцы СО температурного режима 37 ± 2 °С в течение 10 и 30 сут приводит к снижению аттестованного значения (титра) образцов, не позволяющего в дальнейшем использовать его для оценки качества питательной среды при испытании БЛП на присутствие микоплазм.
3. Экспериментально показано, что хранение образцов трех серий при температуре 25 ± 2 °С не влияет на свойства СО тест-штамма *M. arginini* G230 и позволяет его использовать в течение установленного срока годности после транспортирования не более 30 сут при данной температуре.
4. Целесообразно продолжение исследований по изучению стабильности свойств образцов СО, подвергшихся воздействию в течение 30 сут температуры 25 ± 2 °С, после истечения регламентированного срока годности для одновременного решения вопросов, касающихся увеличения срока годности и возможности транспортирования СО при данном термовременном режиме.

detection. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(3):161-8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-161-168>

5. Суханова СМ, Захарова НЕ. Питательные среды в фармакопейном анализе: применение, действующие требования, вопросы стандартизации. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(3):136-44. [Sukhanova SM, Zakharova NE. Culture media in pharmacopoeial analysis: use, current requirements, standardisation. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(3):136-44 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-136-144>
6. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998. [Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994]
7. 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-farmatsefticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal. 2017;51(8):716–21] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50>

8. 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, Fadeikina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = Scientific Center for Expertise of Medical Application Products Bulletin.* 2013;2:28–32 (In Russ.)]

Вклад авторов. С.М. Суханова — анализ и интерпретация результатов, критическое обсуждение текста рукописи, формулировка выводов, редактирование и переработка рукописи; З.Е. Бердникова — выполнение экспериментальных работ, написание текста, критическое обсуждение и редактирование рукописи; О.В. Фадейкина — планирование исследования, концепция и дизайн исследования влияния повышенных температур, обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка результатов, написание текста рукописи; Е.М. Петручук — выполнение экспериментальных работ, статистическая обработка результатов исследований; А.С. Тихонова — редактирование рукописи, работа с табличным и иллюстративным материалом.

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. S.M. Sukhanova—analysis and interpretation of the results, critical revision of the text of the manuscript, formulation of the conclusions, editing and reshaping of the manuscript; Z.E. Berdnikova—execution of the experiments, writing of the text, critical revision and editing of the manuscript; O.V. Fadeikina—planning of the study, elaboration of the concept and design of the study investigating the effects of elevated temperatures, consolidation of the experimental data, analysis and interpretation of the results, statistical processing of the results, writing of the text of the manuscript; E.M. Petruchuk—execution of the experiments, statistical analysis of the study results; A.S. Tikhonova—editing of the manuscript, preparation of the tabular and illustrative material.

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

Об авторах / Authors

Суханова Светлана Михайловна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

suhanovasm@expmed.ru

Бердникова Зинаида Евтропиевна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-4250>

berdnikova@expmed.ru

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

fadeikina@expmed.ru

Петручук Елена Медатовна, канд. биол. наук. ORCID:

<https://orcid.org/0000-0002-7893-4933>

petruchuk@expmed.ru

Тихонова Александра Сергеевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7281-1249>

tikhonova@expmed.ru

Svetlana M. Sukhanova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID:

<https://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

suhanovasm@expmed.ru

Zinaida E. Berdnikova, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-4250>

berdnikova@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

fadeikina@expmed.ru

Elena M. Petruchuk, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7893-4933>

petruchuk@expmed.ru

Aleksandra S. Tikhonova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7281-1249>

tikhonova@expmed.ru

Поступила 08.12.2021

После доработки 19.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Received 8 December 2021

Revised 19 August 2022

Accepted 26 August 2022



ISSN 2221-996X



9 772221 996004