

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

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume	№ / No.
23	3
2023	

www.biopreparations.ru



Уважаемые коллеги!

В данном номере журнала представлены обзорные и оригинальные статьи, посвященные вопросам совершенствования, стандартизации, оценки безопасности биологических лекарственных препаратов. Номер открывает статья о внедрении новых технологий генной терапии в медицинскую практику. Актуальность разработки специфических лекарственных препаратов на основе нуклеиновых кислот не вызывает сомнений и все больше привлекает внимание исследователей. Применяемые системы редактирования генома, прежде всего, должны быть направлены на преодоление нежелательных последствий их применения.

Продолжаются исследования, посвященные разработке отечественных препаратов для профилактики и лечения коронавирусной инфекции (COVID-19). В качестве средств пост-контактной профилактики и лечения данного

заболевания на ранних этапах представляется перспективным применение иммуностимулирующих препаратов, в частности на основе РНК двуспиральной натриевой соли, способствующих индукции секреции интерферонов.

Не остаются без внимания исследования оценки иммуногенности, профилактической эффективности и безопасности вакцинных препаратов. Одним из важных аспектов этих исследований является способ доставки антигена в организм человека. По данным ВОЗ, 11% всех находящихся на стадии клинических исследований вакцин для иммунопрофилактики COVID-19 относятся к мукозальным вакцинам. Применение данного типа вакцин приводит к активации системного иммунного ответа, является менее травматичным и не требует вовлечения большого количества медицинского персонала. Результаты сравнительной оценки безопасности интраназальной и внутримышечной вакцин для профилактики коронавирусной инфекции с участием здоровых добровольцев представлены в данном номере журнала.

С уважением,
главный редактор

МЕРКУЛОВ Вадим Анатольевич

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

**ТОМ 23, № 3,
ИЮЛЬ – СЕНТЯБРЬ 2023**

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

Учредитель:

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

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, включен в «Белый список» научных журналов. Журнал принимает статьи по следующим научным специальностям: биотехнология, молекулярная биология, вирусология, микробиология, аллергология и иммунология.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 1,182.

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

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

**VOLUME 23, NO. 3,
JULY – SEPTEMBER 2023**

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

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)

The journal is included in the White list of Russian scientific journals and in the List of peer-reviewed scientific publications that the State Commission for Academic Degrees and Titles recommends for publishing the main scientific results of theses for Candidate of Science and Doctor of Science degrees. Articles submitted to the journal should cover the following fields of research: biotechnology, molecular biology, virology, microbiology, allergology and immunology.

The journal's two-year RISC impact factor is 1.182.

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

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

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 «ЦСП» ФМБА России (Москва, Россия)

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

Ответственный секретарь

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

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

Брико Николай Иванович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Москва, Россия)

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

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

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф. (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 Ольга Федоровна

+7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)

Fedotovaof@expmed.ru

Научные редакторы

Лукасова Надежда Вадимовна,

канд. биол. наук

Орлова-Яр Елена Анатольевна

Редактор перевода

Балтина Любовь Александровна

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

150 экз. Цена свободная

Подписано в печать

28.09.2023

Дата выхода в свет

05.10.2023

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,

2023

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

О.А. Рачинская, Е.В. Мельникова, В.А. Меркулов

Актуальные направления и риски применения препаратов на основе технологий редактирования генома

247

М.В. Савкина, М.А. Кривых, Л.В. Саяпина, Ю.И. Обухов, В.П. Бондарев

Направления совершенствования и вопросы стандартизации лекарственных препаратов на основе ботулинического токсина

262

Оригинальные статьи

Е.В. Зуев, О.Л. Евдокимова, О.А. Маркова, И.А. Короткевич, Т.В. Григорьева, Р.А. Хамитов

Сравнительная оценка безопасности интраназальной и внутримышечной иммунизации вакцинами для профилактики коронавирусной инфекции на основе аденовирусов Ad26 и Ad5

275

Г.М. Игнатьев, Е.Ю. Шустова, Е.А. Рогожина, П.А. Белый, К.Я. Заславская, В.А. Меркулов

Противовирусная активность лекарственного препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в отношении SARS-CoV-2 *in vitro*

290

Е.Л. Постнова, А.А. Мовсесянц

Изучение возможности применения математических методов анализа для оценки специфической активности антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в препаратах иммуноглобулинов человека

300

А.А. Савина, Н.В. Александрова, Т.И. Немировская

Мониторинг показателей качества вакцин для профилактики туберкулеза методом контрольных карт Шухарта

310

Е.И. Комаровская, А.А. Солдатов

Изучение иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам серологическим методом

321

И.А. Алексеева, И.В. Ибрагимхалилова, Д.Н. Лепихова

Влияние коклюшного токсина и липоолигосахарида *Bordetella pertussis* на специфическую токсичность и защитную активность цельноклеточной коклюшной вакцины

333

А.А. Воропаев, О.В. Фадейкина, Т.Н. Ермолаева, Д.С. Давыдов

Лиофилизация бактериальных тест-штаммов в аппарате коллекторного типа: влияние параметров замораживания и высушивания, объема заполнения ампул и плотности ватного фильтра

348

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., Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency (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., Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency (Moscow, Russia)

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

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

Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Prof. (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 A. Orlova-Yar

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

150 copies. Free price

Passed for printing

28 September 2023

Date of publication

5 October 2023

Subscription codes

Pressa Rossii catalogue: 57941

Ural-Press agency catalogue: 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, 2023

CONTENTS

Reviews

O.A. Rachinskaya, E.V. Melnikova, V.A. Merkulov

**Current trends and risks associated with the use of therapies
based on genome editing247**

M.V. Savkina, M.A. Krivykh, L.V. Sayapina, Yu.I. Obukhov,
V.P. Bondarev

**Botulinum toxin preparations: areas for improvement
and issues of standardisation262**

Original Articles

E.V. Zuev, O.L. Evdokimova, O.A. Markova, I.A. Korotkevich,
T.V. Grigorieva, R.A. Khamitov

**Comparative safety evaluation of intranasal and intramuscular
immunisation with Ad26- and Ad5-vectored vaccines to prevent
coronavirus infection275**

G.M. Ignatyev, E.Yu. Shustova, E.A. Rogozhina, P.A. Belyi,
K.Ya. Zaslavskaya, V.A. Merkulov

**In vitro antiviral activity of a double-stranded RNA sodium
salt-based medicinal product against SARS-CoV-2290**

E.L. Postnova, A.A. Movsesyants

**Possibility of using mathematical analysis methods
to evaluate the potency of antibodies to hepatitis B
virus surface antigen in human immunoglobulin preparations300**

A.A. Savina, N.V. Aleksandrova, T.I. Nemirovskaya

**Using Shewhart charts to monitor quality characteristics
of preventive vaccines for tuberculosis310**

E.I. Komarovskaya, A.A. Soldatov

**Evaluation of the immune response to diphtheria and tetanus
toxoids by the serological methods321**

I.A. Alekseeva, I.V. Ibragimkhalilova, D.N. Lepikhova

**Effects of pertussis toxin and *Bordetella pertussis*
lipo-oligosaccharide on the specific toxicity
and potency of whole-cell pertussis vaccines333**

A.A. Voropaev, O.V. Fadeikina, T.N. Ermolaeva, D.S. Davydov

**Lyophilisation of bacterial test strains in a manifold-type
apparatus: effects of freezing and drying parameters,
ampoule fill volume, and cotton filter density348**

УДК 615.035.2:615.038:602.6

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-247-261>

Обзорная статья | Review article



Актуальные направления и риски применения препаратов на основе технологий редактирования генома

О.А. Рачинская^{1,✉}, Е.В. Мельникова¹, В.А. Меркулов^{1,2}

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

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

✉ Рачинская Ольга Анатольевна; Rachinskaya@expmed.ru

Резюме

Актуальность. В настоящее время разработано множество различных подходов к редактированию генома, основанных на применении разных систем редактирования, осуществлении модификаций генома с образованием одноцепочечных или двухцепочечных разрывов ДНК, *in vivo* или *ex vivo*, с восстановлением последовательности генома с помощью гомологичной рекомбинации или нехомологичного соединения концов ДНК. Однако применение систем редактирования генома сопряжено с возможным возникновением целого ряда рисков вследствие сложной биологии таких препаратов и фундаментального значения цели их воздействия — молекулы ДНК.

Цель. Анализ актуальных направлений и рисков, связанных с применением препаратов на основе систем редактирования генома, способов снижения рисков и методов их исследования, используемых для выявления и контроля возникновения нежелательных эффектов.

Обсуждение. Анализ данных литературы показал, что нежелательные эффекты от применения препаратов на основе систем редактирования генома могут быть связаны как со способами доставки компонентов системы в клетку, так и с функциональной активностью самой системы (недостаточное целевое или нежелательное нецелевое действия). В обзоре обозначены основные риски при использовании систем редактирования генома. Установлено, что для снижения рисков применения систем редактирования генома предпочтительно проведение репарации разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации, использование обладающих большей специфичностью и точностью рестрикции систем редактирования генома и эндонуклеаз в их составе, увеличение специфичности гРНК (для CRISPR/Cas), контролируемая коррекция активности элементов системы регуляции клеточного цикла и апоптоза, регуляция продолжительности экспрессии и персистенции компонентов систем редактирования генома в клетках и др.

Заключение. Освещение основных рисков, связанных с применением этой группы препаратов, является актуальным в связи с необходимостью предоставления данных в регистрационном досье на высокотехнологичный лекарственный препарат, касающихся оценки качества, эффективности и безопасности.

Ключевые слова: генотерапевтические лекарственные препараты; редактирование генома; генетические мутации; нецелевые эффекты; риски; разрывы ДНК; CRISPR/Cas9

Для цитирования: Рачинская О.А., Мельникова Е.В., Меркулов В.А. Актуальные направления и риски применения препаратов на основе технологий редактирования генома. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):247–261. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-247-261>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. В.А. Меркулов – главный редактор журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2021 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Current trends and risks associated with the use of therapies based on genome editing

Olga A. Rachinskaya^{1,✉}, Ekaterina V. Melnikova¹, Vadim A. Merkulov^{1,2}

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

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

✉ Olga A. Rachinskaya; Rachinskaya@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. To date, multiple approaches to genome editing have been developed based on different genome-editing systems (GESs) and genome modifications that result in single- or double-strand DNA breaks, either *in vivo* or *ex vivo*, followed by homologous recombination or non-homologous end joining to restore the sequence. However, the use of GESs is associated with a number of potential risks arising from the complex biology of such medicinal products and the fundamental role of their target, i.e. the DNA molecule.

Aim. This study analysed the most relevant trends and risks associated with medicinal products based on genome editing, the ways taken to overcome these risks, and the research methods used to identify and control the development of undesirable effects.

Discussion. According to the literature, the adverse effects of GESs may arise both from the methods used to deliver GES components into the cell and from the functional activity of the GES itself, which includes insufficient on-target or undesirable off-target effects. This review indicates the main risks associated with the use of GESs. Preferable strategies to mitigate the risks of using GESs include repairing DNA breaks by homologous recombination, selecting GESs and related endonucleases that have greater specificity and restriction accuracy, increasing guide RNA specificity (for CRISPR/Cas), correcting the activity of the system regulating the cell cycle and apoptosis in a controlled manner, regulating the duration of expression and persistence of GES components in cells, etc.

Conclusions. The requirement to include quality, efficacy, and safety data when submitting registration dossiers for advanced therapy medicinal products prompts the discussion of the main risks associated with such products.

Key words: gene therapy products; genome editing; genetic mutations; off-target effects; risks; DNA breaks; CRISPR/Cas9

For citation: Rachinskaya O.A., Melnikova E.V., Merkulov V.A. Current trends and risks associated with the use of therapies based on genome editing. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):247–261. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-247-261>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. V.A. Merkulov has been the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Внедрение новых технологий генной терапии в медицинскую практику вселяет большие надежды на создание новых инструментов для лечения редких (в большинстве случаев орфанных) генетически обусловленных заболеваний, ранее считавшихся неизлечимыми. Для многих таких заболеваний не существует адекватных методов лечения с использованием традиционных лекарственных препаратов (ЛП), а применяется лишь поддерживающая и паллиативная терапия. До недавнего времени генная терапия определялась как возможность добавления исправленных генетических последовательностей, способных экспрессировать функционально активный белок или РНК в клетки человека [1]. В отличие от такого подхода редактирование генома нацелено на модификацию самих генов пациента, мутации в которых приводят к развитию заболевания, путем изменения последовательности их нуклеотидов (в том числе полное выключение (нокаут) гена(ов)). Таким образом, редактирование генома, как и генную терапию в целом, можно отнести к персонализированной медицине, позволяющей подобрать индивидуальный подход к лечению заболеваний, которыми страдает небольшой процент людей или даже единственный пациент.

В руководствах по генотерапевтическим продуктам по применению технологий редактирования генома в Европейском союзе (European Medicines Agency, EMA)¹, США (U.S. Food and Drug Administration, FDA)² и Японии (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, PMDA)³ указываются два принципиально разных подхода к проведению процедуры редактирования генома соматических клеток (редактирование генома эмбрионов в данных руководствах не рассматривается). *In vivo* терапия основана на непосредственном введении системы редактирования генома (СРГ) в организм пациента, где с помощью специально разработанных механизмов доставки она попадет в целевые клетки. *Ex vivo* терапия подразумевает модификацию полученных от доноров клеток *in vitro* с последующим введением этих отредактированных клеток в организм пациента.

Согласно нормативно-правовым актам Евразийского экономического союза, в частности,

в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения»⁴ (далее Решение Совета ЕЭК № 78), препараты на основе СРГ относятся к генотерапевтическим лекарственным препаратам (ГТЛП), при регистрации которых необходимо учитывать следующее: комплекс из системы доставки и последовательности ДНК самой СРГ, вводимый непосредственно в организм пациента для терапии *in vivo*, является активным веществом в составе ЛП, тогда как в случае терапии *ex vivo* этот же комплекс принято считать лишь исходным сырьем, а активным веществом являются клетки с отредактированным геномом, вводимые пациенту (п. 17.3.2.1.3–17.3.2.1.5).

Возникающие споры относительно применения СРГ касаются ряда существующих этических моментов, которые могут быть нарушены при внедрении подобных технологий в медицинскую практику. При осуществлении редактирования эмбрионов существует риск передачи непредвиденных и побочных эффектов из поколения в поколение, и нет определенности в порядке возложения ответственности за принятие решения о проведении процедуры пренатального редактирования на родителей, врача либо третью сторону [2]. Нарушение этических норм, возможно, произошло при получении Jiankui He с коллегами эмбрионов человека, устойчивых к ВИЧ-инфекции [3], что вызвало неоднозначную оценку данного события и серьезные опасения по поводу целесообразности применения данной технологии в связи с отсутствием анализа соотношения «польза – риск» и существование сомнений в функциональной активности модифицированного белка подобно аномальному белку CCR5Δ32, встречающемуся у небольшого процента людей, устойчивых к ВИЧ [4]. Поэтому анализ и оценка рисков применения препаратов на основе технологий редактирования генома является основным критерием в случае принятия решения об их разработке и внедрении в практику.

Цель работы – анализ актуальных направлений и рисков, связанных с применением препаратов на основе систем редактирования генома,

¹ Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev.1-corr). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically-modified_en-0.pdf

² Human gene therapy products incorporating human genome editing. Draft guidance for industry. FDA; 2022.

³ White-paper for quality and safety for gene therapy products using gene editing technology. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Japan; 2020. <https://www.pmda.go.jp/files/000237636.pdf>

⁴ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

способов снижения рисков и методов их исследования, используемых для выявления и контроля возникновения нежелательных эффектов.

Следует уточнить, что в настоящей работе рассматриваются исключительно препараты для редактирования соматических клеток, за исключением клеток эмбрионов, редактирование которых в России запрещено⁵.

Виды редактирования генома

Редактирование генома с внесением двухцепочечного разрыва ДНК

Данные технологии редактирования генома основаны на внесении двухцепочечных разрывов в определенные участки ДНК и механизмах их репарации. Существуют два основных механизма репарации повреждений ДНК в клетках: гомологичная рекомбинация (ГР) и нехомологичное соединение концов (НСК). При ГР для восстановления отсутствующего участка ДНК в клетку вводится последовательность ДНК (ДНК матрица), гомологичная локусу разрыва, и используются эндогенные механизмы рекомбинации самой клетки. При НСК репарация осуществляется путем сшивания концов ДНК без использования матрицы. И ГР, и НСК могут применяться при модификации генома в терапевтических целях. Существуют особенности применения обоих подходов: так, к НСК можно прибегнуть практически в течение всего клеточного цикла, в то время как к ГР — только на стадии репликации ДНК (в фазах S/G2) [5]. При этом даже при корректной процедуре репарации в обоих случаях могут возникнуть непреднамеренные генетические аномалии в последовательности ДНК [6, 7].

Высокая способность к гомологичной рекомбинации отмечается в эмбриональных стволовых клетках⁶ [8]. Точное редактирование генома с последующим восстановлением двухцепочечного разрыва посредством ГР оказалось довольно эффективным и для ряда линий опухолевых клеток [9]. Напротив, редактирование геномов нетрансформированных клеток труднее осуществить из-за возникающего с большой долей вероятности апоптоза в ответ на повреждение ДНК и/или более вероятного осуществления

репарации ДНК по принципу НСК [10, 11]. В настоящее время разработано несколько перспективных подходов к повышению эффективности редактирования генома клеток посредством ГР, основанных на увеличении концентрации матрицы репарационной ДНК, доставке ингибиторов НСК и оптимизации методов трансфекции ДНК матрицы [12–14].

Для одновременного нокаута более чем одного гена или проведения более эффективной ГР разработано редактирование генов с осуществлением двух или более двухцепочечных разрывов ДНК. Такой подход приводит к повышению вероятности возникновения крупных хромосомных aberrаций, например транслокаций и делеций, поэтому в японском руководстве по ГТЛП, получаемых с использованием СРГ, приводятся рекомендации по проведению исследований для выявления возникающих хромосомных аномалий⁷.

Редактирование генома без внесения двухцепочечного разрыва ДНК

Для предотвращения образования хромосомных aberrаций возможно применение технологии редактирования генома без осуществления двухцепочечных разрывов ДНК. С помощью каталитически инактивированной нуклеазы Dead Cas9, фермента дезаминазы или с помощью эпигенетических модификаций генома, таких как метилирование ДНК, можно добиться разрезания только одной цепи целевой последовательности ДНК с последующей заменой азотистых оснований. Однако эти технологии редактирования генома могут также вызывать неблагоприятные события, характерные и для редактирования генома с двухцепочечными разрывами: длительное сохранение активности фермента или нецелевой (off-target) эффект⁸ [11].

Системы редактирования генома

Наиболее широкое распространение получили СРГ трех типов: ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9 [15]. Системы редактирования генома «цинковые пальцы» (zinc-finger nucleases, ZFN) и TALEN (transcription activator-like effector nucleases) [16] содержат в качестве фермента рестрикции

⁵ Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Федеральный закон от 20.05.2002 № 54-ФЗ «О временном запрете на клонирование человека». Приказ Минздрава России от 30.08.2012 № 107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

⁶ White-paper for quality and safety for gene therapy products using gene editing technology. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Japan; 2020. <https://www.pmda.go.jp/files/000237636.pdf>

⁷ Там же.

⁸ Там же.

эндонуклеазу FokI, которая осуществляет двухцепочечные разрывы в специфических сайтах целевых последовательностей ДНК. Распознавание определенных последовательностей ДНК осуществляется данными СРГ с помощью ДНК-связывающих белковых доменов, конструирование которых требует существенных материальных и трудовых затрат.

В международном реестре клинических исследований (КИ)⁹ представлены в настоящее время КИ (параметры поиска: ключевые слова – zinc-finger nuclease; статус КИ – все, за исключением «Unknown» и «Withdrawn») с применением системы ZFN преимущественно для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов (NCT02388594, NCT03617198, NCT01044654, NCT02500849, NCT03666871, NCT01252641, NCT02225665, NCT04201782, NCT01543152). Кроме того, ZFN применяется в единичных КИ для лечения β-талассемии (NCT03432364), серповидноклеточной анемии (NCT03653247), гемофилии (NCT02695160) и мукополисахаридоза 1 и 2 типов (NCT03041324, NCT02702115, NCT04628871). Все перечисленные КИ проводились или проводятся исключительно в США. В большинстве представленных КИ (n=12) с СРГ ZFN спонсором является компания Sangamo Therapeutics.

Необходимо отметить, что по состоянию на июнь 2023 г. для системы TALEN все КИ (параметры поиска: ключевое слово – TALEN, статус КИ – все, за исключением «Unknown» и «Withdrawn») имеют статус «Набор пациентов (Recruiting)», а заболевания, для которых они используются, включают только онкологические: злокачественные новообразования, связанные с инфицированием вирусом папилломы человека (NCT03226470, Китай); рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома (NCT04142619, США); рецидивирующий/рефрактерный острый миелоидный лейкоз (NCT03190278, США); В-клеточные неходжкинские лимфомы (NCT05607420, США, Франция, Испания); В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (NCT04150497, США, Франция); рецидивирующая/рефрактерная крупноклеточная лимфома (NCT04416984, США). В четырех из шести входящих в реестр КИ спонсором является компания Cellectis S.A., в Китае КИ проводится Хуачжунским университетом науки и техники.

Метод коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных кластерами (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), с CRISPR-ассоциированным белком

(CRISPR-associated proteins, Cas) [17] предполагает другой подход к распознаванию последовательности ДНК – использование однокитевой гидовой РНК (гРНК). Конструкция CRISPR/Cas характеризуется простотой использования и относительно невысокой стоимостью [18].

Система CRISPR/Cas была применена для борьбы с целым рядом генетических заболеваний [19–23]. Например, она использовалась для исправления мутации в гене дистрофина, приводящей к развитию мышечной дистрофии Дюшенна, что позволило восстановить нормальную экспрессию гена [21]. Восстановление морфологических и функциональных свойств мышечной ткани было продемонстрировано на моделях мелких [24] и крупных животных [25] при доставке нуклеазы в клетки пораженной мышцы с помощью вирусного вектора. Также система CRISPR/Cas была использована для получения пролонгированного терапевтического эффекта посредством редактирования генома гемопоэтических стволовых клеток при исправлении мутаций, приводящих к развитию серповидноклеточной анемии [26].

В настоящее время на информационном портале ClinicalTrials.gov¹⁰ КИ при использовании СРГ CRISPR/Cas9 (параметры поиска: ключевое слово – CRISPR; статус КИ – все, за исключением «Unknown» и «Withdrawn») посвящены лечению различных по своей этиологии заболеваний, например: трансфузионно-зависимой β-талассемии и серповидноклеточной анемии (NCT03655678 – США, Канада, Германия, Италия, Великобритания; NCT03745287 – США, Канада, Германия, Италия, Великобритания, Бельгия, Франция; NCT05356195 – США, Канада, Германия, Италия, Великобритания; NCT05329649 – США, Германия, Италия, Великобритания; NCT05477563 – США, Италия; NCT05444894 – США; NCT04853576 – США, Канада); метастатического рака желудочно-кишечного тракта (NCT04426669 – США); наследственного ангионевротического отека (NCT05120830 – Франция, Нидерланды, Новая Зеландия, Великобритания); рецидивирующих или рефрактерных Т- или В-клеточных злокачественных новообразований (NCT04502446 – США, Австралия, Канада; NCT04438083 – США, Австралия, Канада, Нидерланды; NCT04035434 – США, Австралия, Канада, Германия, Испания); транстиретиновой семейной амилоидной полинейропатии и кардиомиопатии, связанных с транстиретиновым амилоидозом (NCT04601051 – Франция, Новая Зеландия, Швеция, Великобритания);

⁹ U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/>

¹⁰ Там же.

инфицированных ВИЧ-1 пациентов с авиремией, получающих стабильную антиретровирусную терапию (NCT05144386 — США); рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломы (NCT04244656 — США, Австралия, Канада, Испания); семейной гиперхолестеринемии и сердечно-сосудистых заболеваний (NCT05398029 — Новая Зеландия, Великобритания); амвроза Лебера типа 10 (NCT03872479 — США). Причем необходимо отметить, что спонсорами КИ с применением CRISPR/Cas9 для лечения генетических заболеваний являются следующие компании: в 5 КИ — Vertex Pharmaceuticals Incorporated, в 2 КИ — Intellia Therapeutics, в 2 КИ — Editas Medicine, Inc., в 1 КИ — Intellia Therapeutics.

В официальном национальном реестре КИ Китая¹¹ (параметры поиска: ключевые слова — zinc-finger nuclease, ZFN, TALEN, CRISPR, gene editing) на июнь 2023 г. содержится информация только о трех (недиагностических) КИ с использованием СРГ CRISPR/Cas9: для лечения пациентов с трансфузионно-зависимой β -талассемией (ChiCTR2100053406, ChiCTR2100052858) и для лечения дефектов хряща (ChiCTR2100041827).

Таким образом, можно сделать вывод, что препараты на основе ZFN используются в большинстве КИ для лечения пациентов с ВИЧ, продукты на основе TALEN — для лечения онкогематологических заболеваний, а препараты на основе CRISPR/Cas — преимущественно для лечения генетических и онкологических заболеваний. Спонсорами, проводящими большинство КИ, содержащихся в реестре КИ, с системой ZFN является компания Sangamo Therapeutics, с системой TALEN — Collectis S.A., с системой CRISPR/Cas9 — Vertex Pharmaceuticals Incorporated.

Способы доставки компонентов системы редактирования генома в клетку

Компоненты СРГ могут быть доставлены в целевые клетки в виде последовательности ДНК, с которой будет осуществляться экспрессия желаемых белков, в сочетании с системой доставки или без нее; в виде мРНК, с последующей трансляцией желаемого белка; или в виде уже готовых белковых продуктов¹² [11].

Выбор оптимального способа доставки компонентов СРГ в клетку необходим для осуществления эффективной трансфекции при сохранении достаточного количества жизнеспособных трансфицированных клеток. При этом важно учитывать преимущества и недостатки имеющихся систем доставки.

При редактировании генома *in vivo* доставка компонентов СРГ чаще всего осуществляется с помощью вирусных векторов и наночастиц [27, 28]. В случае применения вирусных векторов выбор вектора зависит от предельного размера нуклеиновой кислоты, которая должна быть доставлена в клетку. Кроме того, следует учитывать тропность вектора к целевым клеткам и тканям, а также возможность ограничения попадания трансгена в ткани, не являющиеся мишенями. Важным моментом является возможность регуляции экспрессии компонентов СРГ, например с помощью использования тканеспецифичных промоторов и низкомолекулярных ингибиторов. Вирусные векторы могут поддерживать длительную экспрессию трансгена, в то время как наночастицы используются для кратковременной экспрессии. С помощью плазмиды или вирусного вектора, например сконструированного на основе аденоассоциированного вируса (ААВ), также можно доставить в клетку и матрицу ДНК, с которой будет осуществляться гомологичная рекомбинация при репарации опосредованного нуклеазой разрыва ДНК¹³.

При редактировании генома *ex vivo* доставку компонентов системы в клетку в большинстве случаев осуществляют с помощью электропорации и других физических методов. В этом случае компоненты СРГ могут быть доставлены в клетки в виде не только ДНК, но и мРНК или белкового комплекса¹⁴ [29].

Риски, связанные с использованием систем редактирования генома

Многочисленные исследования редактирования генома с помощью СРГ как на клеточных культурах, так и на эмбрионах выявили возможность возникновения целого ряда неблагоприятных последствий [30–33]. В связи с этим необходимо проведение предварительных

¹¹ Chinese clinical trial registry. <https://www.chictr.org.cn/searchprojEN.html>

¹² White-paper for quality and safety for gene therapy products using gene editing technology. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Japan; 2020. <https://www.pmda.go.jp/files/000237636.pdf>
Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev.1-corr). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically-modified_en-0.pdf

¹³ Human gene therapy products incorporating human genome editing. Draft guidance for industry. FDA; 2022.

¹⁴ White-paper for quality and safety for gene therapy products using gene editing technology. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Japan; 2020. <https://www.pmda.go.jp/files/000237636.pdf>

исследований с целью оценки рисков и снижения частоты развития нежелательных явлений от применения препаратов такого типа, а также оптимизации методов, позволяющих обнаруживать такие явления.

1. Риски, связанные с использованием векторов и других способов доставки компонентов систем редактирования генома в клетку

Риск трансдукции нецелевой популяции клеток. Продукты генной терапии для редактирования генома с использованием вирусного или плазмидного вектора требуют дополнительной доклинической оценки безопасности, аналогичной исследованиям, проводимым для любого продукта генной терапии, в связи с возможным риском трансдукции нецелевой популяции клеток при применении препаратов *in vivo*. При этом следует оценивать тропность вирусного вектора (природную или модифицированную) и биораспределение векторных конструкций в определенных типах клеток или тканей. Частоту генетической модификации клеток-мишеней и нецелевых клеток необходимо анализировать посредством оценки коэффициента инфекционности вектора¹⁵.

Инсерционный мутагенез. Инсерционный мутагенез является существенным риском для ряда генотерапевтических ЛП. Он сопряжен со встраиванием трансгена в геном клетки-хозяина, например при использовании в качестве способа доставки трансгена в клетки лентивирусных и ретровирусных векторов. Для способов невирусной доставки элементов СРГ в целевые клетки, получивших наибольшее распространение при терапии *ex vivo*, таких как нуклеофекция [30], электропорация [34], липофекция, а также доставки с помощью вирусных векторов на основе аденовирусов и AAV [35], интродукция трансгена в геном клетки-хозяина не характерна, и поэтому проблема инерционного мутагенеза, считается маловероятной.

Риск модификации генов в клетках зародышевой линии. Риск попадания вирусного вектора и трансгена в клетки зародышевой линии и осуществление в них целевой активности СРГ характерен для группы препаратов, осуществляющих редактирование генома *in vivo*, применяемых у детей и пациентов репродуктивного возраста, что требует отдельного обоснования при подтверждении безопасности применения таких препаратов [36], а также возможной оценки влияния произведенной процедуры на последующие поколения.

2. Риск подавления экспрессии трансгена

Даже при эффективной доставке СРГ с помощью вектора в целевые клетки экспрессия РНК и белков системы СРГ может оказаться угнетена. Такой эффект может стать результатом генетической или эпигенетической нестабильности, а также результатом активации механизмов подавления экспрессии самой клетки [37].

3. Риски, связанные с целевым действием систем редактирования

Возникновение хромосомных перестроек. Целевое действие СРГ, приводящее к активации природных механизмов репарации поврежденной ДНК, может стать причиной возникновения мутагенеза. Восстановление двухцепочечного разрыва, индуцированного нуклеазой, путем негомологичного соединения концов может привести к образованию делеций и инсерций. Такие мутации часто имеют небольшой размер, иногда всего в один нуклеотид [38], однако возможно выпадение и больших участков ДНК, измеряемых уже тысячами пар нуклеотидов [39]. Возникновение крупных хромосомных перестроек было продемонстрировано в работе по редактированию одноклеточных зигот мыши [40] и в исследовании *in vivo*, в котором система CRISPR/Cas9 использовалась для исправления мутации в гене *Otc*. В результате было выявлено, что 6,5% отредактированных клеток несли крупные делеции [41]. Такие крупные мутации могут привести к дезактивации целых генов или вызвать нарушение регуляции соседних экспрессируемых последовательностей.

Восстановление последовательности ДНК между двумя или более двухцепочечными разрывами (если редактирование генома подразумевает образование разрывов в нескольких участках одной хромосомы) также может приводить к делетированию последовательности ДНК между этими разрывами (что может само по себе стать целью эксперимента) или образованию инверсий или дупликаций данного локуса с последующей инсерцией дублированного района в различные участки генома [32]. При образовании разрывов ДНК в разных участках генома могут возникнуть межхромосомные транслокации, которые, в свою очередь, могут сопровождаться дезактивацией генов-супрессоров опухолей или стать причиной образования химерных белков, приводящих к развитию рака, таких как, например, конститутивно активная тирозинкиназа — продукт экспрессии химерного гена *BCR-ABL*, образованного в результате

¹⁵ Там же.

реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22 [42].

Инициация апоптоза клеток. Образование разрыва ДНК в результате нуклеазной активности может привести к остановке клеточного цикла и, при нарушениях механизмов репарации, ее апоптозу. По этой причине редактирование генов часто сопровождается цитотоксичностью, а эффективность модификации генома может оказаться намного ниже предполагаемой.

Однако если клетка, подвергающаяся процедуре редактирования генов с помощью СРГ, несет нарушения в генах системы репарации или в генах, отвечающих за регуляцию клеточного цикла, она может избежать апоптоза и приобрести селективное преимущество перед клетками без таких мутаций при культивировании или при делении в организме пациента.

В работе E. Naaraniemi с соавт. [43] было показано, что редактирование генома с помощью CRISPR-Cas9 индуцирует p53-опосредованный ответ на повреждение ДНК, что приводит к остановке клеточного цикла. Наблюдаемый эффект зависит от экспрессии генов белков апоптоза p53, p21 и pRB. Ген pRB опосредует остановку клеточного цикла в фазе G1 в ответ на накопление белка p21 [44]. Для запуска остановки клеточного цикла достаточно даже небольшого количества повреждений ДНК. Нуклеаза Cas9 при этом может оставаться связанной с местом разрыва в течение более 6 часов, возможно, препятствуя успешному восстановлению клеточного цикла и/или вызывая остановку вилок репликации. Ингибирование передачи сигналов о повреждении ДНК может повысить эффективность точного редактирования генома в нормальных нетрансформированных клетках. Однако ингибирование p53-опосредованного механизма также повышает вероятность возникновения в геноме клетки хромосомных аномалий.

В работе R.J. Ihry с соавт. [45] было показано, что редактирование плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека сложно осуществить. В большинстве ПСК с интегрированной нуклеазой Cas9, осуществляющей двухцепочечные разрывы ДНК, наблюдались проявления цитотоксичности с последующей гибелью клеток. Было выявлено, что токсический ответ на двухцепочечный разрыв является p53-опосредованным и эффективность геномного редактирования ПСК человека с геном TP53 дикого типа была сильно снижена. Однако в популяции ПСК человека с приобретенной мутацией в гене TP53 в среднем осуществление целевых инсерций или делеций было достигнуто в 80 % клеток.

В дальнейшем, отбирая клетки, в которых процедура редактирования генома была успешной, исследователи ненамеренно могут селектировать клоны клеток, потенциально обладающие туморогенностью, которые при использовании в терапевтических целях могут привести к возникновению опухолей у пациентов. Данная проблема, возникающая с частотой, превышающей даже вероятность нецелевого метагенеза, вызвала сомнения в целесообразности применения всей технологии редактирования генома в целом.

Биаллельное редактирование. Высокая активность нуклеаз СРГ часто может приводить к редактированию обеих аутомомных копий гена-мишени. Это представляется возможным в случаях, когда полная потеря функции гена является целью для достижения терапевтического эффекта, однако часто возникают ситуации, когда необходимо воздействовать только на одну копию гена, в частности при попытке исправить или удалить доминантные гетерозиготные мутации. Хотя современные методы молекулярной биологии позволяют сконструировать СРГ для исправления определенной аномальной копии гена, толерантность систем к небольшим несовпадениям в последовательности ДНК может затруднить способность различать мутантную и нормальную копии гена. Следует обратить внимание, что множество мутаций, приводящих к развитию заболевания, представляют собой однонуклеотидные замены в гене, отличить которые от последовательности генов дикого типа для СРГ весьма затруднительно, что может привести к образованию разрывов в нормальной копии гена или даже повторному редактированию ранее репарированной мутации [32].

Отсутствие целевой активности систем редактирования генома. Отсутствие целевой активности СРГ – ситуация обратная биаллельному редактированию гетерозиготной мутации, при которой происходит узнавание СРГ и внесение разрыва нуклеазой только в одном аллеле целевого гена при сохранении интактным другого аллеля. Именно такое явление было показано при проведении исследования доктором Jiankui He по генетическому редактированию гена CCR5 у эмбрионов с помощью CRISPR/Cas9 с целью их защиты от ВИЧ-инфекции [32]. При этом у одного из эмбрионов была выявлена делеция в 15 п.н. только в одном аллеле гена, тогда как другой аллель остался интактным. Как следствие, интактный аллель гена CCR5 остался экспрессионно активным и с него происходила транскрипция хемокинового рецептора дикого типа, который делал Т-клетки

одной из родившихся девочек восприимчивыми к инфицированию ВИЧ [32].

Риск длительной персистенции в организме пациента. Чем дольше время персистенции компонентов СРГ (в первую очередь нуклеазы), тем выше риск возникновения непреднамеренных модификаций генома, особенно нецелевого редактирования и возникновения хромосомных перестроек. Поэтому для снижения нежелательных эффектов необходимо, чтобы длительность персистенции компонентов, по возможности, не превышала время, требующееся для достижения желаемой модификации генома.

4. Риски, связанные с нецелевыми эффектами

Нецелевое действие систем редактирования генома (нежелательный мутагенез). Случаи возникновения нежелательных мутаций в нецелевых сайтах стали регистрироваться учеными с начала применения СРГ [30]. Показано, что использование СРГ сопряжено с риском осуществления нежелательной рестрикционной активности фермента в локусах генома, сходных по последовательности с целевым участком ДНК [30, 46].

Следует отметить, что специфичность действия разных СРГ и отдельных их компонентов может сильно варьировать. Так, нуклеаза FokI — фермент, входящий в состав систем ZFN и TALEN, — разрезает только одну цепь ДНК (в отличие от Cas9), поэтому для распознавания последовательности ДНК выше и ниже целевого сайта расщепления требуются две СРГ. Таким образом, при осуществлении одного двухцепочечного разрыва происходит распознавание последовательности от 18 до 40 оснований, что в два раза превышает размер последовательности нуклеотидов, необходимой для специфического узнавания. Это делает специфичность распознавания ДНК-мишени как ZFN, так и TALEN достаточно высокой. В свою очередь, гРНК системы CRISPR/Cas может осуществить связывание с последовательностью ДНК-мишени даже при наличии несовпадений вплоть до пяти пар оснований, что связано с ошибками распознавания гРНК и образованием комплекса гРНК с последовательностью ДНК с низкой аффинностью [30].

С целью уменьшения нецелевых эффектов CRISPR/Cas было исследовано влияние на точность редактирования длины гРНК или вторичной структуры последовательности ДНК-мишени [47, 48]. Однако надежная стратегия для увеличения специфичности системы пока не выработана. В связи с этим ведутся активные исследования с целью создания более высокоспецифичных гРНК. В работе D.D. Kosak

с соавт. [49] показано увеличение специфичности CRISPR/Cas9 путем изменения вторичной структуры (создание шпильчатой структуры) в спейсерной области гРНК.

Другим подходом к решению проблемы возникновения нецелевых эффектов является разработка ферментов, обладающих большей избирательностью, например использование модифицированных Cas [49–51]. Примером такой модификации может быть внесение единственной точечной мутации (p.R691A) в последовательность эндонуклеазы Cas9, в результате чего при редактировании мутации (p.E6V), приводящей к развитию серповидноклеточной анемии, был применен ее высокоточный (HiFi Cas9) аналог [52]. Также было показано, что ортологи нуклеазы Cas9, полученные из альтернативных видов бактерий, могут обладать большей точностью внесения разрывов в ДНК [51, 53].

Риск возникновения нежелательного мутагенеза также может возрасти при высокой концентрации и длительной персистенции нуклеазы в организме [54], поэтому более предпочтительным является использование нуклеазы с ограниченной активностью и коротким сроком персистенции [55]. Показано, что сокращение периода активности нуклеазы Cas9 снижает уровень мозаицизма, возникающего в результате редактирования генома в клетках эмбрионов нечеловекообразных приматов [56].

Большое значение имеет и выбор в целевом гене сайта рестрикции с максимально уникальной последовательностью нуклеотидов, для чего в биоинформатике разработан ряд алгоритмов, позволяющих провести оценку возможности возникновения разрывов в нецелевых сайтах генома [57, 58]. Однако подобные алгоритмы не способны учитывать внутривидовой однонуклеотидный полиморфизм (single-nucleotide polymorphism, SNP) [59]. Эту проблему можно решить лишь при адаптации СРГ в рамках персонализированного подхода.

5. Риск иммуногенности

Риск развития иммуногенности в ответ на применение препаратов на основе СРГ может быть вызван как введением векторной системы доставки, так и элементами самой СРГ, например нуклеазами. Иммуногенность нуклеаз обусловлена их бактериальным происхождением, как в случае с нуклеазами Cas. Поэтому даже при генной терапии *ex vivo* клетки, введенные пациенту, экспрессируют ферменты, которые распознаются иммунной системой реципиента как гетерологичные антигены. Возникающая иммуногенность может дополнительно

сопровождаться иммунотоксичностью, ослаблением терапевтического эффекта продукта и развитием анафилаксии¹⁶.

6. Риск использования аллогенных клеток при *ex vivo* терапии

В случае если препарат содержит аллогенные клетки, отредактированные *ex vivo*, и может быть применен для многих пациентов, целесообразным является проведение дополнительных исследований, например скрининга доноров клеток с целью снижения риска передачи инфекционных заболеваний. Также важным аспектом является проведение анализа процесса редактирования генома в целевых и нецелевых сайтах и дополнительные испытания на выявление туморогенного потенциала.

Производство препаратов для аллогенного применения вообще и в случае продуктов на основе СРГ в частности требует создания аттестованных банков клеток (главного и рабочего банков) и паспортизации хранящихся в них клеточных линий.

Подходы к анализу эффективности и безопасности редактирования генома и методы выявления нежелательных последствий

Рассмотренные выше риски, связанные с применением ГТЛП, основанных на применении СРГ, требуют определенных подходов при подтверждении эффективности и безопасности их использования. В настоящее время регуляторные органы в США, Европейском союзе и Японии разрабатывают рекомендации для производителей, содержащие основные подходы к оценке эффективности и безопасности применения этих продуктов. Необходимые характеристики препаратов на основе СРГ, которые должны быть определены согласно проекту руководства FDA¹⁷, представлены на *рисунке 1*.

Для выявления нежелательных эффектов, возникающих в результате действия СРГ, существует целый арсенал методов молекулярно-генетического анализа. Каждый отдельный метод предназначен для конкретных целей и имеет ограничения в применении и пределы обнаружения, которые необходимо учитывать.

Мелкие мутации, чаще всего представленные делециями, могут быть идентифицированы с помощью гетеродуплексного анализа. Этот метод, основанный на ПЦР, наилучшим образом подхо-

дит для анализа коротких геномных фрагментов с известной последовательностью. С другой стороны, гетеродуплексный анализ не подходит для полногеномного скрининга. В этом случае лучшей альтернативой может быть секвенирование, которое в зависимости от характера анализируемой последовательности генома может быть целевым (таргетным) или полногеномным.

Целевое секвенирование, позволяющее установить последовательность нуклеотидов в ампликонах, является одним из предпочтительных подходов для изучения определенных областей генома. При неоднородности популяция клеток для анализа решающее значение приобретает охватываемый диапазон ампликонов для секвенирования: если нежелательную мутацию несет только небольшой процент клеток, низкий диапазон последовательностей может не позволить выявить нежелательные геномные варианты, как и в случае с гетеродуплексным анализом. Недостатком целевого секвенирования является то, что оно позволяет анализировать только небольшую часть генома и не исключает наличия мутаций за пределами выбранной области.

Использование полногеномного секвенирования (whole-genome sequencing, WGS) возможно при изучении клональных и гомогенных клеточных популяций, в которых большинство клеток имеет одинаковый геномный профиль. Преимуществом WGS является его способность обнаруживать мутации независимо от их природы и положения в геноме. Однако данный метод характеризуется длительностью анализа. Внедрение автоматической очистки ДНК с последующей подготовкой библиотеки и секвенированием способствовало значительному сокращению времени проведения анализа [60] и позволило методу полногеномного секвенирования получить статус «рутинного».

Полное и достоверное выявление изменений в геноме (в том числе хромосомных перестроек) возможно лишь при комплексном подходе с использованием разнообразных методов анализа: стратегии генотипирования на основе ПЦР, секвенирования следующего поколения (NGS) с использованием коротких или длинных прочтений, саузерн-блоттинга, методов цитогенетического анализа (G-бэндинг, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), в том числе многоцветная FISH (mFISH)), а также метода сравнительной геномной гибридизации (CGH). Но следует учитывать, что риск не выявить ано-

¹⁶ White-paper for quality and safety for gene therapy products using gene editing technology. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Japan; 2020. <https://www.pmda.go.jp/files/000237636.pdf>

¹⁷ Human gene therapy products incorporating human genome editing. Draft guidance for industry. FDA; 2022.



Рис. 1. Подходы к оценке эффективности и безопасности препаратов на основе систем редактирования генома (СРГ) (подготовлен авторами по данным руководства FDA¹⁸).

Fig. 1. Approaches to assessing the efficacy and safety of medicinal products based on genome-editing systems (GES) (compiled by the authors using the FDA guidance¹⁸).

манию сохраняется даже при таком подходе вследствие ограничений применения каждого

метода [32]. Например, G-бэндинг и окрашивание хромосом при mFISH можно произвести

¹⁸ Human gene therapy products incorporating human genome editing. Draft guidance for industry. FDA; 2022.

только на клетках на стадии метафазы митоза. При этом требуется провести анализ большого количества клеток. Многоцветная FISH позволяет увидеть межхромосомные транслокации, однако с трудом выявляет внутривхромосомные перестройки небольшого размера, например инверсии. С помощью CGH возможно анализировать аномальные амплификации и делеции генов, когда они характерны для большого числа клеток, однако чувствительность CGH слишком низка для обнаружения aberrаций ДНК, которые не являются клональными или встречаются лишь в небольшом проценте клеток [61].

Заключение

Системы редактирования генома позволяют проводить специфичную модификацию генома эукариотических клеток. В настоящее время ученые и разработчики генотерапевтических лекарственных препаратов, созданных с применением технологий редактирования генома, используют в основном три типа систем редактирования генома: ZFN, TALEN и CRISPR/Cas (с различными модификациями), направленных, прежде всего, на преодоление нежелательных последствий от их применения (например, нецелевого редактирования, возникновения нежелательного мутагенеза или отсутствия целевой активности системы редактирования генома). Препараты, созданные с применением ZFN, разрабатываются преимущественно для лечения пациентов с ВИЧ, TALEN — с гемобластомами,

CRISPR/Cas — для терапии как генетических, так и онкологических заболеваний.

Для снижения рисков, связанных с использованием систем редактирования генома, предпочтительным становится проведение репарации разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации, применение обладающих большей специфичностью и точностью рестрикции систем редактирования генома и эндонуклеаз в их составе, увеличение специфичности гРНК (в случае системы CRISPR/Cas), контролируемая коррекция активности элементов системы регуляции клеточного цикла и апоптоза (например, контролируемое функционирование гена p53), регуляция продолжительности экспрессии и персистенции компонентов систем редактирования генома в клетках и другие молекулярно-генетические подходы.

Анализ рисков, связанных с применением препаратов, созданных на основе геномного редактирования, может быть использован при формировании пакета документов регистрационного досье о качестве, эффективности и безопасности препарата согласно Решению Совета ЕЭК № 78. Выявление основных рисков позволит обосновать отсутствие, сокращение или добавление некоторых исследований при разработке высокотехнологичных лекарственных препаратов и предоставление результатов исследований в материалах регистрационного досье на препараты данной группы.

Литература/References

1. Ребриков ДВ. Редактирование генома человека. *Вестник РГМУ*. 2016;(3):4–15.
Rebrikov DV. Human genome editing. *Bulletin of RSMU*. 2016;(3):4–15 (In Russ.).
EDN: [WFQBMX](#)
2. Uddin F, Rudin CM, Sen T. CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future. *Front Oncol*. 2020;10:1387.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01387>
3. Cyranoski D. The CRISPR-babyscandal: what's next for human gene-editing. *Nature*. 2019;566(7745):440–2.
<https://doi.org/10.1038/d41586-019-00673-1>
4. Cohen J. Did CRISPR help—or harm—the first-ever gene-edited babies? *Science*. 2019.
<https://doi.org/10.1126/science.aay9569>
5. Cox D, Platt R, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*. 2015;21(2):121–31.
<https://doi.org/10.1038/nm.3793>
6. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(9):712–20.
<https://doi.org/10.1038/nrm1202>
7. Guirouilh-Barbat J, Lambert S, Bertrand P, Lopez BS. Is homologous recombination really an error-free process? *Front Genet*. 2014;5:175.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00175>
8. Choi EH, Yoon S, Koh YE, Seo Y-J, Kim KP. Maintenance of genome integrity and active homologous recombination in embryonic stem cells. *Exp Mol Med*. 2020;52:1220–9.
<https://doi.org/10.1038/s12276-020-0481-2>
9. Creeden JF, Nanavaty NS, Einloth KR, Gillman CE, Stanbery L, Hamouda DM, et al. Homologous recombination proficiency in ovarian and breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1154.
<https://doi.org/10.1186/s12885-021-08863-9>
10. Lai JKH, Toh PJY, Cognart HA, Chouhan G, Saunders TE. DNA-damage induced cell death in yap1;wwtr1 mutant epidermal basal cells. *Elife*. 2022;11:e72302.
<https://doi.org/10.7554/eLife.72302>
11. Yamaguchi T, Uchida E, Okada T, Ozawa K, Onodera M, Kume A, et al. Aspects of gene therapy products using gene editing technology in Japan. *Hum Gene Ther*. 2020;31(19–20):1043–53.
<https://doi.org/10.1089/hum.2020.156>

12. Richardson C, Ray G, DeWitt M, Curie G, Corn J. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):339–44.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3481>
13. DeWitt MA, Magis W, Bray NL, Wang T, Berman JR, Urbinati F, et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med.* 2016;8(360):360ra134.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9336>
14. Lee K, Mackley VA, Rao A, Chong AT, Dewitt MA, Corn J, Murthy N. Synthetically modified guide RNA and donor DNA are a versatile platform for CRISPR-Cas9 engineering. *Elife.* 2017;6:e25312.
<https://doi.org/10.7554/eLife.25312>
15. Горяев АА, Савкина МВ, Мефед КМ, Бондарев ВП, Меркулов ВА, Тарасов ВВ. Редактирование генома и биомедицинские клеточные продукты: современное состояние, безопасность и эффективность. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2018;18(3):140–9.
Goryaev AA, Savkina MV, Mefed KM, Bondarev VP, Merkulov VA, Tarasov VV. Genome-editing and biomedical cell products: current state, safety and efficacy. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2018;18(3):140–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-140-149>
16. Kim M-S, Kini AG. Engineering and application of zinc finger proteins and TALEs for biomedical research. *Mol Cells.* 2017;40(8):533–41.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0139>
17. Yuanyuan X., Zhanjun Li. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;18:2401–15.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.031>
18. You L, Tong R, Li M, Liu Y, Xue J, Lu Y. Advancements and obstacles of CRISPR-Cas9 technology in translational research. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;13:359–70.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.02.008>
19. Pinjala P, Tryphena KP, Prasad R, Khatri DK, Sun W, Singh SB, et al. CRISPR/Cas9 assisted stem cell therapy in Parkinson's disease. *Biomater Res.* 2023;27(1):46.
<https://doi.org/10.1186/s40824-023-00381-y>
20. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *N Engl J Med.* 2021;384(3):252–60.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>
21. Erkut E, Yokota T. CRISPR therapeutics for Duchenne muscular dystrophy. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1832.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031832>
22. Graham C, Hart S. CRISPR/Cas9 gene editing therapies for cystic fibrosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2021;21(6):767–80.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1869208>
23. Porteus MH. A new class of medicines through DNA editing. *N Engl J Med.* 2019;380(10):947–59.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1800729>
24. Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Castellanos Rivera RM, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science.* 2016;351(6271):403–7.
<https://doi.org/10.1126/science.aad5143>
25. Amoasii L, Hildyard JCW, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, Caballero D, et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science.* 2018;362(6410):86–91.
<https://doi.org/10.1126/science.aau1549>
26. Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR, Turk R, Jacobi AM, Collingwood MA, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2018;24(8):1216–24.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0137-0>
27. Chandrasekaran AP, Song M, Kim KS, Ramakrishna S. Different methods of delivering CRISPR/Cas9 into cells. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018;159:157–76.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.05.001>
28. Chen F, Alphonse M, Liu Q. Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2020;12(3):e1609.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1609>
29. Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J Control Release.* 2017;266:17–26.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012>
30. Fu Y, Foden J, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013;31(9):822–6.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
31. Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4(11):e264.
<https://doi.org/10.1038/mtna.2015.37>
32. Davies B. The technical risks of human gene editing. *Hum Reprod.* 2019;34(11):2104–11.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dez162>
33. Zuccaro MV, Xu J, Mitchell C, Marin D, Zimmerman R, Rana B, et al. Allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos. *Cell.* 2020;183(6):1650–64.e15.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.025>
34. Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell.* 2013;12(4):393–4.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.03.006>
35. Obermeier M, Vadolas J, Verhulst S, Goossens E, Baert Y. Lipofection of non-integrative CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins in male germline stem cells: a simple and effective knockout tool for germline genome engineering. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:891173.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.891173>
36. Bittlinger M, Hoffmann D, Sierawska AK, Mertz M, Schambach A, Streh D. Risk assessment in gene therapy and somatic genome-editing: An expert

- interview study. *Gene and Genome Editing*. 2022;3–4:100011.
<https://doi.org/10.1016/j.ggedit.2022.100011>
37. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to *EV1* activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med*. 2010;16(2):198–204.
<https://doi.org/10.1038/nm.2088>
 38. Taheri-Ghahfarokhi A, Taylor BJM, Nitsch R, Lundin A, Cavallo AL, Madeyski-Bengtson K, et al. Decoding non-random mutational signatures at Cas9 targeted sites. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(16):8417–34.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky653>
 39. Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol*. 2018;36(8):765–71.
<https://doi.org/10.1038/nbt.4192>
 40. Boroviak K, Fu B, Yang F, Doe B, Bradley A. Revealing hidden complexities of genomic rearrangements generated with Cas9. *Sci Rep*. 2017;7(1):12867.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12740-6>
 41. Yang Y, Wang L, Bell P, McMenamin D, He Z, White J, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol*. 2016;34(3):334–8.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3469>
 42. Breese EH, Buechele C, Dawson C, Cleary ML, Porteus MH. Use of genome engineering to create patient specific MLL translocations in primary human hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136644.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136644>
 43. Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*. 2018;24(7):927–30.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0049-z>
 44. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(2):93–115.
<https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>
 45. Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, Frias E, Ho D, Theriault K, et al. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med*. 2018;24(7):939–46.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0050-6>
 46. Anderson KR, Haeussler M, Watanabe C, Janakiraman V, Lund J, Modrusan Z, et al. CRISPR off-target analysis in genetically engineered rats and mice. *Nat Methods*. 2018;15(7):512–4.
<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0011-5>
 47. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154(6):1380–9.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
 48. Tycko J, Myer VE, Hsu PD. Methods for optimizing CRISPR-Cas9 genome editing specificity. *Mol Cell*. 2016;63(3):355–70.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.004>
 49. Kocak DD, Josephs EA, Bhandarkar V, Adkar SS, Kwon JB, Gersbach CA. Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures. *Nat Biotechnol*. 2019;37(6):657–66.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0095-1>
 50. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016;351(6268):84–8.
<https://doi.org/10.1126/science.aad5227>
 51. Teng F, Cui T, Feng G, Guo L, Xu K, Gao Q, et al. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discov*. 2018;4:63.
<https://doi.org/10.1038/s41421-018-0069-3>
 52. Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR, Turk R, Jacobi AM, Collingwood MA, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2018;24(8):1216–24.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0137-0>
 53. Kim D, Kim J, Hur JK, Been KW, Yoon SH, Kim JS. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2016;34(8):863–8.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3609>
 54. Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, Guilinger JP, Bessen JL, Hu JH, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*. 2015;33(1):73–80.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3081>
 55. Shen C-C, Hsu M-N, Chang C-W, Lin M-W, Hwu J-R, Tu Y, Hu Y-C. Synthetic switch to minimize CRISPR off-target effects by self-restricting Cas9 transcription and translation. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(3):e13.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1165>
 56. Tu Z, Yang W, Yan S, Yin A, Gao J, Liu X, et al. Promoting Cas9 degradation reduces mosaic mutations in non-human primate embryos. *Sci Rep*. 2017;7:42081.
<https://doi.org/10.1038/srep42081>
 57. Hodgkins A, Farne A, Perera S, Grego T, Parry-Smith DJ, Skarnes WC, Iyer V. WGE: a CRISPR database for genome engineering. *Bioinformatics*. 2015;31(18):3078–80.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv308>
 58. Haeussler M, Schöning K, Eckert H, Eschstruth A, Mianné J, Renaudet J-B, et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol*. 2016;17(1):148.
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>
 59. Lessard S, Francioli L, Alfoldi J, Tardif JC, Ellinor PT, MacArthur DG, et al. Human genetic variation alters CRISPR-Cas9 on- and off-targeting specificity at therapeutically implicated loci. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(52):E11257–66.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1714640114>
 60. Miller NA, Farrow EG, Gibson M, Willig LK, Twist G, Yoo B, et al. A 26-hour system of highly sensitive whole genome sequencing for emergency management of genetic diseases. *Genome Med*. 2015;7:100.
<https://doi.org/10.1186/s13073-015-0221-8>
 61. Рачинская ОА, Меркулов ВА. Применение методов цитогенетического анализа при оценке качества

клеточных линий в составе биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):25–32.
Rachinskaya OA, Merkulov VA. Use of cytogenetic analysis methods for assessing the quality of cell

lines in biomedical cell products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):25–32. (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-25-32>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **О.А. Рачинская** — обработка и анализ данных литературы, написание текста рукописи; **Е.В. Мельникова** — критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; **В.А. Меркулов** — критическое обсуждение и окончательное утверждение текста рукописи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **O.A. Rachinskaya** reviewed and analysed literature data and drafted the manuscript. **E.V. Melnikova** participated in the critical discussion of the manuscript and edited it. **V.A. Merkulov** participated in the critical discussion of the manuscript and approved its final version for publication.

Об авторах / Authors

Рачинская Ольга Анатольевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8377-9205>
Rachinskaya@expmed.ru

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>
Melnikovaev@expmed.ru

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

Olga A. Rachinskaya, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8377-9205>
Rachinskaya@expmed.ru

Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>
Melnikovaev@expmed.ru

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

Поступила 14.04.2023

После доработки 16.06.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 14 April 2023

Revised 16 June 2023

Accepted 13 September 2023



Направления совершенствования и вопросы стандартизации лекарственных препаратов на основе ботулинического токсина

М.В. Савкина✉, М.А. Кривых, Л.В. Саяпина, Ю.И. Обухов, В.П. Бондарев

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

✉ Савкина Мария Владимировна; savkina@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Лекарственные препараты ботулинического токсина представляют собой хороший пример использования смертельно опасного токсина в составе уникальных терапевтических препаратов. Однако остается много нерешенных вопросов в отношении их биотехнологии, биологической активности, взаимозаменяемости и стандартизации.

Цель. Обзор актуальных направлений по совершенствованию лекарственных препаратов на основе ботулинического токсина.

Обсуждение. Рассмотрены лекарственные препараты ботулинического токсина типа А и связанные с ними вопросы. Зарегистрированные отечественные и зарубежные лекарственные препараты ботулинического токсина типа А из-за отсутствия международных непатентованных наименований, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения, Коллегией Евразийской экономической комиссии, а также в Российской Федерации, имеют только группировочные наименования. Кроме того, каждый производитель присваивает собственные наименования препаратам ботулотоксина. Для более четкой идентификации, правильного выбора и назначения требуются унификация названий и объединение данных препаратов в одну группу. Продemonстрирована особенность препаратов ботулинического токсина типа А — существенное различие по многим параметрам, которое не позволяет считать эти препараты сопоставимыми по качественным и количественным характеристикам, что порождает проблему взаимозаменяемости и биоэквивалентности. Необходимы разработка и закрепление в соответствующих нормативных документах единой номенклатуры лекарственных препаратов ботулотоксина. Показано, что производители используют собственные стандартные образцы, поэтому при определении токсичности и лечебного действия разных препаратов ботулотоксина одной и той же единице измерения активности может соответствовать различная белковая нагрузка. В связи с этим актуален вопрос разработки единого международного стандартного образца для определения активности ботулинического токсина типа А с целью стандартизации имеющихся и вновь создаваемых препаратов.

Заключение. Описаны препараты ботулотоксина, имеющие новый состав, в том числе находящиеся на поздних стадиях разработки. Обобщенные данные клинических исследований по эффективности, безопасности и рентабельности препаратов ботулинического токсина типа А могут служить ориентиром для терапевтических назначений.

Ключевые слова: ботулинический токсин; биологическая активность препаратов ботулотоксина; биоэквивалентность лекарственных средств; биосимиляры; международные стандарты

Для цитирования: Савкина М.В., Кривых М.А., Саяпина Л.В., Обухов Ю.И., Бондарев В.П. Направления совершенствования и вопросы стандартизации лекарственных препаратов на основе ботулинического токсина. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(3): 262–274. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-262-274>

© М.В. Савкина, М.А. Кривых, Л.В. Саяпина, Ю.И. Обухов, В.П. Бондарев, 2023

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. В.П. Бондарев — заместитель главного редактора журнала «Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2012 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Botulinum toxin preparations: areas for improvement and issues of standardisation

Maria V. Savkina✉, Maxim A. Krivykh, Lidia V. Sayapina, Yuri I. Obukhov, Vladimir P. Bondarev

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

✉ Maria V. Savkina; savkina@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. Botulinum toxin preparations are a good example of using a deadly toxin as a unique therapeutic agent. However, there are many unresolved issues related to biotechnology, biological activity, interchangeability, and standardisation of botulinum toxin preparations.

Aim. To review current opportunities for improving therapeutic botulinum toxin preparations.

Discussion. This review covers botulinum toxin type A preparations and unresolved issues related to them. In the absence of international non-proprietary names recommended by the World Health Organisation or by the Board of the Eurasian Economic Commission, domestic and imported botulinum toxin type A preparations approved in Russia have only similarity-based grouping names. In addition, manufacturers name botulinum toxin preparations at their discretion. Therefore, classifying these preparations under a common nomenclature is essential for clear identification, adequate selection, and correct prescription.

Several studies have shown significant variability across botulinum toxin type A preparations. Due to the identified differences in qualitative and quantitative characteristics, botulinum toxin type A preparations cannot be considered similar, which raises the issue of their interchangeability and bioequivalence. To resolve this issue, a unified classification and naming system for botulinum toxin preparations should be established and documented in regulatory standards. According to the literature, manufacturers of botulinum toxin preparations use in-house reference standards. Hence, the same activity unit resulting from toxicity and efficacy studies may express a different protein load for each botulinum toxin preparation. Keeping that in mind, the authors discuss the development of a single international potency standard for existing and pipeline botulinum toxin type A preparations.

Conclusions. The article describes novel pharmaceutical compositions containing botulinum toxin, including those in late development. Summarised data from clinical studies on the safety, efficacy, and cost-effectiveness of botulinum toxin type A preparations can guide prescribing decisions.

Key words: botulinum toxin; biological activity of botulinum toxin preparations; bioequivalence; biosimilars; international standards

For citation: Savkina M.V., Krivykh M.A., Sayapina L.V., Obukhov Yu.I., Bondarev V.P. Botulinum toxin preparations: areas for improvement and issues of standardisation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):262–274. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-262-274>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Conflict of interest. V.P. Bondarev has been a Deputy Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2012. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Ботулинический токсин (БТ) — нейротоксин белковой природы, получают из бактерий *Clostridium botulinum* и используют в терапевтических целях для блокирования сверхактивных нервных импульсов. Известны 7(8)¹ серотипов БТ: А, В, С, D, Е, F, G, а также отдельно выделяют крайне токсичный Н; четыре из них (типы А, В, Е и в редких случаях F) вызывают тяжелое токсическое поражение — ботулизм человека. Типы С, D и Е поражают млекопитающих, птиц и рыб [1].

Самые распространенные в медицине — лекарственные препараты (ЛП) на основе БТ типа А, имеющие группировочные наименования: ботулинический токсин типа А (БТА) и ботулинический токсин типа А — гемагглютинин комплекс. В настоящее время в Российской Федерации зарегистрировано девять ЛП БТА, выпускаемых в различных дозировках от 50 до 500 ЕД, из них два торговых наименования отечественного производства и семь — зарубежного. Большинство из зарегистрированных ЛП БТА выпускаются в лекарственной форме «Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций», и только один препарат — Миотокс® — в виде раствора для внутримышечного введения.

Цель работы — обзор актуальных направлений по совершенствованию лекарственных препаратов на основе ботулинического токсина.

Номенклатура ботулинического токсина типа А

Зарегистрированные во всем мире ЛП БТА не имеют международных непатентованных наименований (МНН, INN — International Nonproprietary Names), рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ).

При отсутствии МНН применяется группировочное наименование, полностью соответствующее названию фармацевтической субстанции. В регуляторной практике Российской Федерации используются два группировочных наименования для препаратов БТ: ботулинический токсин типа А и ботулинический токсин типа А — гемагглютинин комплекс.

В Рекомендациях Коллегии Евразийской экономической комиссии от № 13 «О Правилах составления группировочных наименований ле-

карственных препаратов»² отсутствует информация для препаратов БТ.

Для гармонизации и унификации терминологии, обеспечения точности ее понимания, а также для минимизации возможных медицинских ошибок (нежелательных реакций или осложнений) в 2009 г. в США Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) утвердило³ непатентованные наименования для каждого зарегистрированного препарата БТА, способствующие их однозначной идентификации. Удобство такой номенклатуры оценило мировое сообщество специалистов, что привело к широкому, ставшему уже привычным применению данных терминов в большинстве стран (табл. 1).

Вместе с тем выбор официального наименования биотехнологических препаратов, к которым относятся БТА, часто определяется FDA в соответствии с системой принятых названий в США — USAN (United States Adopted Names)⁴.

Биотехнологические препараты по своему производству — самые сложные из всех ЛП, так как биотехнологический процесс их производства связан с различными способами обработки полученного материала. Эти препараты настолько уникальны, что в идеале сведения о них (в зависимости от назначения) должны содержаться в самом наименовании. Однако из-за большого объема такой информации сложно подобрать краткие, понятные, всеобъемлющие и удобные наименования.

При этом раздел биотехнологических препаратов в системах номенклатуры МНН и USAN представляет собой «лоскутное одеяло», в котором практически нет последовательности и предсказуемости, так как каждый производитель препаратов, например, имеет свои собственные системы наименований. Недавно принято решение о включении в МНН и USAN цифр и греческих букв в качестве модификаторов названия, чтобы наименования отражали уникальность биотехнологических препаратов. По мере увеличения числа и разнообразия биотехнологических препаратов (включая многочисленные биоаналоги) системы МНН и USAN, одобренные для большинства ЛП, потеряют свою актуаль-

¹ В России принято выделять 8, а не 7 серотипов. Ботулизм: информационный бюллетень. ВОЗ; 2018. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/botulism>

² Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 23.04.2019 № 13 «О Правилах составления группировочных наименований лекарственных препаратов». <https://docs.cntd.ru/document/554398535>

³ OnabotulinumtoxinA (marketed as Botox/Botox Cosmetic), AbobotulinumtoxinA (marketed as Dysport) and RimabotulinumtoxinB (marketed as Myobloc) Information. FDA; 2014. <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/onabotulinumtoxinA-marketed-botox-botox-cosmetic-abobotulinumtoxinA-marketed-dysport-and-rimabotulinumtoxinB-marketed-myobloc>

⁴ USP Dictionary of U.S. Adopted Names and International Drug Names. <http://www.nioch.nsc.ru/sibstn/databases/usan.htm>

Таблица 1. Непатентованные наименования (версия FDA) прежних группировочных наименований ботулинических токсинов (с сайта FDA^a с изменениями)

Table 1. Non-proprietary names (FDA version) replacing previous established botulinum toxin names (adapted from the FDA website^a)

Предыдущее группировочное наименование <i>Previous name</i>	Действующее непатентованное наименование (FDA) <i>Current name (FDA)</i>	Торговое наименование <i>Trade name</i>
Ботулинический токсин типа А <i>Botulinum toxin type A</i>	Онаботулиnumтоксин А <i>Onabotulinumtoxin A^b</i>	Ботокс® <i>Botox®</i>
	Абоботулиnumтоксин А <i>Abobotulinumtoxin A</i>	Диспорт® <i>Dysport®</i>
	Инкоботулотоксин А <i>Incobotulinumtoxin A</i>	Ксеомин <i>Xeomin®</i>
	Летиботулотоксин А <i>Letibotulinumtoxin A</i>	Ботулакс <i>Botulax®</i>
	Пработулотоксин А <i>Prabotulinumtoxin A</i>	Жеву <i>Jeveau®</i>
Ботулинический токсин типа В <i>Botulinum toxin type B</i>	Римаботулиnumтоксин В <i>Rimabotulinumtoxin B</i>	Миоблок <i>Myobloc®</i>

Примечание. FDA (Food and Drug Administration) – Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (США).

Note. FDA, Food and Drug Administration (USA).

^a <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/DrugSafetyInformationforHealthcareProfessionals/ucm174949.html>

^b <https://precision.fda.gov/unii/search/srs/unii/E211KPY694>

ность для некоторых наименований, утвержденных FDA [2].

Уникальность препаратов ботулинического токсина типа А

Препараты БТА состоят из основного нейротоксина и комплексообразующих белков, содержание которых отличается в разных препаратах, а также из вспомогательных веществ: лактозы, сахарозы, желатина, декстрана или сывороточного альбумина (для стабилизации), буферных систем [3].

За последние годы в мировой практике особое внимание уделяется совершенствованию препаратов БТА с применением инновационных технологий. В дополнение к препаратам природного происхождения создаются синтетические и генетически модифицированные препараты, которые проходят в настоящее время разные этапы исследований. Насчитывается более шести различных зарегистрированных препаратов БТА с различными составами для медицинского применения. Значительное число препаратов с разнообразным сочетанием вспомогательных веществ, а также с разной дозировкой и в различных лекарственных формах находится в стадии фармацевтической разработки [4].

В мировом научном сообществе остается нерешенным вопрос о взаимозаменяемости и биоэквивалентности различных препаратов БТА. Учитывая, что эти ЛП имеют несомненные различия в физико-химических свойствах, дозах и способах применения, Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) не считает возможным квалифицировать их как биоаналоги. Многие исследователи также придерживаются мнения о том, что ЛП БТА не идентичны и не взаимозаменяемы [5].

На 56-й Консультации по международным непатентованным наименованиям фармацевтических субстанций (ВОЗ) Альянс «За безопасные биологические препараты» (Alliance for Safe Biologic Medicines, ASBM) высказался за предложение давать уникальные наименования, которые помогут «безопасно применять биоаналоги у пациентов», и озвучил свою позицию, что политика в отношении МНН биологических препаратов (отличающихся от традиционных химических) должна отражать их использование и регулироваться специально разработанными законами⁵.

Особенность препаратов БТА заключается в различии производственных процессов для каждого из них, а также ряда параметров:

⁵ 56th Consultation on International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances. WHO. Geneva; 2013. [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/international-nonproprietary-names-\(inn\)/56th-executive-summary.pdf?sfvrsn=76d934d8&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/international-nonproprietary-names-(inn)/56th-executive-summary.pdf?sfvrsn=76d934d8&download=true)

единиц измерения; химических свойств; биологической активности; состава, размера токсинного комплекса (молекулярный вес); условий хранения, риска возникновения осложнений и медицинского применения. Между препаратами БТ есть различия, такие как состав молекулы токсина, степень очистки, производственные процессы, а также тип или число/количество вспомогательных веществ, содержащихся в каждом конечном составе препарата [6].

Важно отметить, что эффективность действия БТ зависит от его концентрации и объема, места и глубины введения, размера целевой мышцы [7]. В связи с этим следует учитывать все возможные влияющие на эффективность факторы: свойства всех имеющихся токсинов (их белковая нагрузка), выбор мышц (схема мышечной активности, мышечная архитектура и фасциальные плоскости), инъекционная техника (разведение, объем и доза) [8].

Принимая во внимание сложность получения и специфику применения данной группы препаратов, для исключения рисков и достижения оптимальных результатов лечения практикующим врачам необходимо знать об особенностях клинических характеристик пациентов, резистентности к БТ, эффективности лечения и проблемах безопасности (нежелательных реакциях и осложнениях) [9].

Выявлен ряд проблем, которые в основном связаны с подходами к определению взаимозаменяемости ЛП БТ. В соответствии с Федеральным законом Российской Федерации № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»⁶ и Постановлением № 1360⁷, в которых определены критерии взаимозаменяемости биологических ЛП, в том числе и на основании идентичности МНН или группировочных наименований, необходимы разработка и закрепление в соответствующих нормативных документах единой номенклатуры ЛП БТ.

При этом, несмотря на эквивалентность лекарственных форм и идентичность показаний и противопоказаний, ЛП БТ не могут рассматриваться взаимозаменяемыми и эквивалентными в рамках одного и того же показания. Данное высказывание подтверждается различием в физико-химических свойствах, дозах, биологической активности, производственных процессах

и составе, что не позволяет считать их сопоставимыми по качественным и количественным характеристикам [5, 6].

Анализ научных источников выявил, что для определения специфической активности БТА производители используют стандартные образцы предприятия в тестах на мышах. Вместе с тем при определении специфической активности препарата, измеряемой в единицах действия (ЕД), количественное содержание белка, соответствующее 1 ЕД, не указывается. В связи с этим при определении токсичности ЛП и его лечебного действия одной и той же единице измерения активности разных препаратов БТА может соответствовать различная белковая нагрузка.

Таким образом, остро стоит вопрос, необходимый для стандартизации имеющихся и вновь созданных препаратов, о разработке единого международного стандартного образца по определению активности БТА.

Назначение ботулинических токсинов

Более двух веков назад немецкий врач J.A.Ch. Kerner (Ю.А.К. Кернер) предположил, что токсин, который был выделен из испорченных сосисок (ботулинический, от лат. *botulus* – сосиски) и вызвал ряд смертельных вспышек в королевстве Вюртемберг в конце XVIII в. и начале XIX в., может принести клиническую пользу [10].

Однако первое терапевтическое применение ботулотоксина, подтвержденное документально, произошло только в 1977 г., когда американский офтальмолог A.B. Scott (А.Б. Скотт) ввел очищенный БТ в наружные мышцы глазного яблока для лечения косоглазия [11].

Первый ботулотоксин, одобренный для терапевтического применения в медицине, зарегистрирован в 1989 г. в США⁸. С тех пор множество исследований, направленных на всестороннее изучение БТ, привело к появлению новых препаратов с более широким спектром показаний.

Учитывая вышеизложенное, препараты БТ не следует рассматривать как взаимозаменяемые, поэтому для специалистов, назначающих препараты БТА, существенно различающиеся по составу и дозировкам, обязательно знание особенностей фармакологических свойств этих ЛП [12].

⁶ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», ст. 27.1. <https://docs.cntd.ru/document/902209774>

⁷ Постановление Правительства Российской Федерации от 05.09.2020 № 1360 «О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения». <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202009090007>

⁸ Medication Guide; 2009. Revised: 08/2011. Allergan, Inc.; 2011. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/103000s5232lbl.pdf

Таблица 2. Лекарственные препараты ботулинического токсина типа А, зарегистрированные в Российской Федерации^a
Table 2. Botulinum toxin type A preparations registered in the Russian Federation^a

Торговое наименование <i>Trade name</i>	Лекарственная форма <i>Dosage form</i>	Дозировка, ЕД <i>Dose, U</i>	Вспомогательные вещества <i>Excipients</i>	Номер регистрационного удостоверения, дата регистрации <i>Marketing authorisation number, approval date</i>
Ботулинический токсин типа А <i>Botulinum toxin type A</i>				
Ксеомин <i>Xeomin®</i>	Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций <i>Lyophilisate for solution for injection</i>	50	Сахароза 4,7 мг, альбумин человека 1,0 мг <i>Sucrose 4.7 mg, human albumin 1.0 mg</i>	ЛСП-004746/08, 23.06.2008
		100		
Лантокс <i>Lantox</i>	Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций <i>Lyophilisate for solution for injection</i>	50	Желатин 5 мг, декстран 25 мг, сахароза 25 мг <i>Gelatin 5 mg, dextran 25 mg, sucrose 25 mg</i>	ЛСП-001587/08, 14.03.2008
		100		
Ботулинический токсин типа А — гемагглютинин комплекс <i>Botulinum toxin type A–haemagglutinin complex</i>				
Ботокс® <i>Botox®</i>	Лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения <i>Lyophilisate for solution for intramuscular injection</i>	100	Альбумин человека 0,5 мг, натрия хлорид 0,9 мг <i>Human albumin 0.5 mg, sodium chloride 0.9 mg</i>	П N011936/01, 18.01.2008
		200	Альбумин человека 1,0 мг, натрия хлорид 1,8 мг <i>Human albumin 1.0 mg, sodium chloride 1.8 mg</i>	ЛП-002949, 08.04.2015
Релатокс® <i>Relatox</i>	Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций <i>Lyophilisate for solution for injection</i>	50	Желатин 6 мг, мальтоза 12 мг <i>Gelatin 6 mg, maltose 12 mg</i>	ЛП-001593, 19.03.2012
		100		
Ботулакс <i>Botulax®</i>	Лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения <i>Lyophilisate for solution for intramuscular injection</i>	50	Альбумин человека 0,25 мг, натрия хлорид 0,45 мг <i>Human albumin 0.25 mg, sodium chloride 0.45 mg</i>	ЛП-003978, 23.11.2016
		100	Альбумин человека 0,5 мг, натрия хлорид 0,9 мг <i>Human albumin 0.5 mg, sodium chloride 0.9 mg</i>	
Миотокс® <i>Myotox®</i>	Раствор для внутримышечного введения <i>Solution for intramuscular injection</i>	100	Альбумин человека 0,5 мг, натрия хлорид 9,0 мг <i>Human albumin 0.5 mg, sodium chloride 9.0 mg</i>	ЛП-005821, 26.09.2019
Диспорт® <i>Dysport®</i>	Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций <i>Lyophilisate for solution for injection</i>	500	Альбумин человека 125 мкг, лактозы моногидрат 2,5 мг <i>Human albumin 125 µg, lactose monohydrate 2.5 mg</i>	П N011520/01, 15.08.2011 ЛП-001486, 08.02.2012 ЛП-008155, 12.05.2022
		300		
		125		
Кунокс® <i>Cunox</i>	Лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения <i>Lyophilisate for solution for intramuscular injection</i>	50	Альбумин человека 0,25 мг, натрия хлорид 0,45 мг <i>Human albumin 0.25 mg, sodium chloride 0.45 mg</i>	ЛП-007860, 04.02.2022
		100	Альбумин человека 0,5 мг, натрия хлорид 0,9 мг <i>Human albumin 0.5 mg, sodium chloride 0.9 mg</i>	
		200	Альбумин человека 1,0 мг, натрия хлорид 1,8 мг <i>Human albumin 1.0 mg, sodium chloride 1.8 mg</i>	
Новакутан-БТА <i>Novacutan-BTA</i>	Лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения <i>Lyophilisate for solution for intramuscular injection</i>	100	Альбумин человека 0,5 мг, натрия хлорид 0,9 мг <i>Human albumin 0.5 mg, sodium chloride 0.9 mg</i>	ЛП-008637, 27.10.2022

^a <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>

Таблица 3. Терапевтическое применение лекарственных препаратов ботулинического токсина типа А, зарегистрированных в Российской Федерации
Table 3. Therapeutic uses of botulinum toxin type A preparations approved in the Russian Federation

Торговое наименование (дозировка) Trade name (dose)	Показания к применению Indications									
	Блефароспазм Blepharospasm	Цервикальная дистония (спастическая кривошея) Cervical dystonia (spasmodic torticollis)	Временная коррекция внешнего вида мимических морщин ^a Temporary treatment of facial wrinkles ^a	Гемифациальный спазм Hemifacial spasm	Фокальная спастичность Focal spasticity	Хроническая сialорея ^b Chronic sialorrhoea ^b	Страбизм Strabismus	Дисфункция мочевого пузыря Bladder dysfunction	Мигрень, отвечающая критериям хронической мигрени (облегчение симптомов) Relief of migraine symptoms that meet the criteria for chronic migraine	Гипергидроз подмышечной области Axillary hyperhidrosis
Миотокс® Myotox	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Релатокс® Relatox	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Ботулакс® Botulax®	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ботокс® (200 ЕД) Botox® (200 U)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Ботокс® (100 ЕД) Botox® (100 U)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Диспорт® (300 ЕД) Dysport® (300 U)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Диспорт® (500 ЕД) Dysport® (500 U)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Диспорт® (125 ЕД) Dysport® (125 U)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Кунокс® Cunox	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Лантокс® Lantox	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Ксеомин® Xeomin®	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Новакутан-БТА® Novacutan-BTA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. «+» — есть показания к применению; «-» — нет показаний к применению.

^a У взрослых в верхней трети лица межбровные, лобные и перiorбитальные морщины.

^b У взрослых и детей от 2 до 18 лет.

Note. +, indicated for use; -, not indicated for use.

^a In the upper third of the face (glabellar, forehead, and periorbital wrinkles) in adults.

^b In adults and children aged 2 to 18 years.

В *таблицах 2, 3* представлены доступные в Российской Федерации препараты БТА с утвержденными показаниями к применению.

Большинство готовых препаратов БТА представляют собой лиофилизаты, которые необходимо восстанавливать 0,9% раствором натрия хлорида, за исключением Миотокса[®], а также Myobloc[®] (не зарегистрирован в РФ), доступных в виде раствора для инъекций [4]. Количество ЕД токсина также варьирует в зависимости от состава препарата. Следовательно, и число доз введения – переменная величина, которая различна для препаратов разных производителей. Препарат Ботокс[®] (Ирландия) выпускается во флаконах в дозировке по 50, 100, 200 ЕД, Диспорт[®] (Великобритания) – по 125, 300, 500 ЕД. Несмотря на то что точное соотношение доз неизвестно, в некоторых исследованиях сообщалось об эквивалентности доз Ботокса[®] и Диспорта[®] как 4:1 [13–15]. Отличия состава препаратов в разных дозировках имеются и у других производителей (*табл. 2*).

Заслуживает внимания тот факт, что размер комплекса токсина варьирует в зависимости от состава комплекса. Ранее считалось, что молекулярная масса и размер комплекса токсина определяют его диффузионную способность в тканях. Так, у Ботокса[®] зафиксирована наибольшая масса комплекса – 900 кДа, тогда как у Диспорта[®], к примеру, около 500 кДа. С учетом того, что более крупные белки диффундируют в идентичной водной среде медленнее, чем более мелкие, сделано предположение, что ботулинические комплексы большего размера или массы с меньшей вероятностью будут диффундировать за пределы ткани-мишени, чем белки меньшего размера [15]. Однако анализ экспериментальных исследований показал, что коэффициент диффузии не связан с молекулярным размером комплекса токсина [15].

Большой практический опыт применения ЛП БТ свидетельствует о том, что введение БТ редко бывает неэффективным (зарегистрировано менее 1% таких случаев) [16]. Обобщая различные мнения, можно заключить, что одной из причин отсутствия эффективности может быть выработка нейтрализующих антител к токсину [4].

Не вызывает сомнения, что составы препаратов БТА не только не идентичны, но и не эквивалентны. Доказательством тому служат многочисленные исследования, проводимые за рубежом. Прямой сравнительный анализ состава препа-

ратов Ботокс[®], Dysport[®], Xeomin[®] и Myobloc[®], одобренных в США, показал, что некоторые из них обладают более продолжительным действием (например, Диспорт[®] по сравнению с Ботоксом[®]) и большими побочными эффектами за пределами целевого участка терапии, возможно, из-за более высокого содержания нейротоксина [4]. В исследованиях [17] выявлены преимущества Ксеомина по сравнению с другими ЛП: меньшая общая белковая нагрузка (содержит незначительное количество клостридиальных белков) – 0,44 нг/100 ЕД, а также возможность хранения при комнатной температуре и др.

Доля биологически неактивного нейротоксина (токсоида) – важный показатель различия препаратов БТ. При производстве и хранении часть нейротоксина может подвергаться дезактивации, переходя в токсид. Его содержание также характеризует качество БТ, так как вносит свой вклад в белковую нагрузку и иммунологическую реактивность препаратов, не обладая при этом фармакологической активностью. Любой белок, включая вспомогательные белки, не являющиеся токсинами, может инициировать иммунные реакции, особенно при многократном введении. Опубликованы сведения о неудачных курсах лечения и выявления нейтрализующих антител, индуцированных БТА. По сравнению с Ксеомином, с его очищенной от вредных примесей формулой, в препаратах Ботокс[®] и Диспорт[®] выше содержание общего нейротоксинного комплекса, большая часть которого подвергает пациентов риску воздействия потенциально иммуногенных нетоксиновых белков или неактивных нейротоксинов, что увеличивает риск неэффективного лечения [18].

В Китае и Южной Корее широко используются в медицинской практике одобренные регуляторными органами два препарата Prosigne[®] (в Российской Федерации зарегистрирован как Лантокс[®]) и Meditoxin[®]. Основные вспомогательные вещества препарата Prosigne[®]: желатин, декстран и сахароза. Prosigne[®] обладает минимальной белковой нагрузкой 4–5 нг/100 ЕД. При проведении сравнительных испытаний препаратов Meditoxin[®] и Ксеомина установлено, что у первого идентичный с Ксеомином состав, а именно: уменьшенное содержание клостридиального белка. В настоящее время проводятся клинические испытания фазы III для Meditoxin[®] в США [4].

⁹ Миотокс. Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=&If=&TradeNmR=%d0%9c%d0%b8%d0%be%d1%82%d0%be%d0%ba%d1%81&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0®type=1%2c6&pageSize=10&order=Registered&orderType=desc&pageNum=1>

Таблица 4. Новые лекарственные препараты ботулинического токсина, одобренные FDA или находящиеся на поздних стадиях разработки**Table 4.** New botulinum toxin preparations that are either approved by the FDA or in late stages of development

Запатентованное наименование <i>Proprietary name</i>	Торговое наименование <i>Trade name</i>	Статус в FDA <i>FDA status</i>	Достоинства <i>Advantages</i>	Недостатки <i>Disadvantages</i>
Пработулотоксин А <i>Prabotulotoxin A</i>	Набота <i>Jeuneau®, Nabota®</i>	Зарегистрирован (2019); для глабеллярных линий <i>Approved for glabella lines (2019)</i>	Сравним с Ботоксом®, низкая стоимость <i>Comparable with Botox®, low cost</i>	—
Даксипотулотоксин А <i>Daxibotulinumtoxin A</i>	Даксифай <i>Daxxify®</i>	Зарегистрирован (2020); для глабеллярных линий <i>Approved for glabella lines (2020)</i>	Не содержит сывороточный альбумин человека, продолжительное действие (24 нед.) <i>No human serum albumin, long-term effect (24 weeks)</i>	—
Летиботулотоксин А <i>Letibotulinum toxin A</i>	Ботулакс <i>Botulax®</i>	Нет <i>No</i>	—	Более низкая эффективность, чем у Ксеомина <i>Less effective than Xeomin®</i>
Ботулотоксин Е <i>Botulinumtoxin E</i>	ЕВ-001 <i>EB-001</i>	Нет <i>No</i>	Начало действия через 24 ч <i>Onset of action in 24 h</i>	Непродолжительное действие (2–4 нед.) <i>Short-term effect (2–4 weeks)</i>
Токсины в форме раствора для инъекций <i>Toxins in the form of a solution for injection</i>				
Нивоботулотоксин А <i>Nivobotulinumtoxin A</i>	Иннотокс <i>Innotox®</i>	Нет <i>No</i>	Низкий риск ошибки при подготовке к применению <i>Low risk of preparation errors</i>	Высокая стоимость <i>High cost</i>
Ботулотоксин тип А <i>Botulinum toxin type A</i>	КьюЭМ1114 <i>QM1114</i>			
Абоботулотоксин А <i>Abobotulinum toxin A</i>	ЭйЭсАй <i>ASI</i>			

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. FDA (Food and Drug Administration) – Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (США).

Note. FDA, Food and Drug Administration (USA).

Новые препараты ботулинических токсинов (зарегистрированные и разрабатываемые)

В таблице 4 рассмотрен ряд новых препаратов БТ.

Экспериментально установлено, что препарат ботулотоксина типа Е быстро начинает действовать, но в то же время имеет короткий период действия (2–4 нед.) [19]. Это уникальное свойство препарата можно использовать для обезболивания при таких состояниях, например, как остеоартрит [4].

В Южной Корее в 2013 г. зарегистрирован препарат Innotox® на основе БТА без ком-

плексообразующих белков, в форме раствора для инъекций.

В настоящее время в рамках регистрации в FDA завершено мультицентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование Нивоботулотоксина А для коррекции складок межбровной области (NCT03721016¹⁰) [20].

Раствор для инъекций Абоботулотоксина А (ASI) проходит клинические исследования (фаза III) [21] по показанию «межбровные морщины». В сравнительном исследовании показана более высокая эффективность ASI по сравнению с Диспортом® в одинаковой дозе 50 ЕД [22]. Сопоставимая эффективность и безопас-

¹⁰ <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT03721016>

ность ASI по сравнению с Аботулотоксином А в форме лиофилизата подтверждены в клиническом исследовании с участием пациентов с кривошеей [23].

Успешные результаты показали клинические исследования раствора для инъекций БТА при коррекции морщин межбровной области и «гусиных лапок» [24].

В статье Н.Е. Мантуровой с соавт. предполагается, что разработка препаратов на основе БТА подтипа 2 (БТА2) – одно из возможных перспективных направлений. Так, в пилотных исследованиях, проведенных в Японии, показаны сопоставимая миорелаксирующая активность и схожий профиль безопасности БТА2 и БТА1 (Онаботулинумтоксин А) и при этом более длительное действие БТА2 (NCT01910363)¹⁴[20]. Предположительно, препарат на основе БТА2 может быть активен в случаях развития иммунорезистентности к традиционным препаратам на основе БТА1 [20].

Проведенные клинические исследования с использованием препарата БТ типа В продемонстрировали, что он может иметь определенные преимущества перед БТА для лечения таких заболеваний, как сialорея, гипергидроз и некоторые заболевания, связанные с гладкой мускулатурой [25–27].

Некоторые ученые рассматривают как альтернативу БТА ботулотоксин серотипа С, вызывающий ботулизм только у животных; экспериментальные исследования и опыт единичных клинических наблюдений показывают его миорелаксирующий эффект, аналогичный действию БТА [20]. У ботулотоксина С имеются очевидные преимущества: меньшая, чем у БТА, способность к диффузии из места инъекции, что очень важно для безопасности применения; возможность проводить лечение пациентов с кривошеей и иммунорезистентностью к БТА [20]. Согласно данным Н.Е. Мантуровой с соавт., актуальным направлением научных исследований может быть разработка и создание мутантной формы ботуло-

токсина С со сниженной токсичностью и длительным (но обратимым) миорелаксирующим действием [20]. В аналогичном направлении А. Kutschenko с соавт. ведут работы по изучению БТ типа D [25].

Правовые основы разработки и применения ботулинических токсинов

В Российской Федерации препараты на основе ботулотоксинов рассматриваются как биологические ЛП, их исследование регулируется в соответствии с действующими правовыми актами, такими как Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 89¹². При разработке препаратов также рекомендуется следовать требованиям, представленным в общих фармакопейных статьях (ОФС) Государственной фармакопеи Российской Федерации, например в ОФС «Биологические лекарственные препараты»¹³. В настоящее время сотрудниками Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России разработан проект ОФС «Ботулинические токсины» с учетом международного опыта в оценке качества ЛП БТ. В Европейскую фармакопею включены монографии, посвященные БТА для инъекций¹⁴ (07/2022:2113) и БТ типа В для инъекций¹⁵ (01/2019:2581), – эти требования применяются при создании спецификации ЛП на основе ботулотоксинов типов А и В. В США деятельность, касающаяся ЛП БТ, лицензируется в соответствии с разделом 351 Закона о службе общественного здравоохранения, касающимся биологических препаратов (42 U.S.C. 262)¹⁶. Весь процесс производства ЛП от посевного материала, производства токсинов (ферментация, очистка, производство готовой лекарственной формы, упаковка и маркировка) до конечной упаковки продукта проходит одобрение FDA.

Препараты БТ представляют собой лиофилизаты или растворы, описание которых должно соответствовать требованиям, предъявляемым к данным лекарственным формам. Форме

¹⁴ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01910363?term=NCT01910363&cntry=JP&draw=2&rank=1>

¹² Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (с изменениями на 15.07.2022). <https://docs.cntd.ru/document/456026116>

¹³ ОФС.1.7.1.0010.18. Биологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. Т. 1. М.; 2018. <https://docs.cntd.ru/document/554199288>

¹⁴ 07/2022:2113. Botulinum toxin type A for injection. European Pharmacopoeia; 2020. https://www.edqm.eu/en/-/pharmeuropa-32.3-just-released?p_l_back_url=%2Fen%2Fsearch%3Fq%3D2113

¹⁵ 07/2019:2581. Botulinum toxin type B for injection. European Pharmacopoeia; 2019. https://file.wuxuwang.com/yaopinbz/EP9/EP9.6_01_91.pdf

¹⁶ 42 U.S.C. § 262. Section 351. Regulation of biological products. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/USCODE-2021-title42/pdf/USCODE-2021-title42-chap6A-subchapII-partF-subpart1-sec262.pdf>

выпуска препарата также соответствует свой перечень показателей качества и методы их определения (Государственная фармакопея Российской Федерации, ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения»¹⁷ и ОФС «Биологические лекарственные препараты»¹⁴).

В настоящее время не существует Международного стандартного образца для определения активности препаратов БТА, аттестованного ВОЗ, поэтому каждый производитель применяет собственные стандартизированные методы испытания для определения единиц активности. По этой причине единицы биологической активности становятся специфическими для каждого препарата БТА, а дозы не могут быть взаимозаменяемыми [5].

Заключение

Описаны препараты ботулотоксина, имеющие новый состав, в том числе находящиеся на поздних стадиях разработки. Обобщенные данные клинических исследований по эффективности,

безопасности и рентабельности препаратов ботулинического токсина типа А могут служить ориентиром для терапевтических назначений.

Анализ данных из научной литературы показал, что разработка новых ботулинических токсинов открывает многообещающие возможности для создания препаратов с заданными характеристиками, не только для терапевтического применения в косметологии, но и в терапии разнообразных болевых синдромов в неврологии, например.

Наряду с положительным эффектом от применения препаратов ботулотоксина выявлен ряд проблемных вопросов: отсутствие международных непатентованных наименований, стандартизация имеющихся и вновь создаваемых препаратов, определение взаимозаменяемости и биоэквивалентности различных препаратов ботулотоксина типа А, разработка единого международного стандартного образца для определения активности ботулинического токсина типа А.

Литература/References

1. Camargo CHF, Teive HAG. Use of botulinum toxin for movement disorders. *Drugs Context*. 2019;8:212586. <https://doi.org/10.7573/dic.212586>
2. Rader RA. Nomenclature of new biosimilars will be highly controversial. *Bioprocess Int*. 2011;9:26–33.
3. Boone B. Botulinum toxin in aesthetic medicine. In: Katsambas AD, Lotti TM, Dessinioti C, d'Erme AM, eds. *European Handbook of Dermatological Treatments*. Berlin Heidelberg: Springer; 2015. P. 1089–06. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-45139-7>
4. Choudhury S, Baker MR, Chatterjee S, Kumar H. Botulinum toxin: an update on pharmacology and newer products in development. *Toxins (Basel)*. 2021;13(1):58. <https://doi.org/10.3390/toxins13010058>
5. Артеменко АР, Куренков АЛ, Беломестова КВ. К вопросу об отсутствии взаимозаменяемости лекарственных препаратов ботулинического токсина типа А. *Медицинский совет*. 2015;(5):112–23. Artemenko AR, Kurenkov AL, Belomestova KV. On the absence of interchangeability of botulinum toxin type A drugs. *Medical Council*. 2015;(5):112–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2015-5-112-123>
6. Тимербаева СЛ. Неэффективность ботулинотерапии: старая проблема, новые решения. *Нервные болезни*. 2015;(4):28–32. EDN: [VMDAJT](https://vmdaj.ru).
7. Timerbaeva SL. Ineffectiveness of botulinum therapy: an old problem, new solutions. *Nervnye bolezni*. 2015;(4):28–32 (In Russ.). EDN: [VMDAJT](https://vmdaj.ru).
8. Rosales RL, Bigalke H, Dressler D. Pharmacology of botulinum toxin: differences between type A preparations. *Eur J Neurol*. 2006;13(Suppl. 1):2–10. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01438.x>
9. Samizadeh S, de Boulle K. Botulinum neurotoxin formulations: overcoming the confusion. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2018;11:273–87. <https://doi.org/10.2147/ccid.s156851>
10. Erbguth FJ. From poison to remedy: the chequered history of botulinum toxin. *J Neural Transm (Vienna)*. 2008;115(4):559–65. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0728-2>
11. Scott AB, Magoon EH, McNeer KW, Stager DR. Botulinum treatment of strabismus in children. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1989;87:174–80.
12. Brin MF, James C, Maltman J. Botulinum toxin type A products are not interchangeable: a review of the evidence. *Biologics*. 2014;8:227–41. <https://doi.org/10.2147/btt.s65603>
13. Jabbari B. Basics of structure and mechanisms of function of botulinum toxin — how does it work? In: Jabbari B. *Botulinum toxin treatment: What every-*

¹⁷ Общая фармакопейная статья ОФС.1.4.1.0007.15. Лекарственные формы для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. М.; 2018. <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-4-1-0007-15-lekarstvennye-formy-dlya-parenteralnogo-primeneniya/>

- one should know. Berlin/Heidelberg: Springer; 2018. P. 11–7.
https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-319-99945-6_2.pdf?pdf=inline%20link
14. Scaglione F. Conversion ratio between Botox®, Dysport®, and Xeomin® in clinical practice. *Toxins (Basel)*. 2016;8(3):65.
<https://doi.org/10.3390/toxins8030065>
 15. Brodsky MA, Swope DM, Grimes D. Diffusion of botulinum toxins. *Tremor Other Hyperkinetic Mov (N Y)*. 2012;2:p.tre-02-85-417-1.
<https://doi.org/10.5334/tohm.120>
 16. Brin MF, Comella CL, Jankovic J, Lai F, Naumann M; CD-017 BoNTA StudyGroup. Long-term treatment with botulinum toxin type A in cervical dystonia has low immunogenicity by mouse protection assay. *Mov Disord*. 2008;23(10):1353–60.
<https://doi.org/10.1002/mds.22157>
 17. Dressler D. Five-year experience with incobotulinumtoxinA (Xeomin®): the first botulinum toxin drug free of complexing proteins. *Eur J Neurol*. 2012;19(3):385–9.
<https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03559.x>
 18. Park JY, Sunga O, Wanitphakdeedecha R, Frevet J. Neurotoxin impurities: a review of threats to efficacy. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2020;8(1):e2627.
<https://doi.org/10.1097%2FGOX.00000000000002627>
 19. Hanna E., Pon K. Updates on botulinum neurotoxins in dermatology. *Am J Clin Dermatol*. 2020;21(2):157–62.
<https://doi.org/10.1007/s40257-019-00482-2>
 20. Мантурова НЕ, Чайковская ЕА, Тимербаева СЛ. Препараты ботулинического токсина: что мы имеем и что видим на горизонте? *Пластическая хирургия и эстетическая медицина*. 2020;(2):70–80. Manturova NE, Chaikovskaya EA, Timerbayeva SL. Botulinum toxin therapy: what do we have and what do we see on the horizon? *Plastic Surgery and Aesthetic Medicine*. 2020;(2):70–80 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17116/plast.hirurgia202002170>
 21. Ascher B, Rzany B, Kestemont P, Hilton S, Heckmann M, Bodokh I, et al. Liquid formulation of abobotulinumtoxinA: a 6-month, phase 3, double-blind, randomized, placebo-controlled study of a single treatment, ready-to-use toxin for moderate-to-severe glabellar lines. *Aesthet Surg J*. 2020;40(1):93–104.
<https://doi.org/10.1093/asj/sjz003>
 22. Ascher B, Kestemont P, Boineau D, Bodokh I, Stein A, Heckmann M, et al. Liquid formulation of abobotulinumtoxinA exhibits a favorable efficacy and safety profile in moderate to severe glabellar lines: a randomized, double-blind, placebo- and active comparator-controlled trial. *Aesthet Surg J*. 2018;38(2):183–91.
<https://doi.org/10.1093/asj/sjw272>
 23. Poewe W, Burbaud P, Castelnovo G, Jost WH, Ceballos-Baumann AO, Banach M, et al. Efficacy and safety of abobotulinumtoxinA liquid formulation in cervical dystonia: a randomized-controlled trial. *Mov Disord*. 2016;31(11):1649–57.
<https://doi.org/10.1002/mds.26760>
 24. Monheit GD, Nestor MS, Cohen J, Mitchel PG, Gold MH, Tichy EH, Swinyer L. Evaluation of QM114, a novel ready-to-use liquid botulinum toxin, in aesthetic treatment of glabellar lines. In: *24th World Congress of Dermatology “A new ERA for global dermatology”*. Milan; 2019.
<https://www.wcd2019milan-dl.org/abstract-book/documents/late-breaking-abstracts/03-aesthetic-cosmetic-dermatology/evaluation-of-qm114-a-novel-490.pdf>
 25. Kutschenko A, Weisemann J, Kollewe K, Fiedler T, Alvermann S, Boselt S, et al. Botulinum neurotoxin serotype D – a potential treatment alternative for BoNT/A and B non-responding patients. *Clin Neurophysiol*. 2019;130(6):1066–73.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2019.02.007>
 26. Rystedt A, Karlqvist M, Bertilsson M, Naver H, Swartling C. Effect of botulinum toxin concentration on reduction in sweating: a randomized, double-blind study. *Acta Derm Venereol*. 2013;93(6):674–8.
<https://doi.org/10.2340/00015555-1606>
 27. Bentivoglio AR, del Grande A, Petracca M, Ialongo T, Ricciardi L. Clinical differences between botulinum neurotoxin type A and B. *Toxicon*. 2015;107(Pt A):77–84.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.001>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.В. Савкина** — дизайн статьи, анализ данных литературы, написание текста рукописи; **М.А. Кривых** — обоснование концепции исследования (формулирование идеи, исследовательских целей и задач); **Л.В. Саяпина** — критический пересмотр содержания текста, доработка текста рукописи; **Ю.И. Обухов** — критическое обсуждение текста рукописи; **В.П. Бондарев** — критическое обсуждение текста рукописи, окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **M.V. Savkina** designed the article, analysed literature data, and drafted the manuscript. **M.A. Krivyykh** substantiated the research concept (formulated the study idea, aim, and objectives). **L.V. Sayapina** critically revised and finalised the manuscript. **Yu.I. Obukhov** participated in the critical discussion of the manuscript. **V.P. Bondarev** participated in the critical discussion of the manuscript and approved its final version for publication.

Об авторах / Authors

Савкина Мария Владимировна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8527-2157>
savkina@expmed.ru

Кривых Максим Андреевич, канд. фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2003-1264>
krivых@expmed.ru

Саяпина Лидия Васильевна, д-р мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2272-2621>
sayapina@expmed.ru

Обухов Юрий Иванович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7729-9800>
obukhov@expmed.ru

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

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>
Bondarev@expmed.ru

Maria V. Savkina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8527-2157>
savkina@expmed.ru

Maxim A. Krivых, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2003-1264>
krivых@expmed.ru

Lidia V. Sayapina, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2272-2621>
sayapina@expmed.ru

Yuri I. Obukhov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7729-9800>
obukhov@expmed.ru

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

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>
Bondarev@expmed.ru

Поступила 17.11.2022

После доработки 17.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 17 November 2022

Revised 17 August 2023

Accepted 13 September 2023

УДК 615.065:615.37

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-431>

Научная статья | Scientific article



Сравнительная оценка безопасности интраназальной и внутримышечной иммунизации вакцинами для профилактики коронавирусной инфекции на основе аденовирусов Ad26 и Ad5

Е.В. Зуев[✉], О.Л. Евдокимова, О.А. Маркова, И.А. Короткевич, Т.В. Григорьева, Р.А. Хамитов

Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Тестовская, д. 10, Москва, 123112, Российская Федерация

✉ Зуев Евгений Васильевич; evzuev@generium.ru

Резюме

Актуальность. Интраназальная вакцинация может в значительной мере изменить подходы к массовой иммунизации населения для профилактики различных инфекций, меняя акцент с формирования системного гуморального и клеточного ответа на создание барьерной защиты слизистых оболочек — входных ворот возбудителя и на развитие мукозального иммунного ответа. В связи с этим актуальной представляется оценка безопасности применения вакцин для профилактики коронавирусной инфекции при изменении способа введения — с внутримышечного на интраназальный.

Цель. Сравнительная оценка безопасности интраназальной и внутримышечной вакцинации на основании промежуточных результатов клинического исследования III фазы VCI-COV-III с участием здоровых добровольцев.

Материалы и методы. Оценка безопасности проводилась на основании зарегистрированных исследований нежелательных явлений и реакций на момент составления промежуточного отчета по данным 42 дней наблюдения за 137 добровольцами в рамках рандомизированного двойного слепого клинического исследования интраназальной вакцины (ИнВ) Салнавак и внутримышечной вакцины (ВмВ) Гам-КОВИД-Вак для профилактики коронавирусной инфекции.

Результаты. Число добровольцев с зарегистрированными нежелательными реакциями в исследовании составило 17 из 68 (25%) и 30 из 69 (43,5%) человек в группах с введением ИнВ и ВмВ соответственно ($p=0,036$). В группе добровольцев, получавших ИнВ, были зарегистрированы кратковременные общие и местные нежелательные реакции в основном легкой степени. Частота и характер отмечаемых реакций в целом соответствуют таковым при применении иных продуктов с интраназальным путем введения.

Выводы. Предварительные данные клинического исследования показали высокий уровень безопасности исследуемой интраназальной вакцины. Профиль безопасности ИнВ сопоставим с иными интраназальными или внутримышечными вакцинами для профилактики коронавирусной инфекции.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция; COVID-19; SARS-CoV-2; иммунизация; вакцина; интраназальная вакцинация; мукозальный иммунный ответ; безопасность; нежелательные явления; нежелательные реакции

Для цитирования: Зуев Е.В., Евдокимова О.Л., Маркова О.А., Короткевич И.А., Григорьева Т.В., Хамитов Р.А. Сравнительная оценка безопасности интраназальной и внутримышечной иммунизации вакцинами для профилактики коронавирусной инфекции на основе Ad26 и Ad5. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(3):275–289. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-431>

© Е.В. Зуев, О.Л. Евдокимова, О.А. Маркова, И.А. Короткевич, Т.В. Григорьева, Р.А. Хамитов, 2023

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке АО «ГЕНЕРИУМ» (спонсор).

Конфликт интересов. Существует потенциальный конфликт интересов в силу финансирования данной научной работы компанией АО «ГЕНЕРИУМ». Однако при написании статьи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных. Р.А. Хамитов — член редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2013 г.

Comparative safety evaluation of intranasal and intramuscular immunisation with Ad26- and Ad5-vectored vaccines to prevent coronavirus infection

Evgeny V. Zuev✉, Olga L. Evdokimova, Oksana A. Markova, Ilya A. Korotkevich, Taisiya V. Grigorieva, Ravil A. Khamitov

GENERIUM JSC, 10 Testovskaya St., Moscow 123112, Russian Federation

✉ Eugene V. Zuev; evzuev@generium.ru

Abstract

Scientific relevance. Intranasal vaccination may dramatically change current approaches to mass immunisation against various infections, shifting the focus from inducing systemic humoral and cellular immune responses to developing mucosal immunity and protective barriers on the mucous membranes, which are entry points for pathogens. Therefore, the safety of switching from intramuscular to intranasal vaccination should be evaluated.

Aim. This study aimed to compare the safety of intranasal and intramuscular vaccination using the intermediate results of the phase III VCI-COV-III clinical trial in healthy volunteers.

Materials and methods. The evaluation of the safety profile was based on the adverse events and adverse drug reactions (ADRs) documented by investigators in the interim report on the randomised, double-blind clinical trial of the Salnavac intranasal vaccine (InV) and the Gam-COVID-Vac intramuscular vaccine (ImV) against coronavirus infection. The report covered 42 days of observation in 137 healthy volunteers.

Results. ADRs were reported for 17/68 (25%) and 30/69 (43.5%) volunteers in the InV group and the ImV group, respectively ($p=0.036$). The ADRs reported for the InV group were systemic and local, short-term, mostly mild, and generally consistent in incidence and nature with the ADRs typically observed with other nasal products.

Conclusions. According to the preliminary data obtained in the clinical trial, the InV demonstrates a high level of safety. Its safety profile is comparable with those of other intranasal and intramuscular vaccines for the prevention of coronavirus infection.

Key words: coronavirus infection; COVID-19; SARS-CoV-2; immunisation; vaccine; intranasal vaccination; mucosal immunity; safety; adverse events; adverse drug reactions

For citation: Zuev E.V., Evdokimova O.L., Markova O.A., Korotkevich I.A., Grigorieva T.V., Khamitov R.A. Comparative safety evaluation of intranasal and intramuscular immunisation with Ad26- and Ad5-vectored vaccines to prevent coronavirus infection. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):275–289. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-431>

Funding. The study was carried out with financial support of GENERIUM JSC.

Conflict of interest. There is a potential conflict of interest due to the financial support of this study by GENERIUM JSC. However, when writing the article, the authors were guided by considerations of scientific value of the material obtained; the authors declare their impartiality in its assessment. R.A. Khamitov has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2013.

Введение

Применение вакцин для профилактики различных заболеваний позволяет спасать во всем мире от 2 до 3 млн жизней каждый год, при этом риск возникновения нежелательных реакций (НР) при применении иммунопрепаратов значительно ниже риска неблагоприятных исходов и осложнений инфекционных заболеваний¹. В период пандемии COVID-19 человечество столкнулось с новыми вызовами, которые потребовали оперативного реагирования [1]. В Российской Федерации во время пандемии было зарегистрировано около 23 млн подтвержденных случаев заболевания и около 400 тыс. летальных исходов². С целью выполнения профилактических мероприятий в мире на август 2023 г. вакцинировано более 5 млрд человек, использовано более 13 млрд доз различных вакцин, что является безусловным рекордом для столь короткого времени пандемии³. В России для профилактики коронавирусной инфекции одобрены к применению девять вакцин, две из которых предназначены для интраназального введения⁴. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 19 препаратов, что составляет около 11% всех вакцин для иммунопрофилактики COVID-19, находящихся на этапе клинических исследований (КИ), относится к мукозальным вакцинам, что говорит об интересе разработчиков и фармпроизводителей к данному направлению исследований⁵. Поскольку входными воротами для возбудителя COVID-19 являются слизистые оболочки дыхательных путей, индукция формирования мукозального иммунитета играет значительную роль в защите от этой инфекции. Согласно данным литературы применение мукозальных вакцин приводит к активации в том числе системного иммунного ответа [2, 3]. Применение мукозальных вакцин для интраназального введения является менее травматичным и требует меньшего вовлечения медицинского персонала, что играет существенную роль в ус-

ловиях неблагополучной эпидемиологической обстановки с необходимостью проведения массовых мероприятий по иммунизации населения, так как снижается риск передачи вирусных гепатитов, ВИЧ и др.

Помимо оценки иммуногенности и профилактической эффективности вакцин представляется важным сделать акцент на изучение их безопасности, принимая во внимание особенности способа доставки антигена в организм человека [4]. Учитывая необходимость введения вакцин большому количеству здоровых лиц для предотвращения заболеваний, уровень безопасности для таких препаратов должен быть очень высоким и охватывать все целевые группы населения независимо от возраста, пола, расы и этнической принадлежности. Необходимость обеспечения безопасности новых вакцин стимулирует процессы их тщательного исследования на всех этапах разработки [5].

В Российской Федерации зарегистрирована комбинированная векторная вакцина (Салнавак, АО «ГЕНЕРИУМ») для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, которая представляет собой интраназальную вакцину на основе аденовирусных векторов Ad26 и Ad5⁶. В настоящее время в мире применяются несколько систем доставки для различных интраназальных вакцин, находящихся как на этапе фармацевтической разработки, так и в процессе КИ (назальные капли, порошок, спрей, гель). Аэрозоль (спрей) представляется наиболее предпочтительной формой выпуска по характеристикам иммуногенности и безопасности [6].

Цель работы – сравнительная оценка безопасности интраназальной и внутримышечной вакцинации на основании промежуточных результатов клинического исследования III фазы VCI-COV-III⁷ с участием здоровых добровольцев. Задачей исследования являлось сравнение количественных и качественных характеристик нежелательных явлений и реакций при применении изучаемых вакцин.

¹ Vaccines and immunization: Vaccine safety. WHO; 2020. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/vaccines-and-immunization-vaccine-safety>

² WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Russia. WHO; 2023. <https://covid19.who.int/region/euro/country/ru>

³ WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Vaccination. WHO; 2023. <https://covid19.who.int/?mapFilter=vaccinations>

⁴ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

⁵ COVID-19 – Landscape of novel coronavirus candidate vaccine development worldwide. WHO; 2023. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>

⁶ Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция по медицинскому применению препарата Салнавак. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=c9d6248c-6301-4a15-8ff9-4910a9a0363f

⁷ Государственный реестр лекарственных средств. Реестр разрешенных клинических исследований. <https://grls.rosminzdrav.ru/>

Материалы и методы

Дизайн клинического исследования

Оценка безопасности иммунопрофилактики препаратами для интраназальной и внутримышечной вакцинации проведена в рамках рандомизированного двойного слепого многоцентрового исследования III фазы, выполняемого с целью сравнения иммуногенности и безопасности комбинированных векторных вакцин в дизайне «double-dummy» для маскировки способа введения. Протокол исследования одобрен Минздравом России (разрешение на проведение КИ № 869 от 20.12.2021), Советом по этике Минздрава России (выписка из протокола № 295 заседания Совета по этике от 07.12.2021) и независимыми локальными этическими комитетами клинических центров⁸. Исследование проводилось в соответствии с Правилами надлежащей клинической практики⁹, требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации¹⁰.

КИ состояло из следующих этапов: процедура скрининга добровольцев (до 7 дней); иммунизация исследуемыми препаратами – компонентом I (день 1) и компонентом II (день 21); период наблюдения I (до 42 дней) и период наблюдения II (до 365 дней). В настоящее время доступны результаты промежуточного анализа данных на 42 день наблюдения. Исследование продолжается¹¹.

Исследуемые препараты. Комбинированные векторные вакцины для профилактики коронавируса: вакцина для интраназального применения (ИНВ) – Салнавак, АО «ГЕНЕРИУМ», и вакцина для внутримышечного применения (ВМВ) – Гам-Ковид-Вак, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (препарат сравнения). ИНВ и ВМВ состояли из двух компонентов, включающих рекомбинантный вирусный вектор на основе аденовируса человека 26 серотипа (компонент I) и 5 серотипа (компонент II), несущих ген S-белка вируса SARS-CoV-2. Полная доза обеих вакцин составляла 10^{11} вирусных частиц на дозу для каждого рекомбинантного аденовируса или 0,5 мл на дозу для внутримышечного/интраназального введения. В качестве плацебо применяли

буферную композицию, равную объему вакцины. Препараты вакцин и плацебо изготовлены и хранились в АО «ГЕНЕРИУМ». Исследуемые препараты и плацебо вводили интраназально или внутримышечно в соответствии со схемой рандомизации. Вне зависимости от способа введения компонент I препаратов назначался в день 1 исследования, компонент II – в день 21 исследования.

Интраназальное введение. Для введения исследуемого препарата ИНВ была использована насадка-распылитель производства Aero Pump GmbH (Германия). Анализ распределения частиц (капель) по размеру на примере использования модельного раствора (дистиллированной воды), проведенный с помощью метода лазерной дифракции с использованием прибора Spraytec (Malvern Instruments, Великобритания), показал следующие результаты распределения частиц по диаметру: 10, 50 и 90% частиц от всего распыленного объема имеют диаметр меньше, чем 66,41 (D_{v10}), 154,73 (D_{v50}) и 303,3 мкм (D_{v90}) соответственно; частицы размером менее 10 мкм обнаружены не были. Полученные данные профиля распределения частиц по размеру свидетельствуют о характеристиках частиц, необходимых для их эффективного распределения в верхних дыхательных путях на фоне низкой вероятности попадания в легкие [7].

Критерии отбора добровольцев. Отбор добровольцев для включения в КИ проводился на базе 16 медицинских учреждений Российской Федерации в соответствии с одобренными критериями отбора пациентов.

Критерии включения добровольцев в КИ:

- мужчины и женщины в возрасте от 18 до 60 лет;
- письменное информированное согласие;
- отсутствие значимых отклонений по данным лабораторного, физикального обследования, измерения показателей жизненно важных функций, результатам электрокардиографии;
- индекс массы тела (ИМТ) $18,5 \leq \text{ИМТ} \leq 29,9 \text{ кг/м}^2$;
- согласие на применение эффективных методов контрацепции в ходе всего периода участия в КИ;
- отсутствие острых инфекционных и неинфекционных заболеваний, обострения хро-

⁸ Государственный реестр лекарственных средств. Реестр разрешенных клинических исследований. <https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionMini.aspx?CISStatementGUID=f6524838-2077-4b6d-b9aa-168a0aee6596&CIPermGUID=b52f67bb-11eb-41db-aaff-0cb8cc1ced61>

⁹ Integrated addendum to ICH E6(R1): Guideline for good clinical practice E6(R2). https://database.ich.org/sites/default/files/E6_R2_Addendum.pdf

¹⁰ WMA Declaration of Helsinki – ethical principles for medical research involving human subjects. <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>

¹¹ Государственный реестр лекарственных средств. Реестр разрешенных клинических исследований. <https://grls.rosminzdrav.ru/>

- нических заболеваний в момент вакцинации и за 14 дней до вакцинации;
- отрицательный тест мочи на запрещенные препараты;
 - отрицательный тест на содержание алкоголя в выдыхаемом воздухе;
 - отсутствие злокачественных новообразований любого характера и локализации.
- Критерии не включения добровольцев в КИ:
- участие добровольца в любом другом исследовании за последние 90 дней (с момента применения исследуемого препарата);
 - любая вакцинация за последние 30 дней;
 - применение любой вакцины для профилактики COVID-19 за последние 6 мес. до введения исследуемых препаратов;
 - наличие в анамнезе заболевания COVID-19 за последние 6 мес. до введения исследуемых препаратов;
 - положительный результат исследования на SARS-CoV-2 методом ПЦР (на этапе скрининга);
 - положительные результаты тестов на выявление антител IgM к SARS-CoV-2;
 - уровень антител IgG к SARS-CoV-2 более 100 BAU/мл;
 - контакт добровольца с заболевшими COVID-19 в течение последних 14 дней;
 - применение стероидных препаратов (кроме гормональных контрацептивных препаратов), иммуноглобулинов и/или других препаратов крови, не завершившееся за 30 дней до рандомизации;
 - затруднение носового дыхания (включая причины анатомического/структурного характера, острый или хронический риносинусит или иные причины);
 - регулярное интраназальное использование топических сосудосуживающих препаратов;
 - регулярное в прошлом или текущее использование наркотических препаратов;
 - прием иммуносупрессивных препаратов, завершившийся менее чем за 3 мес. до рандомизации;
 - положительный тест на беременность по результатам исследования крови или мочи (для женщин детородного возраста) или кормление грудью;
 - положительные тесты на ВИЧ, гепатиты В и С или подтвержденная информация о заболевании из анамнеза;
 - обострение аллергических заболеваний на момент вакцинации или отягощенный аллергологический анамнез (анафилактический

шок, отек Квинке, полиморфная экссудативная экзема, атопия, сывороточная болезнь в анамнезе, гиперчувствительность или аллергические реакции на введение иммунобиологических препаратов, известные аллергические реакции на компоненты препарата и др.);

- систолическое артериальное давление (АД) менее 100 мм рт. ст. или выше 139 мм рт. ст.; диастолическое АД менее 60 мм рт. ст. или выше 90 мм рт. ст.; частота сердечных сокращений (ЧСС) менее 60 уд/мин или более 100 уд/мин;
- аутоиммунные заболевания в анамнезе у самого добровольца и у родственников 1–2 степени родства;
- прием алкоголя, превышающий уровень низкого риска: не более 20 г чистого алкоголя в день, не более 5 дней в неделю, прием алкоголя в течение 48 ч до введения исследуемого препарата;
- госпитализация и/или хирургическое вмешательство в период участия в исследовании, а также за 4 недели до предполагаемой даты введения препарата;
- наличие сопутствующего заболевания, которое может оказывать влияние на оценку результатов исследования или, по мнению исследователя, может быть противопоказанием к участию в исследовании.

Рандомизация и маскировка. После подтверждения критериев отбора все добровольцы были распределены методом блоковой рандомизации (блоки переменного размера 4 или 6) с использованием интерактивной интернет-системы рандомизации (interactive web response system, IWRS)¹² в соотношении 1:1 в две группы: группа 1 получала ИнВ путем интраназального введения и плацебо путем внутримышечной инъекции; группа 2 получала ВмВ внутримышечно и плацебо интраназально. В ходе двойного слепого исследования участники получали препарат/плацебо как интраназально, так и внутримышечно. Препараты и плацебо внешне неотличимы по упаковке, этикетке и содержимому. Данные о групповом распределении были замаскированы для исследователей и добровольцев. В соответствии с протоколом исследования снятие ослепления данных проведено с целью подготовки промежуточного отчета в минимальном объеме, достаточном и необходимом для проведения анализа данных.

Оценка безопасности исследуемых препаратов. Обследование добровольцев с целью изучения безопасности препаратов в рамках

¹² <https://en.ennov.com/solutions/clinical/clinical-data-management/>

промежуточного анализа включало физикальный осмотр, оценку жизненно важных показателей (АД, ЧСС, частота дыхательных движений, температура тела), общий анализ крови (гемоглобин, эритроциты, тромбоциты, лейкоциты и лейкоцитарная формула), биохимический анализ крови (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, общий белок, общий билирубин, общий холестерин, лактатдегидрогеназа, щелочная фосфатаза, глюкоза, креатинин, скорость клубочковой фильтрации), общий анализ мочи (белок, глюкоза), протромбин по Квику и ЭКГ в 12 отведениях.

После начала введения исследуемого препарата любые неблагоприятные изменения в состоянии здоровья добровольцев, которым введен лекарственный препарат, независимо от причинно-следственной связи с его применением, были зарегистрированы в качестве нежелательных явлений (НЯ). Для оценки значимости ряда лабораторных показателей был использован алгоритм, предложенный С.В. Фитилевым с соавт. [8], в остальных случаях использовались клинические рекомендации и рутинные подходы. Регистрация НЯ проводилась до момента завершения участия добровольца в КИ. Классификация НЯ осуществлялась по следующим параметрам: серьезность, степень тяжести, причинно-следственная связь с исследуемой терапией, исход и предпринятые меры. Серьезность события определялась в соответствии со стандартными подходами¹³. В случае развития серьезных НЯ или беременности добровольца (или партнерши добровольца) исследователь должен был сообщить спонсору исследования в течение 24 ч необходимую информацию по форме, утвержденной для данного исследования. Степень тяжести НЯ оценивалась по 5-степенной шкале в соответствии с алгоритмом, основанным на требованиях Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA)¹⁴ и Общих терминологических критериях нежелательных явлений (Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE) версии 5.0¹⁵.

На основании имеющихся клинико-лабораторных данных и доступных сведений литературы по исследуемым препаратам проводилось определение уровня причинно-следственной связи НЯ с исследуемой терапией (нет связи, сомнительная, возможная, вероятная, определенная). Нежелательной реакцией (НР) считалась любая непреднамеренная неблагоприятная реакция организма, связанная с применением исследуемого препарата, предполагающая наличие, как минимум, возможной взаимосвязи с применением подозреваемого лекарственного препарата (исследуемого препарата).

Исходы НЯ включали: не разрешилось, выздоровление/разрешение, в процессе выздоровления/разрешения, выздоровление/разрешение с последствиями, летальный исход, неизвестный. НЯ могло купироваться самостоятельно, или для купирования НЯ применялись медикаментозные или иные методы лечения.

Все клинико-лабораторные данные были собраны с использованием платформы для электронного сбора данных (electronic data capture, EDC)¹⁶.

В рамках изучения безопасности препаратов была оценена частота развития НЯ и серьезных нежелательных явлений (СНЯ) по данным субъективных жалоб, физикального осмотра, оценки параметров жизненно важных функций, результатов лабораторных и инструментальных исследований¹⁷.

Статистическая обработка данных

Все сравнения групп добровольцев по частоте НЯ/НР проводились с помощью двусторонних критериев. При сравнении исходных характеристик добровольцев использовался *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок или критерий Манна–Уитни в зависимости от вида распределения добровольцев по значениям этих переменных. Для сравнений групп добровольцев по полу использовался критерий χ^2 . Для проведения статистического анализа было использовано программное обеспечение для статистических расчетов R версии 4.1.218.

¹³ ICH harmonised tripartite guideline. Clinical safety data management: definitions and standards for expedited reporting E2A. https://database.ich.org/sites/default/files/E2A_Guideline.pdf

¹⁴ Toxicity grading scale for healthy adult and adolescent volunteers enrolled in preventive vaccine clinical trials. Guidance for industry. FDA; 2007. <https://www.fda.gov/media/73679/download>

¹⁵ Common terminology criteria for adverse events (CTCAE). Version 5.0. U.S. department of health and human services; 2017. https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_5x7.pdf

¹⁶ <https://en.enov.com/solutions/clinical/clinical-data-management/>

¹⁷ Государственный реестр лекарственных средств. Реестр разрешенных клинических исследований. <https://grls.rosminzdrav.ru/>

¹⁸ <https://www.R-project.org/>

Так как исходные характеристики, исследованные в рамках промежуточного анализа, будут повторно анализироваться и сравниваться между группами в рамках окончательного анализа всего объема данных за период от процедуры скрининга до дня 42, все сравнения между добровольцами в группах по препаратам корректировались поправками на множественные сравнения. При сравнении добровольцев по исходным характеристикам в группах по препаратам нулевая гипотеза об отсутствии различий между группами отвергалась и принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между группами при уровне $p < 0,000001$.

Данные по НЯ/НР описаны с помощью абсолютного числа наблюдений за добровольцами с НЯ/НР и долей в процентах с агрегацией предпочтительных терминов (preferred term, PT) по классам систем органов (system organ class, SOC) в соответствии с медицинским словарем регуляторной деятельности (Medical Dictionary for Regulatory Activities, MedDRA) версии 25.0¹⁹. Сравнения между группами по числу добровольцев с НЯ/НР, а также по частоте исходов НЯ и предпринятых мер проводились с помощью точного критерия Фишера; нулевая гипотеза об отсутствии различий между группами отвергалась и принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между группами при уровне $p < 0,05$.

Сравнения между группами по числу добровольцев с НЯ/НР в пределах отдельных SOC/PT, а также сравнения частот НР с данными исследований других вакцин проводились с помощью z-теста для пропорций; нулевая гипотеза об отсутствии различий между группами отвергалась и принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между группами при уровне $p < 0,05$.

Сбор данных проводился исследователями с верификацией данных персоналом спонсора с использованием программного обеспечения ENNOV CLINICAL S.A.S. (Франция)²⁰. Статистический и медицинский анализы данных, а также подготовка промежуточного отчета об исследовании были выполнены спонсором.

Результаты

На момент проведения промежуточного анализа КИ был проведен скрининг 703 добровольцев, 138 из которых (19,6%) соответствовали всем критериям отбора и были рандомизированы в две группы вакцинопрофилактики. Один

из рандомизированных добровольцев отозвал информированное согласие до введения компонента I вакцины, что было расценено как ошибка рандомизации. Полную анализируемую совокупность (full analysis set, FAS) и популяцию безопасности, включающую всех добровольцев, получивших как минимум один компонент вакцины, составили 137 добровольцев (рис. 1).

Добровольцы в сравниваемых группах не отличались между собой по исходным характеристикам (полученные для всех показателей уровня p больше уровня, заданного для сравнения между группами по демографическим и исходным характеристикам на промежуточном этапе – $p < 0,000001$) (табл. 1).

В ходе исследования 137 добровольцев двух групп исследования получили, по крайней мере, компонент I и 132 добровольца получили компонент I и компонент II (через 21 день после компонента I) исследуемого препарата ИнВ или препарата сравнения ВмВ. Режим дозирования был одинаков в двух группах для всех участников КИ. Препараты вводились строго в рекомендованных дозах.

Зарегистрированные нежелательные явления

Всего в исследовании было выявлено 219 эпизодов НЯ, развившихся у 83 из 137 участников КИ (60,58%), которые равномерно распределились по исследуемым группам. В анализируемый период НЯ были зарегистрированы у 42 из 68 (61,8%) добровольцев в группе с применением препарата ИнВ и у 41 из 69 (59,4%) – в группе с применением препарата ВмВ ($p = 0,92$).

Наиболее часто ($\geq 10\%$) нежелательные явления регистрировались в следующих классах систем органов (SOC) согласно классификации MedDRA: в группе добровольцев, получивших ИнВ, это были отклонения лабораторных и инструментальных данных (30,9%), общие нарушения и реакции в месте введения (16,2%), нарушения со стороны нервной системы (13,2%), инфекции и инвазии (13,2%), нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения (11,8%), а для группы добровольцев, получивших ВмВ, – общие нарушения и реакции в месте введения (37,7%), отклонения лабораторных и инструментальных данных (15,9%), нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения (14,5%), инфекции и инвазии (14,5%), нарушения со стороны нервной системы (10,1%).

¹⁹ Medical dictionary for regulatory activities. <https://www.meddra.org/>

²⁰ <https://en.ennov.com/solutions/clinical/clinical-data-management/>

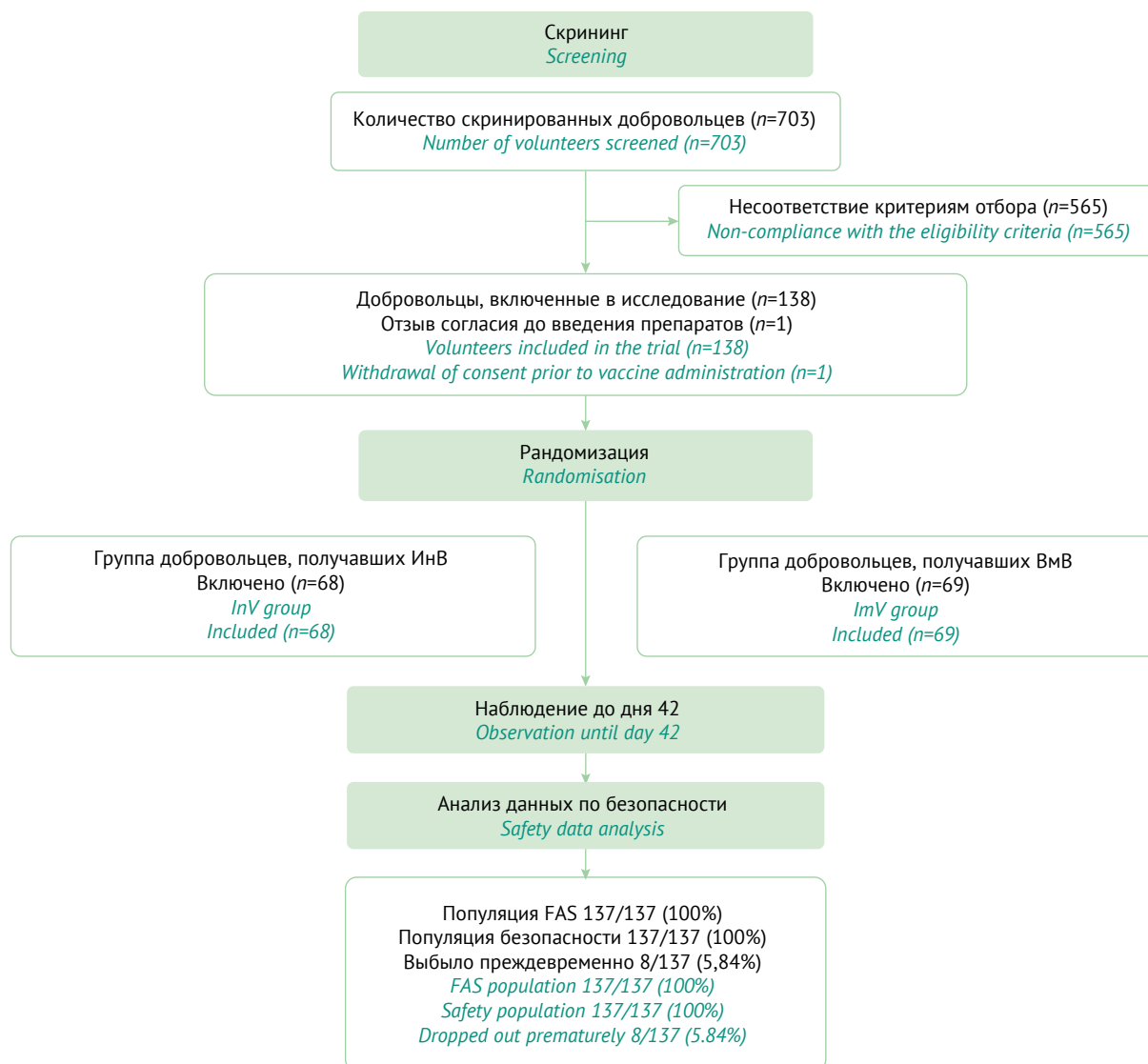


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Схема клинического исследования и распределение добровольцев по группам. ИнВ — интраназальная вакцина; ВмВ — внутримышечная вакцина; FAS — full analysis set (полная анализируемая совокупность).

Fig. 1. Clinical trial design and assignment of volunteers to groups. InV, intranasal vaccine; ImV, intramuscular vaccine; FAS, full analysis set.

У большинства участников КИ — 60,3% в группе добровольцев, получивших ИнВ, и 60% в группе с применением ВмВ — были зарегистрированы НЯ 1 степени тяжести (легкие). Только одно из НЯ (пирексия) обладало максимальной степенью тяжести 3 в группе добровольцев, получивших ИнВ. Большинство НЯ разрешилось на момент окончания сбора данных для промежуточного анализа (82,6% НЯ в группе добровольцев, получивших ИнВ, и 89% НЯ в группе добровольцев, получивших ВмВ) (рис. 2). При этом с целью купирования неблагоприятных событий в 21,8 и 33,1% случаев на фоне применения ИнВ и ВмВ соответственно были применены медикаментозные

или иные способы медицинского вмешательства (рис. 3).

Зарегистрирован один эпизод беременности партнерши добровольца 1979 года рождения со спонтанным прерыванием в срок 11 недель. По мнению исследователей, исход беременности не был связан с исследуемой терапией. Случаев серьезных НЯ в период КИ не выявлено.

Зарегистрированные нежелательные реакции

Доля участников КИ с зарегистрированными НР в исследовании составила 47 из 137 (34,3%) с достоверным преобладанием событий в группе сравнения: 17 из 68 (25%) и 30 из 69 (43,5%)

в группах добровольцев, получивших ИнВ и ВмВ соответственно ($p=0,036$).

Наиболее часто НР в группах добровольцев, получивших ИнВ и ВмВ, наблюдались среди нарушений со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения (7,4 и 10,1% соответственно) и общих нарушений и реакций в месте введения (10,3 и 37,7% соответственно). Реже в группах участников КИ, получивших ИнВ и ВмВ, регистрировались НР среди отклонений лабораторных и инструментальных данных (5,9 и 0%), при нарушениях со стороны нервной системы (2,9 и 4,4%), со стороны мышечной, скелетной и соединительной ткани (1,5 и 2,9%), при инфекциях и инвазиях (1,5 и 2,9%), желудочно-кишечных нарушениях (1,5 и 0%), нарушениях со стороны кожи и подкожной клетчатки (1,5 и 0%), нарушениях со стороны органа зрения (0 и 1,5% соответствен-

но) (рис. 4). При этом статистически значимые различия между группами отмечались только по числу добровольцев с НР из SOC «Общие нарушения и реакции в месте введения» согласно классификации MedDRA ($p<0,001$).

При сравнении долей НР по отдельным предпочтительным терминам (preferred terms, PT) согласно классификации MedDRA различий между группами по большей части выявлено не было, за исключением боли в месте инъекции (1,5% в группе добровольцев, получивших ИнВ, и 17,4% в группе с применением ВмВ ($p=0,004$)).

Были выявлены ожидаемые различия по доле участников КИ с НР, связанных с особенностями способа применения препаратов исследуемой терапии. Так, боль, отек или эритема в месте инъекции чаще регистрировались в группе участников исследования, получивших ВмВ (23,2% против 1,5% в группе добровольцев, получивших

Таблица 1. Исходные характеристики добровольцев
Table 1. Baseline characteristics of volunteers

Параметр <i>Parameter</i>	Группа добровольцев, получавших ИнВ <i>InV group</i> (<i>n</i> =68)	Группа добровольцев, получавших ВмВ <i>ImV group</i> (<i>n</i> =69)	Уровень <i>p</i> / критерий <i>p-level /</i> <i>criterion</i>
Женщины, <i>n</i> (%) <i>Female, n (%)</i>	31 (45,6)	31 (44,9)	1 / χ^2
Мужчины, <i>n</i> (%) <i>Male, n (%)</i>	37 (54,4)	38 (55,1)	1 / χ^2
Возраст, лет Среднее (СО) <i>Age, years</i> <i>Mean (SD)</i>	34,43 (8,99)	36,25 (9,18)	0,24 / <i>t</i> -критерий Стьюдента <i>Student's t-test</i>
Систолическое АД, мм рт. ст. Медиана (IQR) <i>Systolic BP, mm Hg</i> <i>Median (IQR)</i>	118 (110,00;124,25)	120 (112;125)	0,31 / критерий Манна–Уитни <i>Mann-Whitney criterion</i>
Диастолическое АД, мм рт. ст. Медиана (IQR) <i>Diastolic BP, mm Hg</i> <i>Median (IQR)</i>	75 (70;80)	75 (68;80)	0,38 / критерий Манна–Уитни <i>Mann-Whitney criterion</i>
Частота сердечных сокращений Медиана (IQR) <i>Heart rate</i> <i>Median (IQR)</i>	71,5 (67,00;79,25)	69 (68;76)	0,14 / критерий Манна–Уитни <i>Mann-Whitney criterion</i>
Частота дыхательных движений Медиана (IQR) <i>Respiratory rate</i> <i>Median (IQR)</i>	16 (16;17)	16 (16;17)	0,8 / критерий Манна–Уитни <i>Mann-Whitney criterion</i>
Температура тела Медиана (IQR) <i>Body temperature</i> <i>Median (IQR)</i>	36,5 (36,4;36,6)	36,5 (36,4;36,6)	0,94 / критерий Манна–Уитни <i>Mann-Whitney criterion</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. СО — стандартное отклонение; IQR — межквартильный размах; АД — артериальное давление.
Note. SD, standard deviation; IQR, interquartile range; BP, blood pressure.

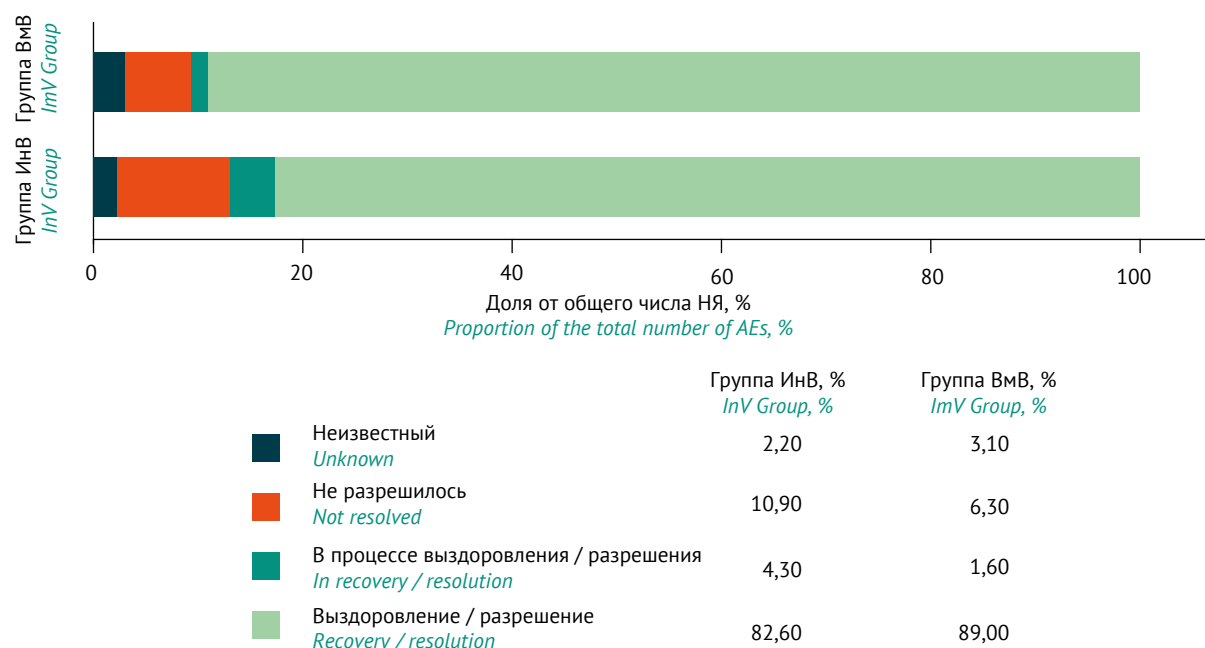


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Исходы нежелательных явлений (НЯ), зарегистрированных в анализируемый период, после введения добровольцам исследуемых препаратов: интраназальной вакцины (группа ИнВ) и внутримышечной вакцины (группа ВмВ). Популяция безопасности ($n=137$). Результаты представлены в виде доли от общего числа НЯ в популяции безопасности.

Fig. 2. Outcomes of the adverse events (AEs) registered in volunteers during the analysed period after administration of the intranasal vaccine (InV group) and the intramuscular vaccine (ImV group). Safety population ($n=137$). The results are presented as a proportion of the total number of AEs in the safety population.

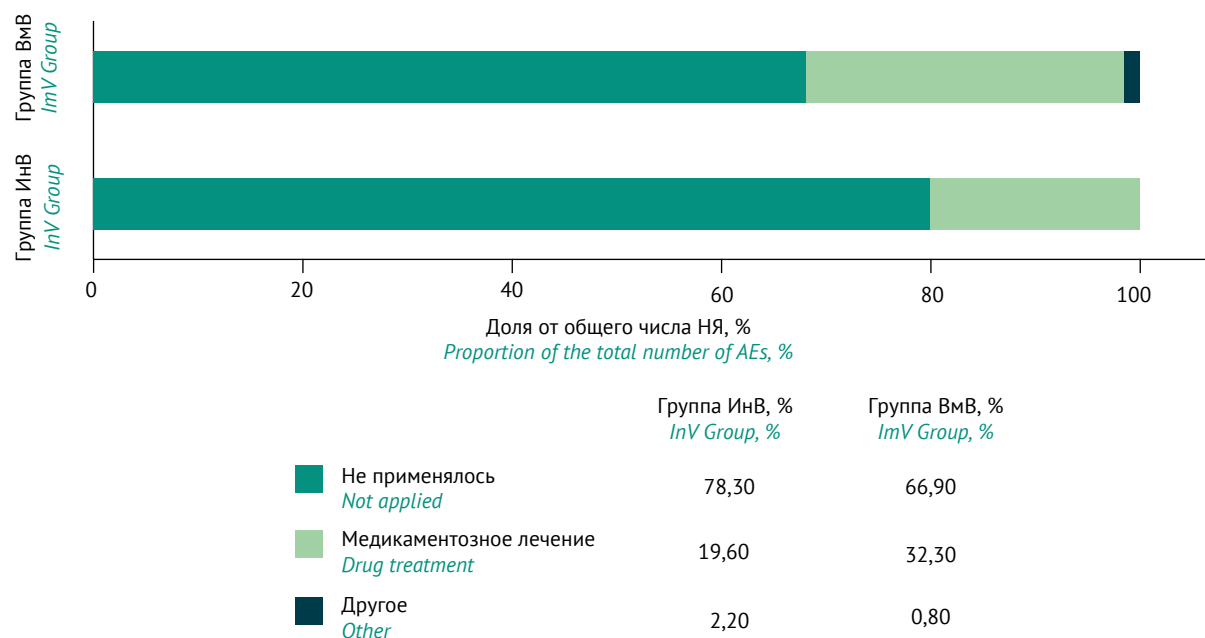


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Меры, предпринятые в связи с нежелательными явлениями (НЯ), зарегистрированными у добровольцев в анализируемый период в группах с введением исследуемых вакцин: интраназальной вакцины (группа ИнВ) и внутримышечной вакцины (группа ВмВ). Популяция безопасности ($n=137$). Результаты представлены в виде доли от общего числа НЯ в популяции безопасности.

Fig. 3. Measures taken for the adverse events (AEs) registered in volunteers during the analysed period after administration of the intranasal vaccine (InV group) and the intramuscular vaccine (ImV group). Safety population ($n=137$). The results are presented as a proportion of the total number of AEs in the safety population.

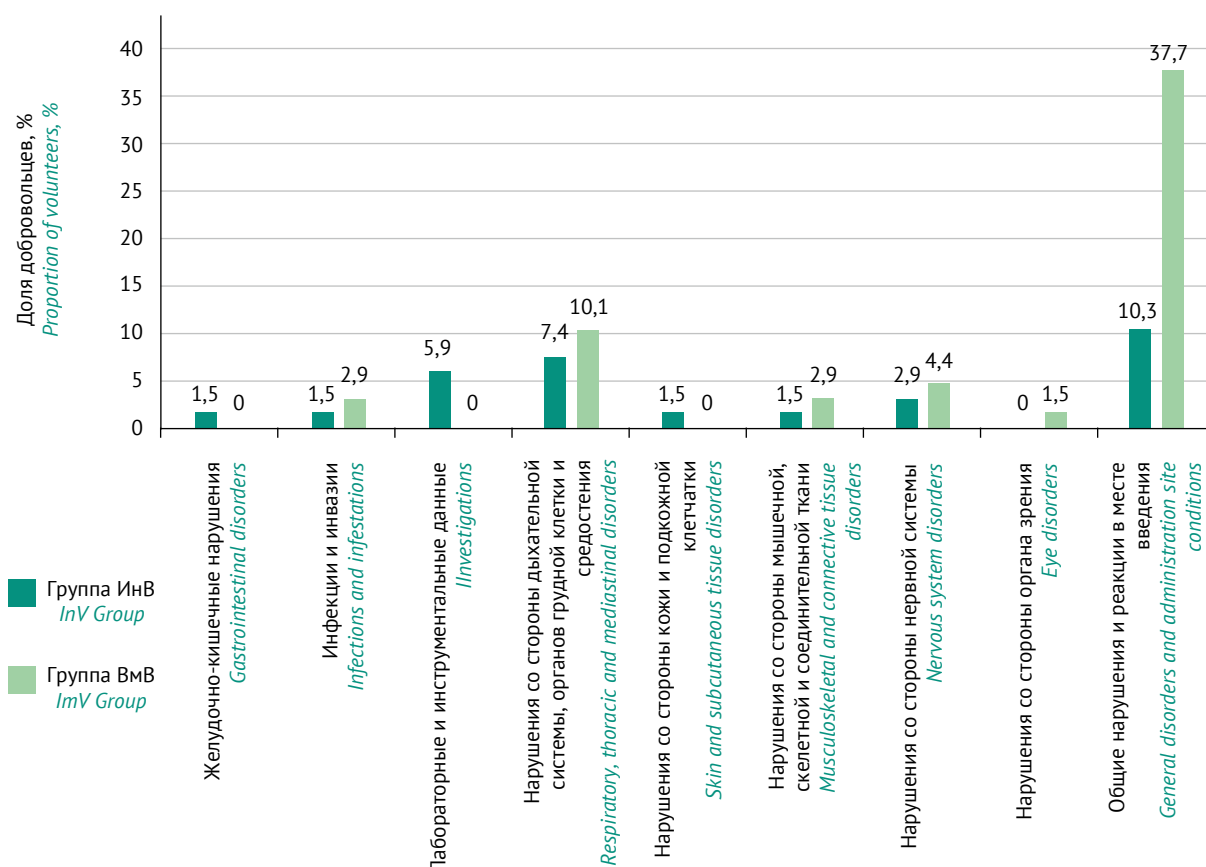


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Доля добровольцев с зарегистрированными нежелательными реакциями (НР) по классам систем органов (SOC, согласно классификации MedDRA) на фоне применения исследуемых вакцин: интраназальной вакцины (группа ИнВ) и внутримышечной вакцины (группа ВмВ). Ось абсцисс — классы систем органов. В группе добровольцев, получавших ИнВ, нарушения со стороны органа зрения выявлены не были. В группе добровольцев, получавших ВмВ, нарушения со стороны кожи и подкожной клетчатки, отклонения в лабораторных и инструментальных данных отсутствовали.

Fig. 4. Proportion of volunteers with adverse drug reactions (ADRs) registered after administration of the intranasal vaccine (InV group) and the intramuscular vaccine (ImV group) by system organ class (SOC) according to MedDRA classification. The X-axis shows organ system classes. The InV group had no eye disorders; the ImV group developed no skin and subcutaneous tissue disorders and no ADRs in the Investigations SOC.

ИнВ, $p < 0,001$). В это же время заложенность носа, ринорея, чихание, сухость слизистых оболочек дыхательных путей и иные нарушения со стороны слизистой оболочки носа составили 8,8 и 5,8% в группах добровольцев, получивших ИнВ и ВмВ, и были сопоставимы, что можно объяснить воздействием идентичного буферного раствора для препарата и плацебо на слизистую оболочку носа (рис. 5).

Среди НР, обуславливающих хорошо описанную системную реакцию на проведение иммунопрофилактики, были зарегистрированы миалгия, головная боль, астения, гипертермия, гриппоподобное заболевание и пирексия, которые реже встречались в группе участников исследования, получивших ИнВ: 11,8% против

26,0% человек в группе добровольцев, получивших ВмВ ($p = 0,002$).

Обсуждение

В последнее время в научном сообществе высказывалось мнение, что вакцины, вводимые внутримышечно, обеспечивая хорошую защиту от тяжелого течения COVID-19, недостаточно влияют на цепочку передачи инфекции, особенно в случае новых вариантов вируса SARS-CoV-2, таких как вариант «омикрон». Интраназальные вакцины потенциально способны обеспечить прерывание передачи инфекции и, как ожидается, формируют барьерный иммунитет слизистой оболочки верхних дыхательных путей, помимо системного гуморального и клеточного [9].



Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Доля добровольцев с зарегистрированными нежелательными реакциями (НР) по предпочтительным терминам (РТ, согласно классификации MedDRA) на фоне применения исследуемых вакцин: интраназальной вакцины (группа ИнВ) и внутримышечной вакцины (группа ВМВ). Ось ординат — НР; ось абсцисс — доля добровольцев в группе (%).

Fig. 5. Proportion of volunteers with adverse drug reactions (ADRs) registered after administration of the intranasal vaccine (InV group) and the intramuscular vaccine (ImV group) by preferred terms (PT) according to MedDRA classification. Y-axis shows ADRs; X-axis shows the proportion of volunteers in the group (%).

Полученные в ходе КИ VCI-COV-III²¹ результаты, в целом соответствуют данным инструкции по медицинскому применению и результатам КИ III фазы препарата ВМВ (Гам-КОВИД-Вак),

по данным которых чаще возникают кратковременные общие (непродолжительный гриппоподобный синдром, характеризующийся ознобом, повышением температуры тела, артралгией, ми-

²¹ Государственный реестр лекарственных средств. Реестр разрешенных клинических исследований. <https://grls.rosminzdrav.ru/>

алгией, астенией, общим недомоганием, головной болью) и местные (болезненность в месте инъекции, гиперемия, отечность) НР²² [10]. Некоторое отличие по числу системных реакций в группе интраназальной иммунизации, вероятно, связано с меньшим системным иммуногенным воздействием интраназальной вакцины, а меньшее число реакций в месте инъекции препарата сравнения компенсируется большей частотой различных реакций со стороны слизистой оболочки носа. Данные различия отчасти подтверждаются тем, что, несмотря на наличие высоких и достаточных для защиты титров вируснейтрализующих (ВНА) антител в сыворотке крови, выявленных при оценке иммуногенности в рамках VCI-COV-III, среднее геометрическое значение ВНА в группе добровольцев, получивших ИнВ, значительно ниже, чем в группе участников исследования, получивших ВмВ, — 243,85 (3,33) и 526,5 (3,76) соответственно²³.

Опубликованные данные КИ безопасности и иммуногенности однокомпонентной вакцины Ad5-nCoV (CanSino Biologics, Китай), вводимой аэрозольно (через ротовую полость) с помощью небулайзера в двух дозах, показали наличие НР у 19% добровольцев при введении в низкой дозе и у 24% участников исследования при введении в высокой дозе, что соответствует частоте регистрации НР в группе добровольцев, получивших ИнВ ($p=0,37$ и $p=0,96$ соответственно). Наиболее распространенными НР в группе получивших препарат в низкой дозе являлись утомляемость (у 13% добровольцев), головная боль (8%) и лихорадка (6%). В числе НР, развившихся в группе добровольцев, получивших ИнВ, отсутствовали утомляемость и лихорадка; доля участников исследования с головной болью статистически значимо не отличалась от таковой в исследовании вакцины Ad5-nCoV (2,9% против 8%, $p=0,29$). Было отмечено наличие местных реакций на введение вакцины Ad5-nCoV в виде сухости во рту (4%) и отека глотки (4%),

что патогенетически соответствует назальным симптомам (заложенность носа (1,5%), ринорея (2,9%), чихание (1,5%), сухость слизистых оболочек дыхательных путей (1,5%) и иные нарушения со стороны слизистой оболочки носа (1,5%) и першение в горле (1,5%), зарегистрированным на фоне применения ИнВ [11]. В то же время наиболее распространенными НР в ходе КИ интраназальной вакцины ChAdOx1 (AstraZeneca, Великобритания) были боль в горле (52%), выделения из носа (45%), головная боль (48%) и утомляемость (48%) [12].

Для объективности следует отметить, что в указанных КИ ранних фаз информация о НР регистрировалась по данным активного опроса, с применением наводящих вопросов, что отличается от практики регистрации НР по мере поступления жалоб и данных обследования в настоящем исследовании III фазы.

Заключение

В ходе клинического исследования показан высокий уровень безопасности интраназальной вакцинации исследуемым препаратом интраназальной вакцины (Салнавак) с некоторым отличием профиля нежелательных реакций от наблюдаемого при применении внутримышечной формы вакцины (Гам-КОВИД-Вак). В группе с введением исследуемой интраназальной вакцины были зарегистрированы кратковременные общие и местные нежелательные реакции, характерные для вакцин, применяемых с целью профилактики коронавирусной инфекции. Частота и характер отмечаемых нежелательных реакций в целом соответствуют таковым при применении иных мукозальных вакцин. Требуется дальнейшее проведение клинического исследования с целью получения сравнительной информации о безопасности исследуемых режимов вакцинопрофилактики и оценкой отношения ожидаемой пользы к возможному риску.

Литература/References

1. Солдатов АА, Горенков ДВ, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Особенности и проблемы регистрации и применения препаратов для профилактики COVID-19 в период пандемии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):361–81.
Soldatov AA, Gorenkov DV, Merkulov VA, Bondarev VP. Aspects and issues of marketing authorisation and use of medicinal products for COVID-19 prevention during the pandemic. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):361–81 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-361-381>
2. Almeida AJ, Alpar HO. Nasal delivery of vaccines. *J Drug Target*. 1996;3(6):455–67.

²² Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Гам-КОВИД-Вак. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=e0733ef9-3857-441e-b1cc-4423e5bbe329

²³ Государственный реестр лекарственных средств. Реестр разрешенных клинических исследований. <https://grls.rosminzdrav.ru/>

- <https://doi.org/10.3109/10611869609015965>
3. Boyaka PN, Tafaro A, Fischer R, Leppla SH, Fujishashi K, McGhee JR. Effective mucosal immunity to anthrax: neutralizing antibodies and Th cell responses following nasal immunization with protective antigen. *J Immunol.* 2003;170(11):5636–43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5636>
 4. Kenigsberg TA, Hause AM, McNeil MM, Nelson JC, Shoup JA, Goddard K, et al. Dashboard development for near real-time visualization of COVID-19 vaccine safety surveillance data in the Vaccine Safety Data-link. *Vaccine.* 2022;40(22):3064–71. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.04.010>
 5. Dermody TS, DiMaio D, Enquist LW. Vaccine safety, efficacy, and trust take time. *Annu Rev Virol.* 2021;8(1):iii–iv. <https://doi.org/10.1146/annurev-vi-08-102220-100001>
 6. Ramvikas M, Arumugam M, Chakrabarti SR, Jagannathan KS. Nasal vaccine delivery. *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development.* 2017;279–301. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39981-4.00015-4>
 7. Morawska L, Buonanno G, Miskewski A, Stabile L. The physics of respiratory particle generation, fate in the air, and inhalation. *Nat Rev Phys.* 2022;4:723–34. <https://doi.org/10.1038/s42254-022-00506-7>
 8. Фитилев СБ, Возжаев АВ, Шкребнева ИИ, Ключев ДА, Вдовина АА, Мясникова ЛА. Значение референтных интервалов лабораторных показателей при проведении клинических исследований ранних фаз с участием здоровых добровольцев. *Качественная клиническая практика.* 2018;(2):64–72.
 9. Fraser R, Orta-Resendis A, Mazein A, Dockrell DH. Upper respiratory tract mucosal immunity for SARS-CoV-2 vaccines. *Trends Mol Med.* 2023;29(4):255–67. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2023.01.003>
 10. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet.* 2021;397(10275):671–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
 11. Li JX, Wu SP, Guo XL, Tang R, Huang BY, Chen XQ, et al. Safety and immunogenicity of heterologous boost immunisation with an orally administered aerosolised Ad5-nCoV after two-dose priming with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chinese adults: a randomised, open-label, single-centre trial. *Lancet Respir Med.* 2022;10(8):739–48. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(22\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(22)00087-X)
 12. Madhavan M, Ritchie AJ, Aboagye J, Jenkin D, Provstgaard-Morys S, Tarbet I, et al. Tolerability and immunogenicity of an intranasally-administered adenovirus-vectored COVID-19 vaccine: An open-label partially-randomised ascending dose phase I trial. *eBioMedicine.* 2022;85:104298. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104298>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Зуев** — разработка концепции, планирование и дизайн исследования, анализ или интерпретация результатов исследования, написание текста рукописи; **О.Л. Евдокимова** — организация производства и маркировки препарата, выбор средства доставки; **О.А. Маркова** — научное консультирование и руководство, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; **И.А. Короткевич** — статистическая обработка данных; **Т.В. Григорьева** — организация работы врачей, набора пациентов, операционное управление исследованием; **Р.А. Хамитов** — общее руководство исследованием, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации. Все авторы имели доступ к данным клинического исследования и одобрили окончательный вариант настоящей рукописи.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования одобрен Минздравом России (разрешение на проведение клинического исследования № 869 от 20.12.2021), Советом по этике Минздрава России (выписка из протокола № 295 заседания Совета по этике от 07.12.2021) и независимыми локальными этическими комитетами клинических центров. Исследование проводилось в соответствии с Правилами надлежащей клинической практики, требованиями

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Zuev** conceptualised, planned, and designed the study, analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **O.L. Evdokimova** organised the production and labelling of a medicinal product and selected the drug delivery method. **O.A. Markova** provided scientific advice and guidance, approved the final version of the manuscript for publication. **I.A. Korotkevich** conducted statistical analysis of data. **T.V. Grigorieva** coordinated the work of doctors and the recruitment of patients, provided operational management of the study. **R.A. Khamitov** provided general management of the study, approved the final version of the manuscript for publication. All the authors had access to the clinical trial data and the manuscript and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was approved by the Russian Ministry of Health (clinical trial authorisation No. 869 dated December 20, 2021), the Ethics Council of the Ministry of Health (meeting minutes No. 295 dated December 7, 2021), and the independent local ethics committees of the clinical centers involved. The study has been carried out according to the requirements of Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki of the World Medical Organisation. The Sponsor guarantees

Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Спонсор гарантирует, что публикация соответствует протоколу и другим документам исследования.

Согласие пациентов. Получено информированное добровольное согласие участников исследования на обработку персональных данных и их использование с научной и образовательной целью, в том числе на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме.

Благодарности. Исследование выполнено в сотрудничестве с исследователями: С.Б. Фитилев, А.С. Андреева, В.А. Дедкова, В.В. Евдокимов, С.А. Зенохов, А.М. Сергеев, Н.А. Еремина, А.С. Агафьина, И.И. Исакова, Т.Е. Морозова, Е.Н. Медуницына, А.Н. Грацианская.

that the publication corresponds to the protocol and other study documents.

Informed consent. The patients gave informed consent for the processing of their protected personal and health information, as well as for its use and anonymised publication for scientific and educational purposes.

Acknowledgements. The study was carried out in cooperation with investigators: S.B. Fitilev, A.S. Andreeva, V.A. Dedkova, V.V. Evdokimov, S.A. Zenokhov, A.M. Sergeenko, N.A. Eremina, A.S. Agafina, I.I. Isakova, T.E. Morozova, E.N. Medunitsyna, and A.N. Gratsianskaya.

Об авторах / Authors

Зуев Евгений Васильевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5519-8358>

evzuev@generium.ru

Евдокимова Ольга Львовна, канд. хим. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5347-3731>

evdokimova@ibcgenerium.ru

Маркова Оксана Анатольевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1179-3881>

oamarkova@generium.ru

Короткевич Илья Александрович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1872-419X>

iakorotkevich@generium.ru

Григорьева Таисия Викторовна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8658-7142>

tvgrigorieva@generium.ru

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

khamitov@ibcgenerium.ru

Evgeny V. Zuev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5519-8358>

evzuev@generium.ru

Olga L. Evdokimova, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5347-3731>

evdokimova@ibcgenerium.ru

Oksana A. Markova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1179-3881>

oamarkova@generium.ru

Ilya A. Korotkevich

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1872-419X>

iakorotkevich@generium.ru

Taisiya V. Grigorieva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8658-7142>

tvgrigorieva@generium.ru

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

khamitov@ibcgenerium.ru

Поступила 10.03.2023

После доработки 06.07.2023

Принята к публикации 07.06.2023

Received 10 March 2023

Revised 6 July 2023

Accepted 7 June 2023



Противовирусная активность лекарственного препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в отношении SARS-CoV-2 *in vitro*

Г.М. Игнатьев¹, Е.Ю. Шустова², Е.А. Рогожина^{3,✉}, П.А. Белый⁴, К.Я. Заславская⁵,
В.А. Меркулов⁶

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный переулок, д. 5а, Москва, 105064, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), поселение Московский, поселок Института полиомиелита, вл. 8, к. 1, Москва, 108819, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА — Российский технологический университет», просп. Вернадского, д. 78, Москва, 119454, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1, Москва, 127473, Российская Федерация

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», ул. Большевикская, д. 68, г. Саранск, 430005, Республика Мордовия, Российская Федерация

⁶ 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

✉ Рогожина Екатерина Алексеевна; e.kate.rogozhina@gmail.com

Резюме

Актуальность. Активация механизмов врожденного иммунитета на ранних фазах развития инфекции COVID-19 и, как следствие, последующая индукция продукции интерферонов может способствовать контролю репликации вируса и защите еще не инфицированных SARS-CoV-2 клеток. В связи с этим в качестве средств постконтактной профилактики и лечения COVID-19 на ранних этапах представляется перспективным применение иммуностимулирующих препаратов, вызывающих индукцию интерферонов, в том числе препаратов на основе двуспиральной РНК.

Цель. Оценка противовирусной активности лекарственного препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*.

Материалы и методы. Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (РАДАМИН®ВИРО). Эксперименты выполняли на культуре клеток Vero. В исследовании использовали вариант дельта вируса SARS-CoV-2 (B.1.617). Проводили оценку цитопатического действия вируса. Титр вируса рассчитывали как показатель тканевой цитопатической дозы, вызывающей гибель 50% клеток. Содержание интерферонов α и γ в культуральной жидкости определяли с помощью метода иммуноферментного анализа, вирусную

нагрузку — методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (по показателю Ct) и титр вируса — титрованием на культуре клеток Vero.

Результаты. Внесение препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в концентрациях 250 и 500 мкг/мл к клеткам линии Vero приводит к индукции секреции интерферонов α и γ , что повышает резистентность клеток к заражению вирусом SARS-CoV-2. Противовирусная активность исследуемого препарата, оцениваемая по значениям показателей титра вируса, вирусной нагрузки и уровня поражения клеточного монослоя, отмечается через 24 ч после его воздействия, что показывает способность препарата задерживать размножение вируса SARS-CoV-2 *in vitro* уже в течение первых суток после заражения.

Выводы. Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли индуцирует синтез интерферонов α и γ клетками линии Vero, повышая устойчивость клеток к заражению SARS-CoV-2 *in vitro*, что свидетельствует о иммуномодулирующем и противовирусном потенциале исследованного препарата.

Ключевые слова: РНК двуспиральной натриевой соли; SARS-CoV-2; COVID-19; противовирусная активность; интерферон α ; интерферон γ ; врожденный иммунитет; *in vitro*; клеточная линия Vero; РАДАМИН®ВИРО

Для цитирования: Игнатъев Г.М., Шустова Е.Ю., Рогожина Е.А., Белый П.А., Заславская К.Я., Меркулов В.А. Противовирусная активность лекарственного препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в отношении SARS-CoV-2 *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):290–299. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-290-299>

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. В.А. Меркулов (с 2021 г.) является главным редактором, Г.М. Игнатъев (с 2008 г.) — членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

In vitro antiviral activity of a double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product against SARS-CoV-2

Georgy M. Ignatyev¹, Elena Yu. Shustova², Ekaterina A. Rogozhina^{3,✉}, Peter A. Belyi⁴, Kira Ya. Zaslavskaya⁵, Vadim A. Merkulov⁶

¹ I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

² Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), 8/1 Village of the Institute of Poliomyelitis, Moskovsky settlement, Moscow 108819, Russian Federation

³ MIREA—Russian Technological University, 78 Vernadsky Ave, Moscow 119454, Russian Federation

⁴ A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1 Delegatskaya St., Moscow 127473, Russian Federation

⁵ National Research Ogarev Mordovia State University, 68 Bolshevistskaya St., Saransk 430005, Republic of Mordovia, Russian Federation

⁶ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Ekaterina A. Rogozhina; e.kate.rogozhina@gmail.com

Abstract

Scientific relevance. Innate immune activation in the early phases of COVID-19 infection and subsequent interferon induction may help control viral replication and protect cells not yet infected with SARS-CoV-2. Thus, immunostimulants that induce interferon (IFN), including double-stranded RNA-based agents, are a promising means of post-exposure prophylaxis and treatment of COVID-19 at early stages.

Aim. The study evaluated the *in vitro* antiviral activity of a double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product against SARS-CoV-2.

Materials and methods. The authors analysed the double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product RADAMIN®VIRO using Vero cells and the Delta variant of SARS-CoV-2 (B.1.617). The virus titre was calculated as the tissue cytopathic dose that caused 50% cell death. The authors measured the content of IFN- α and IFN- γ in the culture fluid by enzyme immunoassay and assessed the viral load by real-time polymerase chain reaction (using the cycle threshold value) and by titration (using Vero cells).

Results. The studied double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product at a concentration of 250 or 500 $\mu\text{g/mL}$ induced IFN- α and IFN- γ expression by Vero cells, thus increasing their resistance to SARS-CoV-2. The authors evaluated the antiviral activity of the medicinal product based on the virus titre, viral load, and cell monolayer damage. The antiviral activity became clear 24 h after treatment, which confirmed the ability of the medicinal product to inhibit the replication of the SARS-CoV-2 virus *in vitro* as early as the first day after infection.

Conclusions. The double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product induced IFN- α and IFN- γ synthesis in Vero cells, increasing their resistance to SARS-CoV-2 infection *in vitro*. These results demonstrate the immunomodulatory and antiviral potential of the medicinal product.

Key words: double-stranded RNA sodium salt; SARS-CoV-2; COVID-19; antiviral activity; interferon- α ; interferon- γ ; innate immunity; *in vitro*; Vero cells; RADAMIN®VIRO

For citation: Ignatyev G.M., Shustova E.Yu., Rogozhina E.A., Belyi P.A., Zaslavskaya K.Ya., Merkulov V.A. *In vitro* antiviral activity of a double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product against SARS-CoV-2. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):290–299. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-290-299>

Funding. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. V.A. Merkulov has been the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. G.M. Ignatyev has been a member of the Editorial Board of the journal since 2008. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Распространение коронавируса 2 типа, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2), возбудителя новой коронавирусной инфекции (novel coronavirus disease 2019, COVID-19), привело к объявлению Всемирной организацией здравоохранения 11.03.2020 пандемии [1]. SARS-CoV-2 является типичным одноцепочечным РНК-вирусом семейства *Coronaviridae* со значительной гомологией последовательностей с SARS-CoV (79%) и MERS-CoV (50%), двумя другими коронавирусами человека, появившимися в 2002 и 2012 гг. соответственно [2]. SARS-CoV-2 попадает в организм через дыхательные пути и взаимодействует в первую очередь с Toll-подобными рецепторами эпителиальных клеток бронхов, альвеол, кишечника и эндотелиоцитов сосудов, а также с рецепторами ангиотензинпревращающего фермента 2 типа [3]. Как правило, вирусы, микроорганизмы и продукты их распада вызы-

вают активацию системы врожденного иммунитета [4], однако SARS-CoV-2 нарушает презентацию вирусных антигенов путем подавления процесса распознавания антигенов, представленных в контексте молекул МНС класса I и II, и, следовательно, ингибирует опосредованные Т-клетками иммунные ответы [5]. Активация механизмов врожденного иммунитета, связанных с системой паттерн-распознающих рецепторов, на ранних фазах развития инфекции COVID-19 и, как следствие, последующая индукция продукции интерферонов (ИФН) могут способствовать контролю репликации вируса и защите еще не инфицированных SARS-CoV-2 клеток [6]. В связи с этим в качестве средств постконтактной профилактики и лечения COVID-19 на ранних этапах представляется перспективным применение иммуностимулирующих препаратов, способствующих индукции ИФН.

Одним из таких препаратов является Ampligen® (Hemispherx Biopharma, США) на основе двуспи-

ральной РНК, который продемонстрировал положительные результаты при экспериментальной инфекции SARS-CoV-2 у мышей [7, 8], а также в клинических исследованиях при профилактике гриппа [9], лечении вирусного гепатита С [10] и СПИДа [11], профилактике COVID-19 у пациентов с раком поджелудочной железы [12].

В Российской Федерации зарегистрирован препарат РАДАМИН®ВИРО (АО «Биохимик», Россия)¹, содержащий в качестве активного вещества двуспиральную РНК. Действующим веществом препарата является рибонуклеиновой кислоты двуспиральной натриевая соль, которая индуцирует продукцию ИФН I типа (ИФН- α , ИФН- β) и ИФН II типа (ИФН- γ), способствующих подавлению репродукции вирусов на внутриклеточном уровне; стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, активирует Т-лимфоциты и естественные киллерные клетки; нормализует баланс между субпопуляциями Т-хелперов и Т-супрессоров [13, 14].

Активность системы интерферонов направлена на распознавание и элиминацию чужеродной генетической информации, в том числе вирусного происхождения: интерфероны подавляют репродукцию вирусов за счет блокирования синтеза вирусспецифических белков на начальном этапе трансляции. Механизм действия ИФН опосредован через индукцию синтеза протеинкиназы R (PKR), которая фосфорилирует фактор инициации трансляции (eIF-2). Таким образом, активность системы интерферонов способствует защите здоровых клеток на ранней стадии вирусной инфекции [13]. Эффективность препаратов ИФН при лечении коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, была продемонстрирована ранее в исследованиях *in vitro* с использованием клеточной линии Vero [15–17]. Показано, что препараты ИФН- α , ИФН- β , ИФН- γ или их комбинации проявляют противовирусную активность *in vitro* [15–18].

Цель работы – оценка противовирусной активности лекарственного препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*.

Материалы и методы

Материалы

Вирус. В экспериментах использовали вариант дельта вируса SARS-CoV-2 (B.1.617), который был выделен из назофарингеального мазка пациен-

та с COVID-19 с использованием культуры клеток Vero (предоставлен ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»). Штамм прошел три последовательных пассажа на культуре клеток Vero. Размножение вируса на клетках Vero сопровождалось цитопатическим действием (ЦПД). Перед проведением эксперимента был определен титр вируса. Для титрования в лунки 96-луночных планшетов со сформированным монослоем клеток Vero вносили десятикратные разведения вирусосодержащей суспензии в восьми повторностях. Результат титрования учитывали с использованием светового микроскопа на 5 сут после заражения по уровню ЦПД. Титр вируса рассчитывали как показатель тканевой цитопатической дозы, вызывающей гибель 50% клеток ($TCID_{50}$), по формуле Кербера и выражали в $Ig\ TCID_{50}/мл$ [19]. Средний титр рассчитывали по результатам трех независимых экспериментов. Перед проведением эксперимента готовили рабочее разведение вируса – $0,0001\ TCID_{50}$ на клетку.

Культура клеток. В исследовании использовали клетки линии Vero (клетки почки зеленой мартышки), предоставленные ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». В лунки планшетов (Costar, США) вносили клетки в концентрации 2×10^5 кл/мл (объем среды, содержащей клетки, на лунку составлял: для 24-луночного планшета – 1 мл, для 96-луночного планшета – 100 мкл). Клетки культивировали в среде Игла MEM со стабильным глутамином (аланил-глутамином) и двойным набором аминокислот (ООО «БиолоТ», Россия) при 37 °C и 5% CO_2 . На 2 сут после формирования монослоя перед постановкой эксперимента определяли содержание клеток в лунках планшетов. Количество клеток в лунках 96-луночного планшета составило $95,2 \pm 8,4$ тыс. клеток, а в лунках 24-луночных планшетов – $812,4 \pm 31,4$ тыс. клеток. Исходя из концентрации клеток рассчитывали концентрацию вируса, обеспечивающую дозу заражения $0,0001\ TCID_{50}$ на клетку.

Исследуемый препарат. РАДАМИН®ВИРО, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения, 5 мг (предоставлен АО «Биохимик», Россия). Активное вещество препарата – РНК двуспиральной натриевая соль, экстрагированная из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

¹ Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата РАДАМИН®ВИРО, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения. <https://gls.rosminzdrav.ru>



Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Электрофореграмма исследуемого образца препарата РНК двуспиральной натриевой соли. Левая дорожка — маркер молекулярной массы; правая дорожка — образец исследуемого препарата.

Fig. 1. Electrophoregram of a test sample of the double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product. The left lane is a molecular weight marker; the right lane is the test sample.

Для проведения исследования противовирусной активности исследуемый препарат разводили культуральной средой до концентрации 500 и 250 мкг/мл.

Изучение молекулярно-массового распределения активного вещества исследуемого препарата проводили с использованием электрофоретического разделения в 1% агарозном геле в буферном растворе (10 мМ трис(гидроксиметил)аминометана, 10 мМ борной кислоты, 0,25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, pH 8,0±0,2) при температуре 23±2 °С, силе тока 10 мА в течение 1 ч. Гель окрашивали 0,0003% раствором бромистого этидия. Для идентификации молекулярных масс использовали маркер, содержащий фрагменты: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 п.н. (Sky-High, Биоллабмикс, Россия). Результаты электрофореза представлены на рисунке 1.

Методы

Дизайн исследования. Клетки линии Vero высевали в лунки 24- и 96-луночных планшетов в концентрации 2×10^5 кл/мл и культивировали при 37 °С и 5% CO₂. На 2 сут культивирования определяли среднее количество клеток в лунке для расчета концентрации вируса на клетку (как описано в подразделе «Культура клеток» раздела «Материалы и методы»). Культуральную жидкость удаляли из лунок (в дальнейшем использовалась как отрицательный контроль). Далее в два ряда лунок каждого планшета вносили среду, в остальные лунки вносили исследуемый препарат в двух концентрациях — 250 и 500 мкг/мл. Планшеты помещали в термостат с температурой 37 °С и содержанием

5% CO₂. Через 4 ч проводили отбор образцов для определения концентрации ИФН (ИФН-α и ИФН-γ). Далее в опытные лунки вносили вирус в разведении, обеспечивающем дозу заражения 0,0001 ТЦД₅₀ на клетку (кроме контрольных лунок: контроль 1 — без внесения препарата и вируса, контроль 2 — с препаратом без внесения вируса). Далее планшеты инкубировали в термостате при 37 °С и 5% CO₂ в течение 72 ч.

96-луночные планшеты использовали для оценки ЦПД вируса в присутствии исследуемого препарата, 24-луночные планшеты — для оценки ЦПД вируса, отбора образцов для определения вирусной нагрузки методом ПЦР (по показателю Ct) в реальном времени, титрования на культуре клеток и определения концентрации ИФН. Отбор образцов и микроскопическую оценку состояния клеточного монослоя проводили каждые 24 ч от начала эксперимента до 3 сут. Отобранные образцы замораживали при минус 70 °С до проведения анализа. Определение концентрации ИФН (ИФН-α и ИФН-γ), титра вируса и вирусной нагрузки проводили одновременно в следующих образцах: культуральная среда; раствор исследуемого препарата в концентрациях 250 и 500 мкг/мл; культуральная жидкость, полученная при культивировании клеток линии Vero через 4, 24 и 48 ч (отрицательный контроль); культуральная жидкость клеток линии Vero после заражения вирусом SARS-CoV-2 через 24 и 48 ч; культуральная жидкость, полученная при культивировании клеток линии Vero с внесенным препаратом в концентрациях 250 и 500 мкг/мл через 4, 24 и 48 ч; культуральная жидкость, полученная при культивировании клеток линии Vero с исследуемым препаратом в концентрациях 250 и 500 мкг/мл после заражения вирусом SARS-CoV-2 через 4, 24 и 48 ч. Дополнительно вирусную нагрузку (по показателю Ct) и титр вируса определяли в образце вируса, использованном для заражения клеток. На стадии заражения титр вируса составлял $1,84 \pm 0,12 \lg \text{ТЦД}_{50}$, вирусная нагрузка (показатель Ct) — $30,3 \pm 0,4$. По показателям вирусной нагрузки и титра вируса оценивали уровень подавления репликации вируса в присутствии исследуемого препарата.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Для выделения РНК в исследованных образцах применяли реагент РНК-ЭКСПРЕСС (ООО НПФ «Литех», Россия). Для определения вирусной нагрузки использовался набор ПОЛИВИР SARS-CoV-2 (ООО НПФ «Литех», Россия) для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР с обратной транскрипцией с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Реакцию проводили согласно инструкции производителя с определением величины порогового цикла амплификации (Ct) с детекцией по каналам флуоресценции: FAM — анализ фрагмента генома SARS-CoV-2, HEX — анализ фрагмента генома сарбековирсов.

Определение концентрации ИФН-α и ИФН-γ методом иммуноферментного анализа. Концентрацию ИФН определяли с использованием набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации гамма-интерферона в сыворотке крови «Гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ» (А-8752, АО «Вектор-Бест», Россия) с чувствительностью 2,0 пг/мл; набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации альфа-интерферона в сыворотке крови «Альфа-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ» (А-8758, АО «Вектор-Бест», Россия) с чувствительностью 5,0 пг/мл.

При работе с клетками Vero для оценки уровня содержания ИФН в культуральной жидкости допустимо использовать наборы для иммуноферментного анализа концентрации цитокинов человека (ИЛ-1β, ИЛ-6, ИФН-α и др.), что связано с высокой степенью гомологии последовательностей аминокислот цитокинов человека и обезьян, которая составляет от 95,9 до 98,1% [20]. Возможность использования наборов для иммуноферментного анализа цитокинов человека при определении концентрации цитокинов обезьян показана ранее в ряде исследований [20–22].

Результаты и обсуждение

Оценка влияния препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли на цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 на клетках линии Vero

Анализ результатов исследования показал, что ЦПД вируса SARS-CoV-2 (при дозе заражения 0,0001 ТЦД₅₀ на клетку) на клетки линии Vero отмечалось уже через 24 ч после заражения (табл. 1). Продemonстрировано, что препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли при однократном использовании обладал выраженной противовирусной активностью.

Следует отметить, что исследуемый препарат в обеих концентрациях не оказывал токсического действия на клетки — нарушения монослоя клеток Vero после внесения препарата не происходило (табл. 1). При этом вирус SARS-CoV-2 оказывал цитопатический эффект на клетки: через 24 ч после заражения отмечалось 40% поражения клеточного монослоя, к 72 ч монослой клеток был полностью разрушен.

При внесении препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в концентрациях 250 и 500 мкг/мл к клеткам Vero нарушение монослоя через 24 ч после заражения SARS-CoV-2 было менее выражено, чем в контроле (табл. 1). Через 48 ч защитный эффект исследуемого препарата в обеих концентрациях также сохранялся, что свидетельствует о его длительном противовирусном эффекте. При использовании препарата в концентрации 500 мкг/мл противовирусная активность препарата сохранялась до 72 ч.

Оценка влияния препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли на уровень секреции интерферонов α и γ клетками линии Vero

Продemonстрировано, что внесение исследуемого препарата к клеткам линии Vero вызывает индукцию секреции ИФН-α или ИФН-γ (табл. 2). Следует отметить, что в контрольных образцах (образцы культуральной среды; образцы исследуемого препарата; образцы культуральной жидкости, полученные при культивировании не обработанных препаратом клеток Vero; образцы культуральной жидкости, полученные при культивировании клеток Vero, зараженных вирусом SARS-CoV-2) содержания ИФН не выявлено.

Обработка клеток линии Vero препаратом на основе РНК двуспиральной натриевой соли в концентрации 500 мкг/мл (табл. 2) приводит к индукции секреции ИФН-α уже через 4 ч; к 48 ч уровень секреции увеличивался до 12 пг/мл. Уровень секреции ИФН-α при обработке клеток препаратом в концентрации 250 мкг/мл был ниже — через 48 ч уровень секреции составлял 8 пг/мл. Секреция ИФН-γ детектировалась только через 24 ч после индукции препаратом в обеих концентрациях.

Инфицирование клеток Vero вирусом SARS-CoV-2 не вызывало индукции секреции ИФН-α и ИФН-γ. При этом в образцах культуральной жидкости, полученных от клеток, обработанных препаратом и зараженных SARS-CoV-2 (табл. 2), выявлен более высокий уровень концентрации ИФН-α через 24 ч после заражения, чем в случае неинфицированных клеток. Через 48 ч концентрация ИФН-α в образцах достоверно снижалась ($p < 0,01$). Следует отметить важность полученных данных об индукции исследуемым препаратом секреции ИФН-α с точки зрения повышения резистентности клеток, еще не инфицированных вирусом, к возможному воздействию.

В образцах культуральной жидкости, полученных от клеток, обработанных препаратом на основе РНК двуспиральной натриевой

Таблица 1. Оценка влияния препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли на цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 (B.1.617) на клетки линии Vero

Table 1. Evaluation of the effect of the double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product on the SARS-CoV-2 (B.1.617) cytopathic effect on Vero cells

Образцы <i>Samples</i>	Процент поражения клеточного монослоя после заражения клеток вирусом через <i>Post-infection cell monolayer damage (%) in</i>		
	24 ч <i>24 h</i>	48 ч <i>48 h</i>	72 ч <i>72 h</i>
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (250 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (250 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>	20	40	100
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (500 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (500 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>	10	30	80
Контроль <i>Control</i>			
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (250 мкг/мл) <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (250 µg/mL)</i>	0	0	0
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (500 мкг/мл) <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (500 µg/mL)</i>	0	0	0
SARS-CoV-2 (контроль инфицирующей дозы) <i>SARS-CoV-2 (infective dose control)</i>	40	50	100

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 2. Оценка концентрации интерферонов (ИФН-α и ИФН-γ) в образцах культуральной жидкости клеток линии Vero после внесения образцов препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли

Table 2. Concentrations of interferons, IFN-α and IFN-γ, in the culture fluid of Vero cells after introduction of the double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product

Образцы <i>Samples</i>	Концентрация ИФН-α/ИФН-γ (пг/мл), определенная после заражения клеток вирусом через <i>Post-infection IFN-α/IFN-γ concentrations (pg/mL) in</i>		
	4 ч <i>4 h</i>	24 ч <i>24 h</i>	48 ч <i>48 h</i>
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (250 мкг/мл) <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (250 µg/mL)</i>	0/0	5/4	8/0
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (500 мкг/мл) <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (500 µg/mL)</i>	4/0	8/4	12/0
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (250 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (250 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>	–	20/0	2/2
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (500 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (500 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>	–	18/4	4/4
SARS-CoV-2 (контроль инфицирующей дозы) <i>SARS-CoV-2 (infective dose control)</i>	–	0/0	0/0

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «–» — не определялось.

Note. –, not determined.

соли в концентрации 500 мкг/мл и зараженных SARS-CoV-2, через 24 и 48 ч наблюдается секреция ИФН-γ, что имеет большое значение, учитывая иммуномодулирующее действие [18] и спо-

собность данного типа ИФН непосредственно ингибировать репликацию вируса.

Следует отметить, что в научной литературе представлены данные о применении ИФН *in vitro*

на модели заражения вирусом SARS-CoV-2, где продемонстрирован определенный положительный эффект [15–17]. Учитывая имеющиеся данные о роли SARS-CoV-2 в нарушении интерфероновой реакции клеток [6], что вносит существенный вклад в дальнейшее развитие цитокинового шторма, регуляция иммунного ответа на начальных стадиях заболевания иммуномодулирующими препаратами, в том числе препаратами на основе РНК двуспиральной натриевой соли, может способствовать снижению риска развития отягощенного течения коронавирусной инфекции.

Оценка противовирусного действия препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли по показателям вирусной нагрузки и титра вируса

Поскольку через 72 ч эксперимента нарушение монослоя клеток линии Vero составляло более 50% в случае заражения вирусом SARS-CoV-2 вне зависимости от факта использования исследуемого препарата, в связи с чем корректно оценить вирусную нагрузку не представлялось возможным, определение противовирусного действия проводили по оценке изменения концентрации вируса, использованного для заражения. На стадии заражения клеток титр вируса составлял $1,84 \pm 0,12 \lg \text{TCID}_{50}$, вирусная нагрузка (показатель Ct) — $30,3 \pm 0,4$.

Через 24 ч после заражения клеток в контроле (табл. 3) титр вируса и вирусная нагрузка досто-

верно превосходили показатели до заражения ($p < 0,05$). Спустя 24 ч после обработки исследуемым препаратом в концентрациях 250 мкг/мл или 500 мкг/мл клеток линии Vero, инфицированных SARS-CoV-2 (B.1.617), оцениваемые показатели достоверно не отличались от таковых на стадии заражения клеток. Через 48 ч показатели активности вируса (титр вируса и вирусная нагрузка) во всех образцах достоверно превосходили исходные показатели ($p < 0,001$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что обработка клеток исследуемым препаратом препятствует репликации SARS-CoV-2 в течение первых 24 ч после применения.

Заключение

Обработка клеток линии Vero препаратом на основе РНК двуспиральной натриевой соли (РАДАМИН®ВИРО) в концентрациях 250 и 500 мкг/мл приводит к индукции секреции интерферонов α и γ , что повышает резистентность клеток к заражению вирусом SARS-CoV-2. Эффект снижения показателей репликации вируса (по значениям показателей титра вируса, вирусной нагрузки и уровня поражения клеточного монолоя) отмечается через 24 ч после воздействия исследуемого препарата, что доказывает его способность задерживать размножение вируса SARS-CoV-2 *in vitro* уже в течение первых суток после заражения. Полученные данные свидетельствуют о противовирусном и иммуномодулирующем действии исследуемого препарата *in vitro*.

Таблица 3. Противовирусная активность препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли, оцениваемая по показателям вирусной нагрузки и титра вируса на культуре клеток линии Vero, инфицированных SARS-CoV-2 (B.1.617)

Table 3. Antiviral activity of the double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product, as assessed by viral load and virus titre in the Vero cell culture infected with SARS-CoV-2 (B.1.617)

Время после заражения клеток вирусом <i>Post-infection period</i>	Показатели в образцах <i>Measures in samples</i>					
	Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (250 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (250 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>		Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (500 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (500 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>		SARS-CoV-2 (контроль) <i>SARS-CoV-2 (control)</i>	
	Ct	Титр вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ <i>Virus titre, $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$</i>	Ct	Титр вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ <i>Virus titre, $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$</i>	Ct	Титр вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ <i>Virus titre, $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$</i>
24 ч <i>24 h</i>	27,29±0,68	1,98±0,20	29,28±0,92	1,90±0,20	23,78±0,57	2,40±0,20
48 ч <i>48 h</i>	21,02±0,70	3,30±0,30	22,45±1,06	2,70±0,20	21,54±1,44	3,20±0,20

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Ct — величина порогового цикла амплификации; TCID_{50} — тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток.

Note. Ct, threshold cycle value; TCID_{50} , tissue culture infective dose causing 50% cell death.

Литература/References

- Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed*. 2020;91(1):157–60. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397>
- Seyedpour S, Khodaei B, Loghman AH, Seyedpour N, Kisomi MF, Balibegloo M, et al. Targeted therapy strategies against SARS-CoV-2, cell entry mechanisms: A systematic review of *in vitro* and *in vivo* studies. *J Cell Physiol*. 2020;236(4):2364–92. <https://doi.org/10.1002/jcp.30032>
- Болевич СБ, Болевич СС. Комплексный механизм развития COVID-19. *Сеченовский вестник*. 2020;11(2):50–61. Bolevich SB, Bolevich SS. Complex mechanism of COVID-19 development. *Sechenov Medical Journal*. 2020;11(2):50–61. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2020.11.2.50-61>
- Andreev-Andrievskiy AA, Zinovkin RA, Mashkin MA, Frolova OY, Kazaishvili YG, Scherbakova VS, et al. Gene expression pattern of Peyer's patch lymphocytes exposed to kagocel suggests pattern-recognition receptors mediate its action. *Front Pharmacol*. 2021;12:679511. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.679511>
- Gu W, Gan H, Ma Y, Xu L, Cheng J, Li B, et al. The molecular mechanism of SARS-CoV-2 evading host antiviral innate immunity. *Virol J*. 2022;19(1):49. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01783-5>
- Костинов МП, Маркелова ЕВ, Свитич ОА, Полищук ВБ. Иммунные механизмы SARS-CoV-2 и потенциальные препараты для профилактики и лечения COVID-19. *Пульмонология*. 2020;30(5):700–8. Kostinov MP, Markelova EV, Svitich OA, Polishchuk VB Immunological methods of SARS-CoV-2 and potential drugs for the prevention and treatment of COVID-19. *Pulmonology*. 2020;30(5):700–8. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2020-30-5-700-708>
- Barnard DL, Day CW, Bailey K, Heiner M, Montgomery R, Lauridsen L, et al. Evaluation of immunomodulators, interferons and known *in vitro* SARS-CoV inhibitors for inhibition of SARS-CoV replication in BALB/c mice. *Antivir Chem Chemother*. 2006;17(5):275–84. <https://doi.org/10.1177/095632020601700505>
- Day CW, Baric R, Cai SX, Frieman M, Kumaki Y, Morrey JD, et al. A new mouse-adapted strain of SARS-CoV as a lethal model for evaluating antiviral agents *in vitro* and *in vivo*. *Virology*. 2009;395(2):210–22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.023>
- Overton ET, Goepfert PA, Cunningham P, Carter WA, Horvath J, Young D, Strayer DR. Intranasal seasonal influenza vaccine and a TLR-3 agonist, rintatolimod, induced cross-reactive IgA antibody formation against avian H5N1 and H7N9 influenza HA in humans. *Vaccine*. 2014;32(42):5490–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.078>
- Kozlowski A, Charles SA, Harris JM. Development of pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C. *BioDrugs*. 2001;15(7):419–29. <https://doi.org/10.2165/00063030-200115070-00001>
- Nicodemus CF, Berek JS. TLR3 agonists as immunotherapeutic agents. *Immunotherapy*. 2010;2(2):137–40. <https://doi.org/10.2217/imt.10.8>
- Mustafa DAM, Saida L, Latifi D, Wismans LV, de Koning W, Zenedpour L. Rintatolimod induces antiviral activities in human pancreatic cancer cells: opening for an anti-COVID-19 opportunity in cancer patients. *Cancers (Basel)*. 2021;13(2):2896. <https://doi.org/10.3390/cancers13122896>
- Ершов ФИ, Киселев ОИ. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005. Ershov FI, Kiselev OI. *Interferons and their inductors (from molecules to drugs)*. Moscow: GEOTAR-Media; 2005 (In Russ.).
- Kozlovskaya L, Piniaeva A, Ignatyev G, Selivanov A, Shishova A, Kovpak A, et al. Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis*. 2020;99:40–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.024>
- lanevski A, Yao R, Zusinaite E, Lello LS, Wang S, Jo E, et al. Synergistic interferon-alpha-based combinations for treatment of Sars-Cov-2 and other viral infections. *Viruses*. 2021;13(12):2489. <https://doi.org/10.3390/v13122489>
- Sallard E, Lescure FX, Yazdanpanah Y, Mentre F, Peiffer-Smadja N. Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Res*. 2020;178:104791. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104791>
- Ribero MS, Jouvenet N, Dreux M, Nisole S. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathog*. 2020;16(7):e1008737. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008737>
- Todorović-Raković N, Whitfield JR. Between immunomodulation and immunotolerance: The role of IFN γ in SARS-CoV-2 disease. *Cytokine*. 2021;146:155637. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155637>
- Karber G. Beitrag zur kollektiven behandlungpharmakologischer reihenversuche. *Arch Exptl Pathol Pharmacol*. 1931;162:480–3.
- Villinger F, Brar SS, Mayne A, Chikkala N, Ansari AA. Comparative sequence analysis of cytokine genes from human and nonhuman primates. *J Immunol*. 1995;155:3946–54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.155.8.3946>
- Felger JS, Alagbe O, Hu F, Mook D, Freeman AA, Sanchez MM, et al. Effects of interferon-alpha on rhesus monkeys: a non-human primate model of cytokine-induced depression. *Biol Psychiatry*. 2007;62(11):1324–33. <https://doi.org/10.1016%2Fj.biopsych.2007.05.026>
- Willette AA, Lubach GR, Coe CL. Environmental context differentially affects behavioral, leukocyte, cortisol, and interleukin-6 responses to low doses of endotoxin in the rhesus monkey. *Brain Behav Immun*. 2007;21(6):807–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.01.007>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Г.М. Игнатьев** — разработка дизайна исследования, проведение эксперимента, обработка полученных результатов, написание текста рукописи; **Е.Ю. Шустова** — проведение исследования, обработка полученных результатов; **Е.А. Рогожина** — обсуждение дизайна и результатов исследования, написание текста рукописи; **П.А. Белый** — формулирование идеи исследования, обсуждение результатов; **К.Я. Заславская** — разработка дизайна исследования, обсуждение полученных результатов, написание текста рукописи; **В.А. Меркулов** — обсуждение дизайна и результатов исследования.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **G.M. Ignatyev** developed the study design, conducted experiments, processed the study results, and drafted the manuscript. **E.Yu. Shustova** conducted experiments and processed the study results. **E.A. Rogozhina** discussed the design and results of the study and drafted the manuscript. **P.A. Belyi** formulated the study idea and discussed the study results. **K.Ya. Zaslavskaya** elaborated the study design, discussed the study results, and drafted the manuscript. **V.A. Merkulov** discussed the study design and results.

Об авторах / Authors

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

marburgman@mail.ru

Шустова Елена Юрьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1314-0152>

Рогожина Екатерина Алексеевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3325-2605>

e.kate.rogozhina@gmail.com

Белый Петр Александрович, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5998-4874>

pbely@ncpharm.ru

Заславская Кира Яковлевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7348-9412>

kiryonok@yandex.ru

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

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

Merkulov@expmed.ru

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

marburgman@mail.ru

Elena Yu. Shustova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1314-0152>

Ekaterina A. Rogozhina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3325-2605>

e.kate.rogozhina@gmail.com

Peter A. Belyi, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5998-4874>

pbely@ncpharm.ru

Kira Ya. Zaslavskaya

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7348-9412>

kiryonok@yandex.ru

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

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

Merkulov@expmed.ru

Поступила 03.08.2022

После доработки 22.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 3 August 2022

Revised 22 August 2023

Accepted 13 September 2023



Изучение возможности применения математических методов анализа для оценки специфической активности антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в препаратах иммуноглобулинов человека

Е.Л. Постнова[✉], А.А. Мовсисянц

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

✉ Постнова Евгения Леонидовна; postnova@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Препараты иммуноглобулинов человека, содержащие в составе антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg), являются средством экстренной профилактики гепатита В у взрослых и детей и применяются для лечения легких и среднетяжелых форм острого вирусного гепатита В. Клиническая эффективность таких препаратов определяется специфической активностью, оцениваемой по содержанию антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (anti-HBs антитела), которую в настоящее время определяют с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА).

Цель. Анализ различных математических методов оценки экспериментальных данных, полученных с применением ИФА, для определения активности антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в препаратах иммуноглобулинов человека.

Материалы и методы. В работе использовали международный стандартный образец иммуноглобулина человека, содержащий anti-HBs антитела; препараты иммуноглобулинов; набор реагентов для иммуноферментного качественного и количественного определения антител к HBsAg в сыворотке (плазме) крови.

Результаты. С использованием сэндвич-варианта ИФА установлена зависимость получаемого результата определения концентрации anti-HBs антител от выбора способа построения калибровочного графика («ручной» подход, метод параллельных линий с использованием программы «PARALINE», метод линейной регрессии, 4-параметрическая логистическая модель). Разброс полученных значений концентрации anti-HBs антител составил ± 19 МЕ/мл от среднего значения. Установлено, что неверно подобранный метод обработки данных может приводить к ошибочным расчетам значений активности (концентрации) анализируемого вещества в испытуемом образце.

Выводы. Показана необходимость совершенствования математических методов оценки экспериментальных данных, используемых для определения концентрации anti-HBs антител в препаратах иммуноглобулинов человека, и важность перехода от «ручного» к автоматизированному обсчету получаемых результатов (например, с использованием 4-параметрической логистической модели) в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методам испытаний, и с учетом возможностей современного оборудования.

Ключевые слова: препарат иммуноглобулина человека; антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В; anti-HBs антитела; специфическая активность; иммуноферментный анализ; ИФА; математические методы оценки ИФА

Для цитирования: Постнова Е.Л., Мовсесянц А.А. Изучение возможности применения математических методов анализа для оценки специфической активности антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в препаратах иммуноглобулинов человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):300–309. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-300-309>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. А.А. Мовсесянц — член редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2001 г. Е.Л. Постнова заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Possibility of using mathematical analysis methods to evaluate the potency of antibodies to hepatitis B virus surface antigen in human immunoglobulin preparations

Evgeniya L. Postnova ✉, Artashes A. Movsesyants

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

✉ Evgeniya L. Postnova; postnova@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. Anti-hepatitis B virus surface-antigen (HBsAg) immunoglobulins are used to prevent hepatitis B in adults and children after exposure and to treat mild to moderate acute viral hepatitis B. The clinical effectiveness of human immunoglobulin preparations is determined by their potency, which is assessed by the content of antibodies to hepatitis B virus surface antigen (anti-HBs antibodies). Currently, this assessment involves using immunoassay techniques, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Aim. This study examined several mathematical methods for analysing the experimental data obtained in ELISA-based anti-HBs antibody potency assays of human immunoglobulin preparations.

Materials and methods. This study used the international standard for human anti-HBs immunoglobulin, two immunoglobulin preparations, and an ELISA test kit for the detection and quantification of anti-HBs antibodies in serum or plasma samples.

Results. Using sandwich ELISA, the authors ascertained that the measured anti-HBs antibody concentration depended on the choice of calibration curve calculation method (i.e. manual analysis, parallel-line analysis using PARALINE software, linear regression, and 4-parameter logistic regression). The measured anti-HBs antibody concentrations varied by ± 19 IU/mL. According to the study results, an incorrectly selected method of data analysis can lead to an erroneous calculation of the analyte potency (concentration) in the test sample.

Conclusions. The study demonstrated the need for improved mathematical methods for the evaluation of experimental data used to determine the anti-HBs antibody concentration in human immunoglobulin preparations. It is essential to switch from manual to automated calculation (for example, using a 4-parameter logistic model), taking into account the requirements for bioanalytical methods and the capabilities of the available equipment.

Key words: human immunoglobulin preparation; antibodies to hepatitis B virus surface antigen; anti-HBs antibodies; potency; enzyme immunoassay; ELISA; mathematical methods for ELISA data analysis

For citation: Postnova E.L., Movsesyants A.A. Possibility of using mathematical analysis methods to evaluate the potency of antibodies to hepatitis B virus surface antigen in human immunoglobulin preparations. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):300–309. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-300-309>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 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 has been a member of the Editorial Board of the journal since 2001. E.L. Postnova declares no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Вирусные гепатиты представляют серьезную угрозу для общественного здоровья во всем мире. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в европейском регионе от причин, связанных с вирусными гепатитами, ежегодно умирают около 171 тыс. человек, и смертность в основном вызвана отдаленными последствиями хронических гепатитов В и С. По данным ВОЗ число лиц, живущих с хронической инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (ВГВ), составляет более 14 млн человек в Европейском регионе¹. Распространенность хронической инфекции ВГВ широко варьирует: от высокой ($\geq 8\%$, например в Африке, Азии и западной части Тихого океана) до средней (2–7%, например в Южной и Восточной Европе) и низкой ($< 2\%$, например в Западной Европе, Северной Америке и Австралии). Преобладающие пути передачи различаются в зависимости от эндемичности инфекции ВГВ. В регионах с высокой эндемичностью основной путь передачи инфекции перинатальный, тогда как в регионах с низкой эндемичностью преобладающим путем являются половые контакты среди взрослых из группы высокого риска. Считается, что у 25–30% лиц, хронически инфицированных ВГВ, формируется прогрессирующее заболевание печени, включая цирроз и первичный рак печени. Хотя внедрение программ массовой вакцинации позволяет контролировать распространение инфекции ВГВ, основным вариантом лечения для лиц с установленным хроническим заболеванием печени, связанным с ВГВ-инфекцией, является терапевтическое вмешательство. [1].

Препараты иммуноглобулинов человека, содержащие антитела к поверхностному антигену ВГВ (hepatitis B surface antigen, HBsAg), являются лекарственными средствами², показанными для экстренной профилактики гепатита В у взрослых и детей, для лечения легких и среднетяжелых форм острого вирусного гепатита В у взрослых, а также для внутривенного введения при необходимости проведения иммунопрофилактики гепатита В у различных групп населения, в отношении которых имеются подозрения на инфицирование.

Клиническая эффективность препаратов иммуноглобулинов человека определяется специфической активностью, оцениваемой по количественному содержанию антител к HBsAg (anti-HBs антитела). Содержание антител в большинстве случаев определяют с использованием сэндвич-варианта иммуноферментного анализа (сэндвич-ИФА) [2, 3].

Метод ИФА считается одним из наиболее простых в применении, однако ряд биологических и физико-химических факторов может существенно влиять на характер получаемых данных и обуславливать определенные ограничения на применимость подходов к математической обработке результатов [4]. Сэндвич-ИФА используется для определения крупных антигенов, содержащих, по крайней мере, две антигенные детерминанты. При отсутствии лимитирующих факторов в рабочем диапазоне определяемых концентраций должна существовать прямая линейная зависимость между величиной сигнала и концентрацией аналита в пробе. Однако из-за ограниченных количеств антител, сорбированных на твердой фазе, антител, конъюгированных с ферментом, субстрата ферментативной реакции, а также из-за ограниченного рабочего диапазона спектрофотометра реальные калибровочные кривые сэндвич-ИФА могут иметь в разной степени искаженный вид. Зависимость величины регистрируемого сигнала от концентрации аналита при проведении ИФА практически всегда имеет в той или иной степени нелинейный характер [4].

ИФА часто используют с целью определения специфической активности лекарственных средств. Для этого на основании значений оптических плотностей калибровочных проб определяют концентрации аналитов и строят калибровочную кривую, с использованием которой затем и проводят необходимые расчеты. Неверное использование методов математической обработки получаемых данных может привести к ошибочным результатам. В представленной работе проиллюстрирована зависимость получаемого результата определения концентрации anti-HBs антител от выбора того или иного способа построения калибровочного графика

¹ <https://www.who.int/europe/publications/m/item/hepatitis-b-in-the-who-european-region-factsheet-july-2022>

² Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

на основе оптических плотностей калибровочных проб.

Цель работы — анализ различных математических методов оценки экспериментальных данных, полученных с применением ИФА, для определения активности anti-HBs антител в препаратах иммуноглобулинов человека.

Материалы и методы

Материалы и оборудование:

- международный стандартный образец иммуноглобулина человека, содержащий anti-HBs антитела (WHO International Standard; Second International Standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human; NIBSC code: 07/164)³; содержание anti-HBs антител — 100 МЕ/ампула;
- Неогепатект, иммуноглобулин человека против гепатита В («Биотест Фарма ГмбХ», Германия; серия C793111301);
- Иммуноглобулин Сигардис; иммуноглобулин человека нормальный, раствор для инфузий (ООО «Фармацевтическая компания Сычуаньская Юанда Шуянь», Китай; серия 202012005D);
- тест-система «ВектоHBsAg-антитела», набор реагентов для иммуноферментного качественного и количественного определения антител к HBs-антигену вируса гепатита В в сыворотке (плазме) крови (АО «Вектор-Бест», Россия);
- дозаторы механические переменного объема Biohit (Sartorius Biohit, Финляндия);
- термошейкер для планшета ST-3 (Elmi, Латвия);
- фотометр микропланшетный Ledetect96 (Biomed Dr Wieser GmbH, Австрия).

Методы

Иммуноферментный анализ. Постановку ИФА и учет результатов проводили в соответствии с инструкцией по применению тест-системы «ВектоHBsAg-антитела». Оптическую плотность измеряли в двухволновом режиме: основной фильтр — 450 нм и референс-фильтр — 620 нм.

Пробоподготовка. Разведение исследуемых образцов препаратов иммуноглобулинов и международного стандарта (калибровочные пробы) готовили в двух повторностях. В качестве разбавителя использовали калибратор с нулевой концентрацией из тест-системы «ВектоHBsAg-антитела». Содержимое каждой пробирки после внесения пробы перемешивали на шейкере в течение 10–15 с. При исследовании использовали разведения образцов иммуноглобулина с концентрацией от 0,1 до 1000 мМЕ/мл.

Обработка результатов эксперимента проводилась с применением следующих подходов:

- по калибровочной кривой с использованием миллиметровой бумаги в соответствии с инструкцией по применению тест-системы «ВектоHBsAg-антитела» («ручной» подход);
- методом параллельных линий с использованием программы «PARALINE» (Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича) на базе программы Microsoft Excel [5];
- по калибровочной кривой при построении графика линейной регрессии;
- с использованием 4-параметрической логистической модели (4PL) с помощью программного обеспечения PLA 2.0.0 (Stegmann Systems, Германия).

Статистическую обработку результатов [6] проводили, рассчитывая среднеарифметическое значение (при $n=3$), среднеквадратическое (стандартное) отклонение (SD), коэффициент вариации (CV) с применением пакета статистических программ Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

При определении концентрации anti-HBs антител методом ИФА для построения калибровочной кривой применяли два подхода: «ручное» построение графика на миллиметровой бумаге и подходы, основанные на использовании компьютерных вычислений или специально разработанного программного обеспечения. Для любого варианта необходимым этапом являлось определение оптической плотности в анализируемых образцах в зависимости от концентрации калибровочных проб.

«Ручной» подход к построению калибровочной кривой

Данный подход остается актуальным, несмотря на широкое распространение компьютерной техники. В соответствии с инструкцией по применению тест-системы «ВектоHBsAg-антитела» калибровочная кривая строится с использованием миллиметровой бумаги. По калибровочному графику определяют концентрацию анти-HBs антител в анализируемом образце. Для этого на оси ординат откладывают средние значения оптической плотности анализируемого образца, по оси абсцисс — концентрацию (активность) калибровочных проб. Параллельно оси абсцисс до пересечения с калибровочным графиком проводят прямую линию. На ось абсцисс опускают

³ <https://www.nibsc.org/documents/ifu/07-164.pdf>

перпендикуляр от точки пересечения калибровочного графика и проведенной прямой. Полученная точка пересечения с осью абсцисс и есть искомое значение концентрации анти-НВс антител в образце, выраженное в мМЕ/мл. Затем проводят пересчет в МЕ/мл.

Результаты оценки специфической активности исследуемых препаратов иммуноглобулинов человека с использованием описанного подхода представлены в *таблице 1*.

Для более точной интерполяции (условие, когда кривая построенной функции должна проходить точно через имеющиеся точки данных) при построении графика вручную необходима в первую очередь линеаризация данных. Недостатками данного подхода являются субъективность при линеаризации графика, отсутствие оценки коэффициента вариации между повторностями анализируемых проб, что, в свою очередь, не позволяет судить о точности и воспроизводимости измерений оптической плотности.

Метод параллельных линий с использованием программы «PARALINE»

Программа «PARALINE» разработана для количественной оценки специфической активности лекарственных средств по отношению к референс-образцам [5]. Используя диспер-

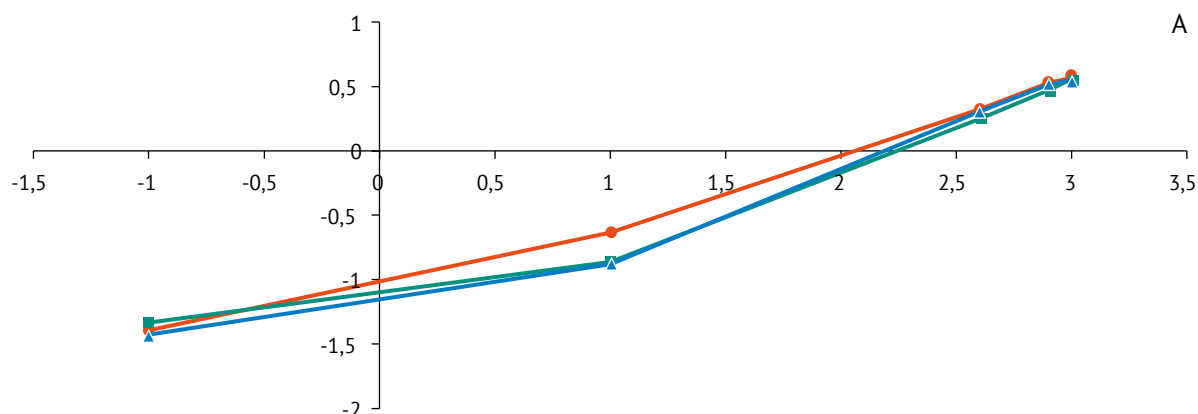
сионный анализ, в программе получают значения специфической активности по отношению к международному стандартному образцу или другому препарату сравнения. Активность иммунобиологических препаратов обычно определяют по сравнению с референс-образцом, активность которого предварительно определена. В качестве референс-образца может выступать как международный стандартный образец, активность которого определена в международных единицах, так и отраслевой стандартный образец, активность которого установлена по международному стандарту. Сравнение проводится таким образом, чтобы можно было определить, какое количество вещества в испытуемом образце обладает такой же активностью, что и стандартный образец. В результате автоматических расчетов в программе «PARALINE» происходит построение графика активности испытуемого образца относительно активности препарата сравнения: по оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации образца, по оси ординат – десятичный логарифм значения оптической плотности. При этом оси абсцисс и ординат выбираются таким образом, чтобы линии, выражающие зависимости для стандартного образца и испытуемого препарата, были прямыми [5].

Таблица 1. Результаты расчета специфической активности препаратов иммуноглобулинов человека с использованием различных математических методов

Table 1. Potency of human immunoglobulin preparations calculated using various mathematical methods

Метод, используемый для построения калибровочной кривой <i>Calibration curve calculation method</i>	Номер измерения <i>Measurement number</i>	Результат определения специфической активности, МЕ/мл <i>Potency calculation result, IU/mL</i>					
		Неогепатект <i>Neohepatect</i>			Иммуноглобулин Сигардис <i>Immunoglobulin Sigardis</i>		
		X	X (n=3)	SD (CV%)	X	X (n=3)	SD (CV%)
«Ручной» подход <i>Manual approach</i>	1	86,2	95,1	7,7 (8,1)	75,0	81,7	5,9 (7,3)
	2	100			83,8		
	3	99			86,3		
Метод параллельных линий с использованием программы «PARALINE» <i>Parallel-line analysis (PARALINE software)</i>	1	74,1	73,5	8,5 (11,5)	75,2	67,8	8,1 (11,9)
	2	81,7			69,0		
	3	64,8			59,2		
Метод линейной регрессии <i>Linear regression</i>	1	86,3	91,1	5,8 (6,3)	71,5	66,0	4,8 (7,2)
	2	89,6			63,2		
	3	97,5			63,3		
4-параметрическая логистическая модель <i>4-parameter logistic model</i>	1	93,8	97,8	4,1 (4,2)	87,2	84,3	2,5 (3,0)
	2	97,5			82,5		
	3	102			83,2		

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data



Результаты Results

Дисперсионный анализ Analysis of variance

Источник вариации Source of variation	Степень свободы Degree of freedom	Сумма квадратов Sum of squares	Средний квадрат Medium square	F теор. F theoretical	F экспер. F experimental	Вывод Conclusion
Измерения (дозы) Measurements (doses)	14	18,4527	1,3180	2,42	15799,06	Значимо Significant
Препараты Preparations	2	0,0271	0,0135	3,68	162,18	Значимо Significant
Линейная регрессия Linear regression	1	17,7350	17,7350	4,54	212583,76	Значимо Significant
Параллелизм Parallelism	2	0,0112	0,0056	3,68	67,19	Да Yes
Линейность Linearity	9	0,6794	0,0755	2,59	904,93	Да Yes
Остаточная ошибка Residual error	15	0,0013	0,0001			
Итого Total	29	18,4539				
	Min	Активность Potency	Max			
Препарат № 1 Неогепатект Preparation 1 Neohepatect	0,67812	0,74126	0,81026			
Препарат № 2 Иммуноглобулин Сигардис Preparation 2 Immunoglobulin Sigardis	0,69072	0,75237	0,81952			

Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Исследование активности образцов иммуноглобулина. А — калибровочный график активности исследуемого образца иммуноглобулина относительно активности международного стандартного образца иммуноглобулина, построенный с использованием программы «PARALINE». По оси Y — десятичный логарифм значений оптической плотности (в двухволновом режиме 450–620 нм), по оси X — десятичный логарифм активности (концентрации anti-HBs антител) исследуемого образца; прямая красного цвета — международный стандартный образец иммуноглобулина человека, содержащий anti-HBs антитела; зеленого цвета — препарат Неогепатект; синего цвета — Иммуноглобулин Сигардис. В — автоматически рассчитанные программой «PARALINE» результаты дисперсионного анализа и активность исследуемых препаратов иммуноглобулинов относительно активности используемого стандартного образца (скриншот).

Fig. 1. Potency of human immunoglobulin samples. A, calibration curves for the potency of the study immunoglobulin preparations and the international standard calculated using PARALINE software. The Y-axis represents $\log_{10}$ absorbance values (dual wavelength mode; 450–620 nm); the X-axis shows $\log_{10}$ potency values (anti-HBs antibody concentrations) for test samples. The red line stands for the international standard for human anti-HBs immunoglobulin; the green one, for Neohepatect; and the blue one, for Immunoglobulin Sigardis. B, variance analysis results automatically calculated in PARALINE software and the potency of the study preparations measured relative to the international standard (screenshot).

Пример построения калибровочного графика определения активности иммуноглобулинов с использованием программы «PARALINE» представлен на *рисунке 1*, результаты оценки активности исследуемых препаратов с использованием программы «PARALINE» — в *таблице 1*.

Для получения конечного значения исследователю необходимо полученный результат умножить на исходную активность препарата сравнения. В случае препарата № 1: $0,74126 \times 100 \text{ МЕ/мл} = 74,126 \text{ МЕ/мл}$ (~74 МЕ/мл). Также программа дает возможность автоматически проводить оценку результатов на соответствие критериям валидности: соблюдение линейности, параллельности, значимости регрессии (*рис. 1В*). В данном случае линейность и параллельность определяются не визуально, а с помощью метода дисперсионного анализа, позволяя также установить доверительные интервалы. Желательным условием проведения испытаний в случае использования программы «PARALINE» является то, что разведения образцов должны быть сделаны независимо друг от друга, то есть из исходного препарата, а не из промежуточного его разведения. Также следует учитывать краевые эффекты, неравномерность распределения теплового поля в термощейкерах, с тем чтобы избежать неидентичности этих факторов [5]. Данный метод позволяет количественно определить активность испытуемого препарата по отношению к стандарту и оценить 95% доверительный интервал.

Построение графика линейной регрессии

Линейная регрессия — это метод анализа, который позволяет смоделировать связь между зависимыми и независимыми переменными путем подбора линейного уравнения к полученным данным. С помощью уравнения можно установить степень влияния независимых величин на зависимую переменную. График линейной регрессии строят с использованием программы Microsoft Excel, в функционале которой имеется достаточно инструментов, предназначенных для проведения подобного вида анализа.

Необходимым условием при построении данной функции является анализ получаемого коэффициента детерминации R^2 . При анализе регрессионных моделей значение коэффициента трактуется как соответствие модели данным. Чем ближе к единице значение R^2 , тем точнее модель соответствует данным. В том случае когда значение R^2 принимает отрицательное значение, можно говорить о неадекватности модели. Данный коэффициент рассматривают как универсальную меру зависимости одной случайной величины

от множества других. Приемлемость модели предполагает, что коэффициент детерминации должен быть не меньше 0,5. Модели, для которых R^2 выше 0,8, считаются приемлемыми (коэффициент корреляции в этом случае превышает 90%). Функциональная зависимость между переменными подтверждается при коэффициенте детерминации равном единице. Результатом расчетов является формула, описывающая функцию полученного графика. Подставляя в формулу значения оптических плотностей анализируемых проб, получают искомые величины специфической активности. Пример построения калибровочного графика определения активности иммуноглобулина с использованием линейной регрессии представлен на *рисунке 2*.

4-параметрическая логистическая модель (4PL)

В настоящее время модель 4PL активно используется для анализа различных показателей качества иммунобиологических препаратов зарубежного производства и считается одной из наиболее корректных. При построении ка-

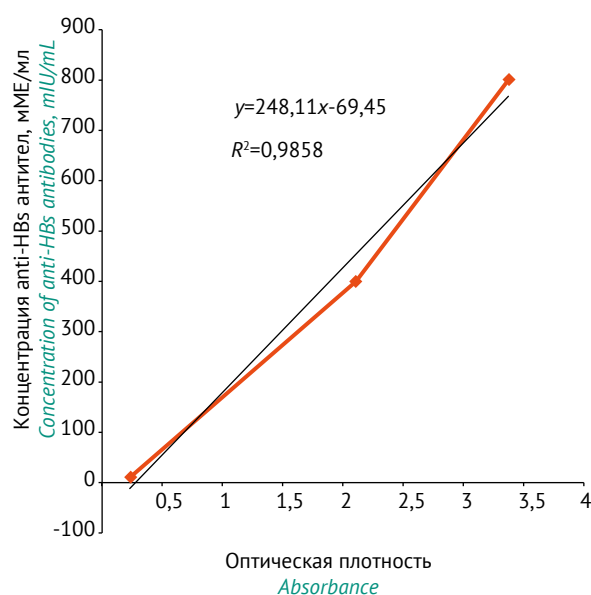


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Калибровочный график активности исследуемого образца иммуноглобулина, построенный с использованием метода линейной регрессии. Кривая оранжевого цвета — график зависимости оптической плотности (ОП_{450–620}) от используемых концентраций стандартного образца иммуноглобулина; на графике представлена формула регрессионного уравнения и значение R^2 . Прямая черного цвета — регрессионная линия генеральной совокупности.

Fig. 2. Calibration curve for the potency of a test sample calculated by linear regression. The orange line shows absorbance values (450–620 nm) as a function of concentrations of the international standard for human anti-HBs immunoglobulin. The figure includes the regression equation and the R^2 value. The black line is the population regression line.

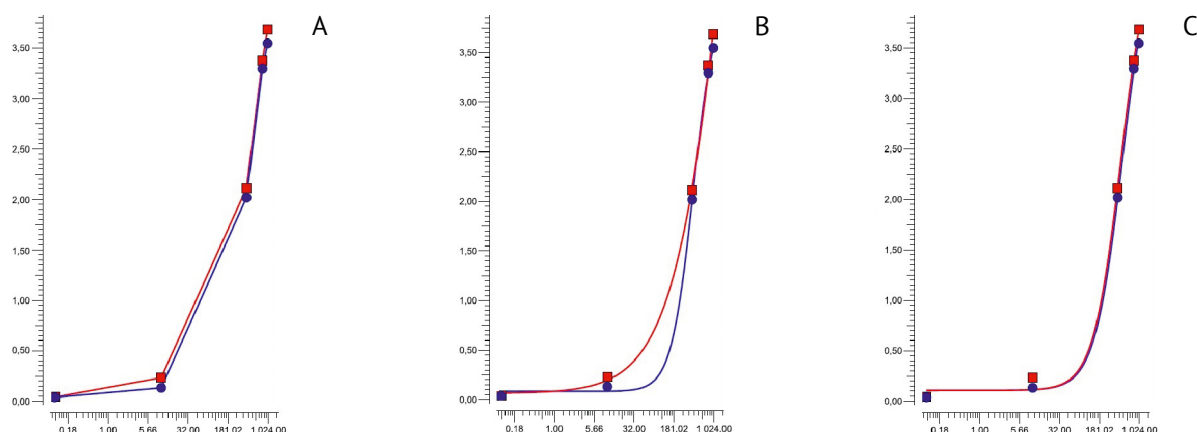


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Калибровочные графики активности исследуемых образцов препаратов иммуноглобулинов, построенные с использованием 4-параметрической логистической модели (4PL). По оси X — активность образца иммуноглобулина, МЕ/мл; по оси Y — значение оптической плотности (в двухволновом режиме 450–620 нм). А — калибровочный график, построенный по средним значениям оптической плотности; В — неограниченная или непараллельная модель, в которой для каждого препарата построена отдельная сигмовидная кривая; С — ограниченная или параллельная модель. Параллельные сигмовидные кривые построены для исследуемых образцов препаратов иммуноглобулинов: кривая красного цвета — препарат Иммуноглобулин Сигардис; кривая синего цвета — препарат Неогепатект.

Fig. 3. Calibration curves for the potency of the study immunoglobulin preparations calculated using a 4-parameter logistic model (4PL). The X-axis represents immunoglobulin potency values, IU/mL; the Y-axis shows absorbance values (dual wavelength mode; 450–620 nm). A, calibration curve calculated using mean absorbance values; B, unconstrained (non-parallel) model with a separate sigmoid curve plotted for each study preparation; C, constrained (parallel) model. Parallel sigmoid curves are plotted for the study immunoglobulin preparations: the red curve stands for Immunoglobulin Sigardis, and the blue one represents Neogepatect.

либровочной кривой в модели 4PL оценивают четыре параметра: средний уровень сигнала для «бесконечной» дозы (фоновый сигнал); средний уровень сигнала для нулевой концентрации аналита; отрезок, отсекаемый прямой на оси Y, и угловой коэффициент прямой [4]. Значением функции в методе логистической регрессии является вероятность того, что исходное значение принадлежит к определенному классу; в методе не производится предсказание значения числовой переменной на основании выборки исходных значений. Программа расчета модели 4PL (PLA 2.0.0) автоматически выдает результат и строит графики. Пример построения калибровочных графиков определения активности иммуноглобулина представлен на рисунке 3. Программа также позволяет вычислять доверительные интервалы.

Результаты оценки специфической активности исследуемых препаратов иммуноглобулинов, полученные с использованием различных подходов (табл. 1), показали, что значения имеют разброс от 64,8 до 102 МЕ/мл для препарата Неогепатект и от 59,2 до 87,2 МЕ/мл для препарата Иммуноглобулин Сигардис; значения коэффициента вариации (относительного стандартного отклонения) не превышают принятый критерий приемлемости (20%), что подтверждает повторяемость методик. Это позволяет сделать вывод о том, что получаемые значения варьируют

в зависимости от выбора метода построения калибровочной кривой. В случае когда производитель представил в требованиях нормативного документа только нижнюю границу специфической активности (например, не менее 0,5 МЕ/мл), а фактическая активность действующего вещества в лекарственном средстве на порядок превышает данные требования, то установленный разброс не будет оказывать влияния на заключение о качестве продукции, но если аналитику необходимо попасть в узкий интервал значений (например, 50–60 МЕ/мл), выбор метода расчета может играть решающую роль. В то же время субъективность «ручного» подхода говорит о необходимости перехода к автоматизированному обсчету получаемых результатов.

Подбор подходящего метода построения калибровочной кривой требует определенного навыка и поэтому находится, как правило, в компетенции разработчиков ИФА-наборов [4]. Оптимальный для конкретного ИФА-набора метод обсчета результатов с использованием математического анализа данных должен быть описан в инструкции к набору. В тех случаях, когда инструкция такой информации не содержит, оператор вынужден самостоятельно подбирать метод расчета активности (концентрации). Также стоит учитывать, что применяемое при проведении ИФА спектрофотометрическое оборудование предназначено для измерения оптических

плотностей в различных видах исследований, а значит, не все алгоритмы расчетов будут пригодны для обсчета данных именно сэндвич-ИФА. Чем больше возможностей имеет программное обеспечение, тем лучше пользователь должен разбираться в том, какая именно программа подходит к конкретному типу экспериментов. Помимо этого, при подборе следует учитывать, что компьютерные методы обработки данных ИФА могут приводить к некорректному построению калибровочных кривых. Причиной этого может быть ошибочная реализация заложенной в программе последовательности действий.

В соответствии с нормативными документами предприятий на препараты иммуноглобулинов человека как отечественного, так и зарубежного производства, испытания по определению специфической активности, оцениваемой по содержанию anti-HBs антител, проводятся с использованием наборов реагентов, предназначенных для иммуноферментного качественного и количественного определения антител к HBsAg сыворотке (плазме) крови и зарегистрированных на территории Российской Федерации. Инструкции к наборам реагентов не предусматривают проведение оценки результатов с использованием указанных в статье методов, за исключением «ручного» подхода к построению калибровочной кривой. В настоящее время зарубежные производители при разработке иммунобиологических лекарственных средств отказываются от использования готовых наборов для ИФА в пользу разработки методов

in-home [7], тем более что в готовое программное обеспечение, предоставляемое к современным спектрофотометрам, уже заложен анализ различных критериев, позволяющих сделать выводы о точности и валидности получаемых результатов, а также исключена субъективность оценки оператора.

Заключение

Методы автоматизированного обсчета данных иммуноферментного анализа широко используются в мировой практике для оценки специфической активности различных лекарственных средств, в том числе препаратов иммуноглобулинов человека, но не внедрены для оценки специфической активности (концентрации) антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в Российской Федерации. Анализ результатов проведенных исследований свидетельствует о необходимости совершенствования математических методов оценки экспериментальных данных, используемых для определения концентрации антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в препаратах иммуноглобулинов человека отечественного производства и переходу от «ручного» подхода к автоматизированному обсчету получаемых результатов (например, с использованием 4-параметрической логистической модели) в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методам испытаний, и учетом возможностей используемого в настоящее время оборудования.

Литература/References

1. Maddrey WC. Hepatitis B: an important public health issue. *J Med Virol.* 2000;61(3):362–6.
[https://doi.org/10.1002/1096-9071\(200007\)61:3%3C362::aid-jmv14%3E3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/1096-9071(200007)61:3%3C362::aid-jmv14%3E3.0.co;2-i)
2. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* 2022;2508:115–34.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_10
3. Нечаев АВ, Кудашева ЭЮ, Лешина СА, Корнилова ОГ, Коновалова ЕС, Стручкова ИН и др. Теоретическое и экспериментальное обоснование выбора перспективных методов оценки количественного содержания иммуноглобулинов классов G, A и M в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека. *Иммунология.* 2019;40(3):41–50.
Nechaev AV, Kudashева EYu, Leshina SA, Kornilova OG, Konovalova ES, Struchkova IN, et al. Theoretical and experimental rationale of the selection of promising methods for quantitative determination of immunoglobulins G, A and M in human immunoglobulin products. *Immunology.* 2019;40(3):41–50 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-13005>
4. Свежова НВ, Шаркова ВЕ, Громов ДБ, Головаченко ВА, Польшцев ДГ. Методы математической обработки данных в иммуноферментном анализе. I. Теоретические основы. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2008;(1):3–9.
Svezhova NV, Sharkova VE, Gromov DB, Golovachenko VA, Polyntsev DG. Methods for mathematical data processing in enzyme immunoassay. I. Theoretical bases. *Clinical Laboratory Diagnostics.* 2008;(1):3–9 (In Russ.).
EDN: [IJSVNB](#)
5. Петухов ВГ. Метод параллельных линий для количественной оценки качества стандартных образцов и других МИБП в иммуноферментном анализе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2004;(1):19–23.
Petukhov VG. Parallel-line method for quantitative assessment of the quality of standard samples and other MIBPs in enzyme immunoassay. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2004;(1):19–23 (In Russ.).
6. Гланц С. *Медико-биологическая статистика.* М.: Практика; 1998.

Glantz SA. *Primer of biostatistics*. Moscow: Practice; 1998 (In Russ.).

7. Shanmugham R, Thirumeni N, Rao VS, Pitta V, Kas-thuri S, Singanallur NB, et al. Immunocapture en-

zyme-linked immunosorbent assay for assessment of *in vitro* potency of recombinant hepatitis B vaccines. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(8):1252–60. <https://doi.org/10.1128/cvi.00192-10>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.Л. Постнова** — идея и дизайн исследования, проведение экспериментальных исследований, анализ и обобщение экспериментальных данных, написание текста рукописи; **А.А. Мовсесянц** — консультативная помощь в анализе результатов и окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.L. Postnova** elaborated the study idea and design, conducted experiments, analysed and summarised experimental data, and drafted the manuscript. **A.A. Movsesyants** provided consultations on the analysis of the study results and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Постнова Евгения Леонидовна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1798-4910>
postnova@expmed.ru

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

Поступила 07.03.2023

После доработки 15.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Evgeniya L. Postnova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1798-4910>
postnova@expmed.ru

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

Received 7 March 2023

Revised 15 August 2023

Accepted 13 September 2023



Мониторинг показателей качества вакцин для профилактики туберкулеза методом контрольных карт Шухарта

А.А. Савина✉, Н.В. Александрова, Т.И. Немировская

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

✉ Савина Анна Александровна; Savina@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Производство качественных лекарственных препаратов, в том числе вакцин, возможно только в условиях сохранения стабильности всех стадий технологического процесса производства. Подходом для оценки стабильности процесса производства является использование контрольных карт Шухарта, построенных по данным анализируемых показателей качества.

Цель. Оценка стабильности качества туберкулезных вакцин БЦЖ и БЦЖ-М и стабильности процесса их производства с помощью контрольных карт Шухарта.

Материалы и методы. Образцы вакцины туберкулезной (БЦЖ) и вакцины туберкулезной для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М) серий, выпущенных в гражданский оборот в 2019–2022 гг. Стабильность качества вакцин оценивали по показателям качества «Специфическая активность» и «Общее содержание бактерий», которые являются ключевыми при оценке иммуногенности. Сравнительную оценку показателей качества вакцин проводили согласно результатам анализа, предоставленным предприятием-производителем, а также результатам, полученным при контроле качества в испытательном центре. Проводили построение контрольных карт Шухарта индивидуальных значений (X-карта) и карт скользящих размахов (R-карта) в соответствии с ГОСТ Р 50779.42-99 и ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015.

Результаты. Показано, что качество вакцин БЦЖ и БЦЖ-М оставалось стабильным в течение всего периода наблюдения (2019–2022 гг.). Ретроспективный анализ R- и X-карт выявил наличие характерных трендов, присущих критериям для особых причин в отдельные временные промежутки исследования. Значение коэффициента корреляции Пирсона (r) между данными производителя и данными, полученными при контроле качества в испытательном центре, составило от 0,2 до 0,8.

Выводы. С помощью контрольных карт Шухарта подтверждена стабильность качества туберкулезных вакцин БЦЖ и БЦЖ-М, выпущенных в 2019–2022 гг. Проведенный анализ R- и X-карт свидетельствует о стабильности процесса производства вакцин, однако наличие предупреждающих сигналов указывает на необходимость проведения дополнительных мероприятий, направленных на стандартизацию технологического процесса. Полученные результаты могут служить основанием для рекомендации применения карт Шухарта при производстве и контроле качества туберкулезных вакцин.

Ключевые слова: вакцина для профилактики туберкулеза; БЦЖ; показатели качества; контрольные карты Шухарта; карта индивидуальных значений; X-карта; карта скользящих размахов; R-карта; тренды; стабильность технологического процесса

Для цитирования: Савина А.А., Александрова Н.В., Немировская Т.И. Мониторинг показателей качества вакцин для профилактики туберкулеза методом контрольных карт Шухарта. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):310–320. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-310-320>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

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

Using Shewhart charts to monitor quality characteristics of preventive vaccines for tuberculosis

Anna A. Savina✉, Natalia V. Aleksandrova, Tatiana I. Nemirovskaya

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

✉ Anna A. Savina; Savina@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. The quality of medicinal products, particularly vaccines, is contingent on the stability of the manufacturing process at all stages, which can be evaluated using Shewhart charts for data obtained by monitoring the quality attributes of interest.

Aim. This study evaluated the stability of the quality and manufacturing processes of the BCG and BCG-M tuberculosis vaccines using Shewhart charts.

Materials and methods. This study focused on samples of the BCG tuberculosis vaccine and the BCG-M tuberculosis vaccine, a less reactogenic alternative for primary immunisation. Both vaccines were released to the market in 2019–2022. The quality of vaccine samples was assessed for stability based on their potency and total bacterial count, which are the key parameters for immunogenicity evaluation. These quality parameters were compared using test results submitted by the manufacturer and obtained at the testing centre. The authors plotted individuals charts (X-charts) and moving range charts (R-charts) in accordance with national standards GOST R 50779.42-99 and GOST R ISO 7870-2-2015.

Results. The quality of the BCG and BCG-M vaccines remained stable during the entire follow-up period (2019–2022). For some periods, the retrospective analysis of R- and X-charts revealed characteristic trends meeting special cause criteria. The Pearson correlation coefficient (r) between the data submitted by the manufacturer and the data obtained at the testing centre ranged from 0.2 to 0.8.

Conclusions. The Shewhart charts demonstrated that the quality parameters of the BCG and BCG-M tuberculosis vaccines tested in 2019–2022 were stable. These vaccines had stable manufacturing processes, as shown by the R- and X-charts. However, the warning signs indicated that additional measures should be taken to standardise the manufacturing processes. The findings suggest that Shewhart charts may be recommended for monitoring the production and quality of tuberculosis vaccines.

Key words: tuberculosis vaccine; BCG; quality parameters; Shewhart charts; control charts; individuals chart; X-chart; moving range chart; R-chart; trends; process stability

For citation: Savina A.A., Aleksandrova N.V., Nemirovskaya T.I. Using Shewhart charts to monitor quality characteristics of preventive vaccines for tuberculosis. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):310–320. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-310-320>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 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.

Введение

Туберкулез (ТБ) занимает 13-е место среди ведущих причин смертности в мире¹. Для преодоления эпидемии ТБ государства – члены Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) одобрили в 2015 г. стратегию по ликвидации ТБ², целью достижения которой является снижение к 2035 г. числа смертельных исходов, наступивших вследствие заболевания ТБ, на 95% по сравнению с показателями смертности в 2015 г. К 2050 г. предполагается практическая элиминация ТБ. Международные усилия, направленные на ликвидацию заболеваемости и смертности от ТБ, реализуются по нескольким направлениям, при этом вакцинация новорожденных является одной из самых важных задач.

В Российской Федерации производится вакцина туберкулезная (БЦЖ)³, предназначенная для вакцинации и ревакцинации на территориях с высоким уровнем заболеваемости населения туберкулезом, а также вакцина для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М)⁴ в районах с низкой заболеваемостью (менее 80 заболевших на 100 тыс. населения). Вакцинацию новорожденных проводят на 3–5 сут после рождения. Требования к показателям качества вакцины БЦЖ и БЦЖ-М сформулированы в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV)⁵. Документ гармонизирован в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи и ВОЗ⁶.

Для оценки стабильности и анализа показателей производственного процесса используют подход, предложенный У. Шухартом и описанный в стандартах Российской Федерации (ГОСТ Р 50779.42-99 и ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015)⁷. Задача управления технологическим процессом состоит в поддержании процесса в стабильном, статистически управляемом состоянии, гарантирующем соответствие результатов установленным требованиям. Для оценки возможных отклонений процесса от состояния статистической

управляемости предназначены контрольные карты Шухарта (ККШ), которые демонстрируют значения анализируемых показателей процесса в режиме реального времени, показывают тренд изучаемого процесса и помогают определить, находится ли процесс в состоянии статистической стабильности, то есть функционирует под воздействием постоянных случайных причин и факторов собственной изменчивости⁸ [1]. ККШ используют в том числе для оценки стабильности производства вакцины, подтверждения соответствия характеристик продукции требованиям нормативной документации (НД) [2].

Цель работы – оценка стабильности качества туберкулезных вакцин БЦЖ и БЦЖ-М и стабильности процесса их производства с помощью контрольных карт Шухарта. В задачу исследования входило проведение сравнительного анализа качества туберкулезных вакцин на основании ретроспективных данных результатов контроля в испытательном центре (ИЦ) экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России и данных предприятия-производителя вакцин (ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, филиал «Медгамал») за 2019–2022 гг.

Материалы и методы

При проведении сравнительного анализа использовали данные оценки качества вакцин по основным количественным показателям («Специфическая активность» и «Общее содержание бактерий»), полученные в ИЦ, а также данные протоколов анализа образцов предприятия-производителя по 39 сериям вакцины туберкулезной БЦЖ и 97 сериям вакцины туберкулезной БЦЖ-М, поступившим в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (вакцина БЦЖ-М в 2019–2022 гг., вакцина БЦЖ в 2019–2021 гг.). Для статистической обработки

¹ <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>

² The end TB strategy. WHO; 2015. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/the-end-tb-strategy>

³ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

⁴ Там же.

⁵ ФС.3.3.1.0018.15 Вакцина туберкулезная БЦЖ живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁶ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. Annex 3. WHO Expert Committee on Biological Standardisation, sixty-second report. (WHO Technical Report Series, No. 979). WHO; 2013.

⁷ ГОСТ Р 50779.42-99. Статистические методы. Контрольные карты Шухарта.

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

⁸ Солонин СИ. Метод контрольных карт. Учебное пособие. Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина. Екатеринбург; 2014. https://elar.ufu.ru/bitstream/10995/36131/1/solonin_1_2014.pdf

данных [3] использовали программу Microsoft Office Excel. Проводили построение ККШ двух типов: карты скользящих размахов (R-карта) и карты индивидуальных значений анализируемых показателей (X-карта). С помощью ККШ определяли общую (внутреннюю) изменчивость процесса, обусловленную множеством случайных причин, и специальную изменчивость – реальное изменение процесса. Для расчета вариабельности процесса, то есть отклонения от среднего значения при действии случайных причин, рассчитывали среднее индивидуальных значений. На карту наносили центральную линию (CL) и откладывали по обе стороны от нее контрольные границы – верхнюю (UCL) и нижнюю (LCL), рассчитанные с учетом средней величины скользящих размахов (R). Индивидуальные значения анализируемого показателя откладывали по оси ординат в соответствии с номером серии препарата, отмеченным по оси абсцисс в хронологическом порядке. Для выявления критериев особых причин откладывали по обе стороны от CL на расстоянии 1, 2 и 3 значения стандартных отклонений (σ), а также наносили линии, соответствующие границам нормативных значений показателя, указанные в НД. Полученные результаты интерпретировали согласно ГОСТ⁹. Нахождение процесса в статистически управляемом состоянии означает, что процесс стабилен и предсказуем. Если изменчивость вызвана только случайными причинами, то на графике определяются точки, колеблющиеся около CL, которые укладываются в интервал $\pm 2\sigma$. Любое значение, попадающее за границы $\pm 2\sigma$, служит предостережением о выходе процесса из состояния статистической управляемости.

В случае если оцениваемое значение выходило за любую из контрольных границ или серия значений выстраивалась в необычные структуры (тренды), проводили анализ для обнаружения особых причин.

Результаты и обсуждение

Показатель качества «Специфическая активность» – основной показатель иммуногенности туберкулезных вакцин – является ключевым для оценки качества вакцины БЦЖ. Определение показателя проводят по числу жизнеспособных клеток БЦЖ в 1 мг вакцины. Для вакцины БЦЖ предел показателя составляет от 10 до 20 млн жизнеспособных клеток в 1 мг. Превышение верхнего предела по числу жизнеспособных клеток БЦЖ может привести к нежелательным реакциям у вакцинированных, а снижение показателя – к уменьшению протективных свойств препарата.

В *таблице 1* представлены сравнительные данные испытаний вакцины туберкулезной БЦЖ за 2019–2021 гг. по показателям качества «Специфическая активность» и «Общее содержание бактерий» согласно результатам анализа, предоставленным предприятием-производителем, и результатам, полученным при контроле качества в ИЦ. Установлено, что для вакцины БЦЖ средние значения показателей качества остаются на стабильном уровне, все серии соответствовали требованиям НД по исследуемым показателям.

Значения показателей качества вакцины БЦЖ анализировали с применением ККШ. На *рисунках 1 и 2* представлены X- и R-карты по показателям качества «Специфическая активность»

Таблица 1. Сравнительная оценка показателей качества вакцины БЦЖ согласно результатам анализа, предоставленным предприятием-производителем, и данным, полученным при контроле качества в испытательном центре (ИЦ)

Table 1. Comparative assessment of BCG quality parameters according to the testing data submitted by the manufacturer and obtained at the testing centre (TC) during quality evaluation

Год (количество серий) <i>Year (number of batches)</i>	Показатель качества вакцины БЦЖ <i>BCG quality parameters</i>			
	Специфическая активность, млн/мг <i>Potency, mln/mg</i>		Общее содержание бактерий, оптические единицы <i>Total bacterial count, absorbance units</i>	
	Данные ИЦ <i>TC's data</i>	Данные производителя <i>Manufacturer's data</i>	Данные ИЦ <i>TC's data</i>	Данные производителя <i>Manufacturer's data</i>
2019 (12)	15,16 $\pm$ 2,99	12,02 $\pm$ 1,00	0,333 $\pm$ 0,016	0,324 $\pm$ 0,018
2020 (17)	15,14 $\pm$ 2,59	12,41 $\pm$ 1,79	0,350 $\pm$ 0,012	0,329 $\pm$ 0,015
2021 (10)	13,34 $\pm$ 2,23	11,20 $\pm$ 0,59	0,345 $\pm$ 0,023	0,320 $\pm$ 0,015

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

⁹ ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

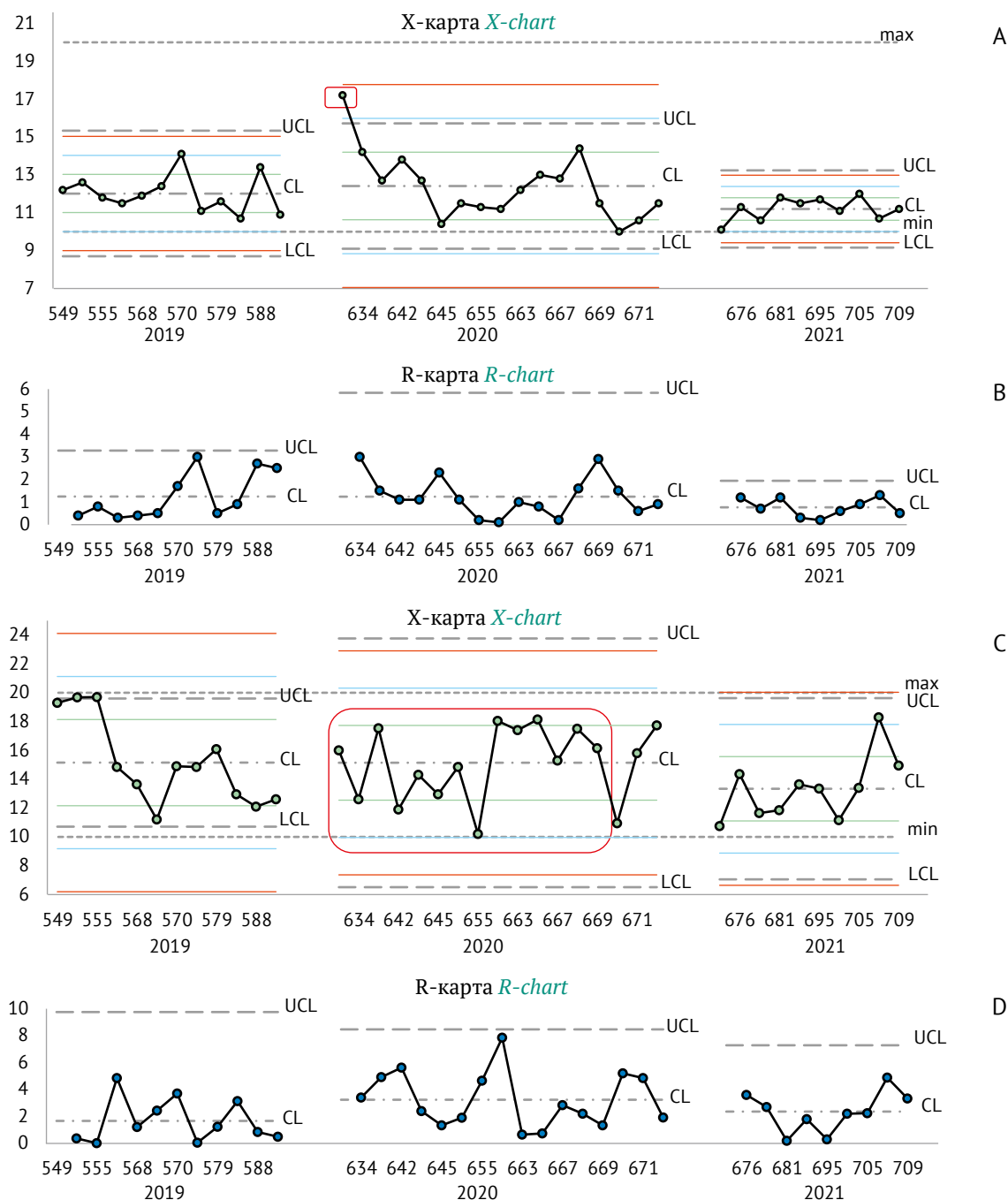


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. X- и R-карты по значениям показателя «Специфическая активность» вакцины БЦЖ, построенные по результатам анализа, предоставленным предприятием-производителем (А и В соответственно), и данным, полученным при контроле качества в испытательном центре (С и D соответственно). На X-картах ось Y – индивидуальные значения показателя «Специфическая активность» (млн/мг); на R-картах ось Y – значения размахов показателя между последовательными сериями вакцин. На X-картах и R-картах ось X – порядковые номера серий вакцины за 2019, 2020 и 2021 гг. CL – центральная линия; UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы; min и max – границы нормативных значений показателя, указанные в нормативной документации. Зелеными, голубыми и красными линиями отмечены 1, 2 и 3 стандартных отклонения (σ) соответственно. Область, выделенная красным цветом, включает точки, соответствующие одному из критериев особых причин.

Fig. 1. X- and R-charts for the potency of the BCG vaccine drafted using the testing data submitted by the manufacturer (A and B, respectively) and obtained at the testing centre during quality evaluation (C and D, respectively). The Y-axis in X-charts shows individual potency values (mln/mg); the Y-axis in R-charts shows moving ranges for consecutive vaccine batches. The X-axis in both charts indicates vaccine batch numbers for 2019, 2020, and 2021. CL – central line; UCL/LCL, upper and lower control limits; min/max, limits for the reference values specified for the quality parameter in the product specification file. Green, blue and red lines mark 1, 2, and 3 standard deviations (σ), respectively. The area highlighted in red includes points that meet a special cause criterion.

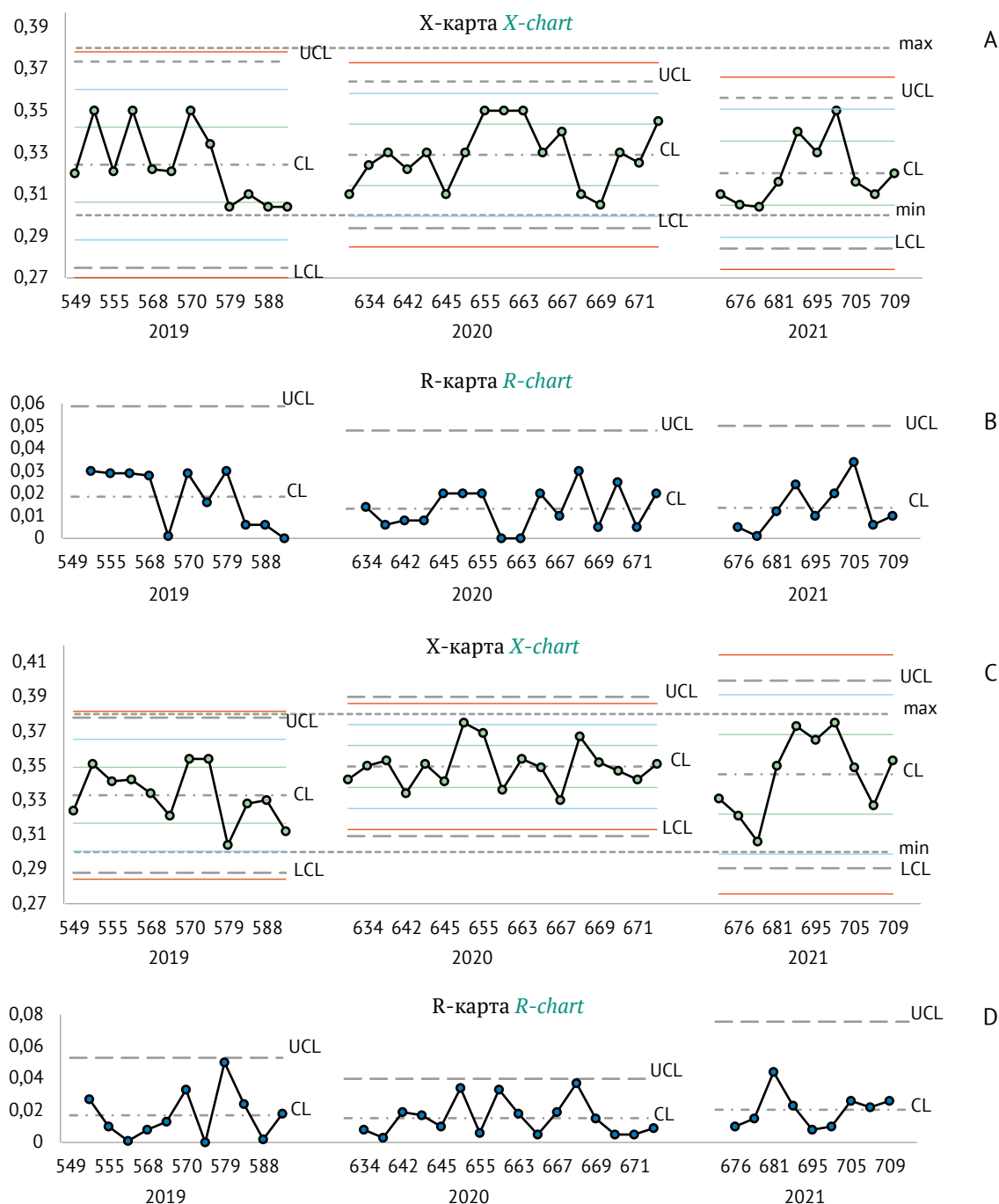


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. X- и R-карты по значениям показателя «Общее содержание бактерий» вакцины БЦЖ, построенные по результатам анализа, предоставленным предприятием-производителем (А и В соответственно), и данным, полученным при контроле качества в испытательном центре (С и D соответственно). На X-картах ось Y – индивидуальные значения показателя «Общее содержание бактерий» (оптические единицы); на R-картах ось Y – значения размахов показателя между последовательными сериями вакцин. На X-картах и R-картах ось X – порядковые номера серий вакцины за 2019, 2020 и 2021 гг. CL – центральная линия; UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы; min и max – границы нормативных значений показателя, указанные в нормативной документации. Зелеными, голубыми и красными линиями отмечены 1, 2 и 3 стандартных отклонения (σ) соответственно.

Fig. 2. X- and R-charts for the total bacterial count of the BCG vaccine drafted using the testing data submitted by the manufacturer (A and B, respectively) and obtained at the testing centre during quality evaluation (C and D, respectively). The Y-axis in X-charts shows individual total bacterial count values (absorbance units); the Y-axis in R-charts shows moving ranges for consecutive vaccine batches. The X-axis in both charts indicates vaccine batch numbers for 2019, 2020 and 2021. CL, central line; UCL/LCL, upper and lower control limits; min/max, limits for the reference values specified for the quality parameter in the product specification file. Green, blue and red lines mark 1, 2, and 3 standard deviations (σ), respectively.

и «Общее содержание бактерий», построенные по данным предприятия-производителя и ИЦ.

На X- и R-картах, построенных на основе данных предприятия-производителя (рис. 1А, 1В), можно наблюдать некоторые предупреждающие сигналы. Так, данные за 2020 г. (рис. 1В) характеризуются большой неоднородностью значений ($R=5,83$). В этом временном периоде также наблюдается появление критерия особых причин — одна точка выходит за пределы верхней контрольной границы (рис. 1А, область выделена красным цветом). При анализе карт по данным ИЦ за 2020 г. также наблюдается структура расположения точек, формирующая тренд, соответствующий критерию для особых причин (критерий 4), что подтверждает неустойчивое состояние процесса за этот период. Наибольшая стабильность технологического процесса по показателю «Специфическая активность» (с незначительным разбросом значений) наблюдалась в 2021 г. Таким образом, в динамике технологического процесса выявлена тенденция к стабилизации значений показателей. В то же время показано, что корреляция между данными, предоставленными предприятием-производителем, и результатами, полученными в ИЦ, слабая в течение всего исследуемого периода (коэффициент корреляции Пирсона, $r=0,22$). Полученные результаты указывают на необходимость дополнительных исследований, направленных на стандартизацию условий проведения испытаний.

На X- и R-картах, построенных на основе данных по показателю «Общее содержание бактерий» вакцины БЦЖ (рис. 2), тренды, отражающие появление в процессе особых причин, не выявлены. Все точки расположены в области преду-

предительных границ $\pm 2\sigma$. При сравнительном анализе данных предприятия-производителя и ИЦ за 2020 г. корреляция практически отсутствовала, что указывает на нестабильность результатов проведения контрольных испытаний. В 2019 и 2021 гг. продемонстрирована более высокая корреляция между анализируемыми значениями ($r=0,82$ и $r=0,87$ соответственно).

В таблице 2 представлены результаты испытаний вакцины туберкулезной для щадящей первичной иммунизации БЦЖ-М за 2019–2022 гг. Значения показателей качества для вакцины БЦЖ-М согласно НД составляют: по показателю «Специфическая активность» — от 15 до 23 млн жизнеспособных клеток в 1 мг; по показателю «Общее содержание бактерий» — от 0,16 до 0,20 оптических единиц. Испытания выявили, что все серии вакцины БЦЖ-М соответствовали требованиям НД по исследованным показателям.

На рисунках 3 и 4 представлены X- и R-карты по анализируемым показателям качества вакцины БЦЖ-М, построенные по данным предприятия-производителя и ИЦ. С помощью ККШ, построенных по данным производителя, выявлены тренды, свидетельствующие о воздействии неслучайных причин на производство препарата. На R- и X-картах обнаружены точки, выходящие за пределы верхних контрольных границ (рис. 3А, 3В, рис. 4А, 4В, критерий 1), а также выявлены структуры из пяти последовательно убывающих или возрастающих точек на X-картах (рис. 4А), формирующие незавершенный критерий 3 и завершенный критерий 2. Однако установить точную причину отклонения не представляется возможным, так как на результаты испытаний могут влиять множество различных факторов. О «случайности»

Таблица 2. Сравнительная оценка показателей качества вакцины БЦЖ-М согласно результатам анализа, предоставленным предприятием-производителем, и данным, полученным при контроле качества в испытательном центре (ИЦ)

Table 2. Comparative assessment of BCG-M quality parameters according to the testing data submitted by the manufacturer and obtained at the testing centre (TC) during quality evaluation

Год (количество серий) Year (number of batches)	Показатель качества вакцины БЦЖ-М BCG-M quality parameters			
	Специфическая активность, млн/мг Potency, mln/mg		Общее содержание бактерий, оптические единицы Total bacterial count, absorbance units	
	Данные ИЦ TC's data	Данные производителя Manufacturer's data	Данные ИЦ TC's data	Данные производителя Manufacturer's data
2019 (26)	16,92 $\pm$ 2,36	16,75 $\pm$ 1,81	0,184 $\pm$ 0,008	0,166 $\pm$ 0,005
2020 (26)	17,72 $\pm$ 2,27	17,38 $\pm$ 2,14	0,185 $\pm$ 0,008	0,167 $\pm$ 0,005
2021 (21)	18,48 $\pm$ 2,42	16,73 $\pm$ 1,88	0,181 $\pm$ 0,009	0,168 $\pm$ 0,006
2022 (24)	20,01 $\pm$ 2,30	19,51 $\pm$ 2,57	0,188 $\pm$ 0,008	0,169 $\pm$ 0,006

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

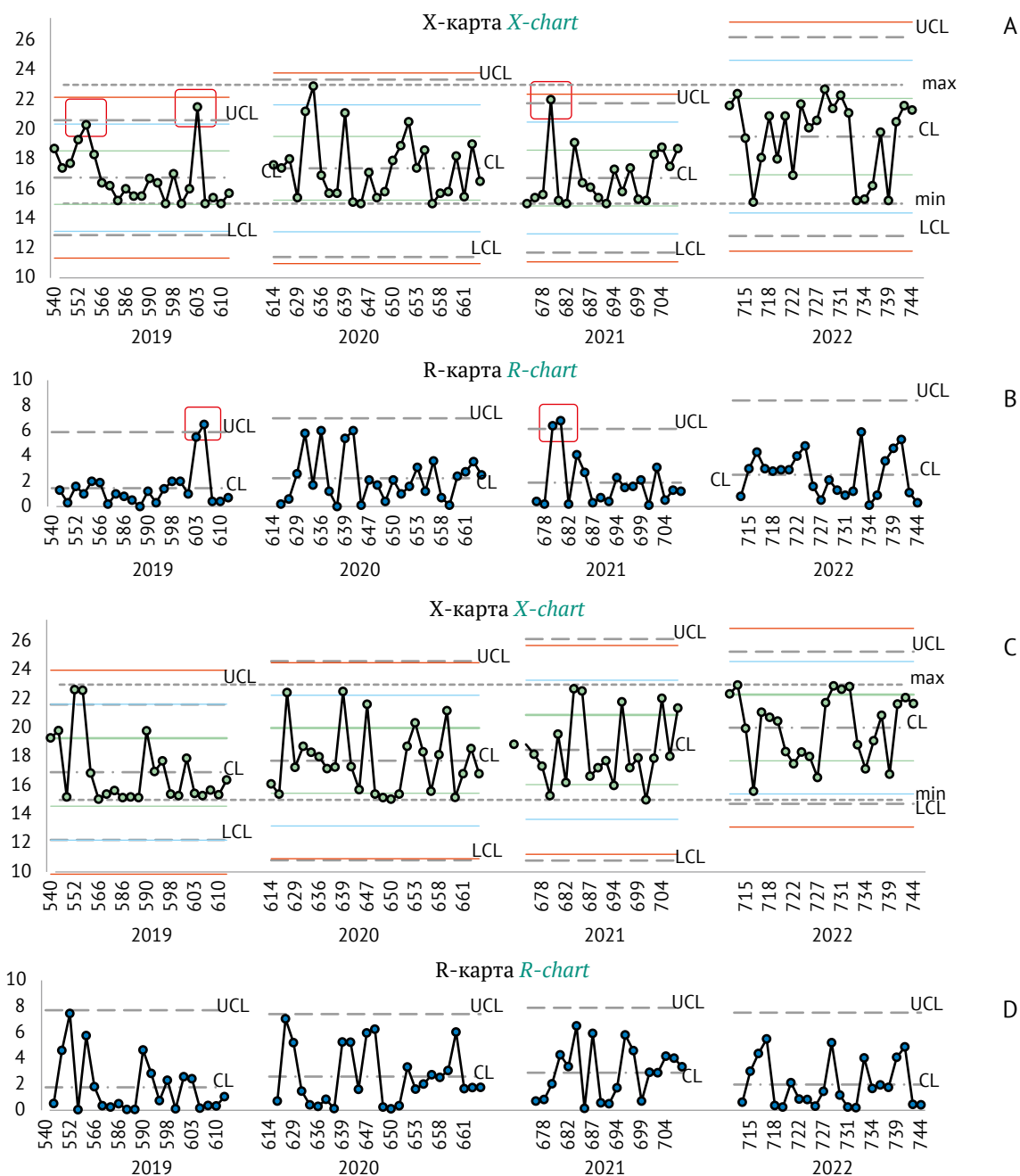


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. X- и R-карты по значениям показателя «Специфическая активность» вакцины БЦЖ-М, построенные по результатам анализа, предоставленным предприятием-производителем (А и В соответственно), и данным, полученным при контроле качества в испытательном центре (С и D соответственно). На X-картах ось Y – индивидуальные значения показателя «Специфическая активность» (млн/мг); на R-картах ось Y – значения размахов показателя между последовательными сериями вакцин. На X-картах и R-картах ось X – порядковые номера серий вакцины за 2019, 2020, 2021 и 2022 гг. CL – центральная линия; UCL и LCL – верхняя и нижняя контрольные границы; min и max – границы нормативных значений показателя, указанные в нормативной документации. Зелеными, голубыми и красными линиями отмечены 1, 2 и 3 стандартных отклонения (σ) соответственно. Область, выделенная красным цветом, включает точки, соответствующие одному из критериев особых причин.

Fig. 3. X- and R-charts for the potency of the BCG-M vaccine drafted using the testing data submitted by the manufacturer (A and B, respectively) and obtained at the testing centre during quality evaluation (C and D, respectively). The Y-axis in X-charts shows individual potency values (mln/mg); the Y-axis in R-charts shows moving ranges for consecutive vaccine batches. The X-axis in both charts indicates vaccine batch numbers for 2019, 2020, 2021, and 2022. CL, central line; UCL/LCL, upper and lower control limits; min/max, limits for the reference values specified for the quality parameter in the product specification file. Green, blue and red lines mark 1, 2, and 3 standard deviations (σ), respectively. The area highlighted in red includes points that meet a special cause criterion.

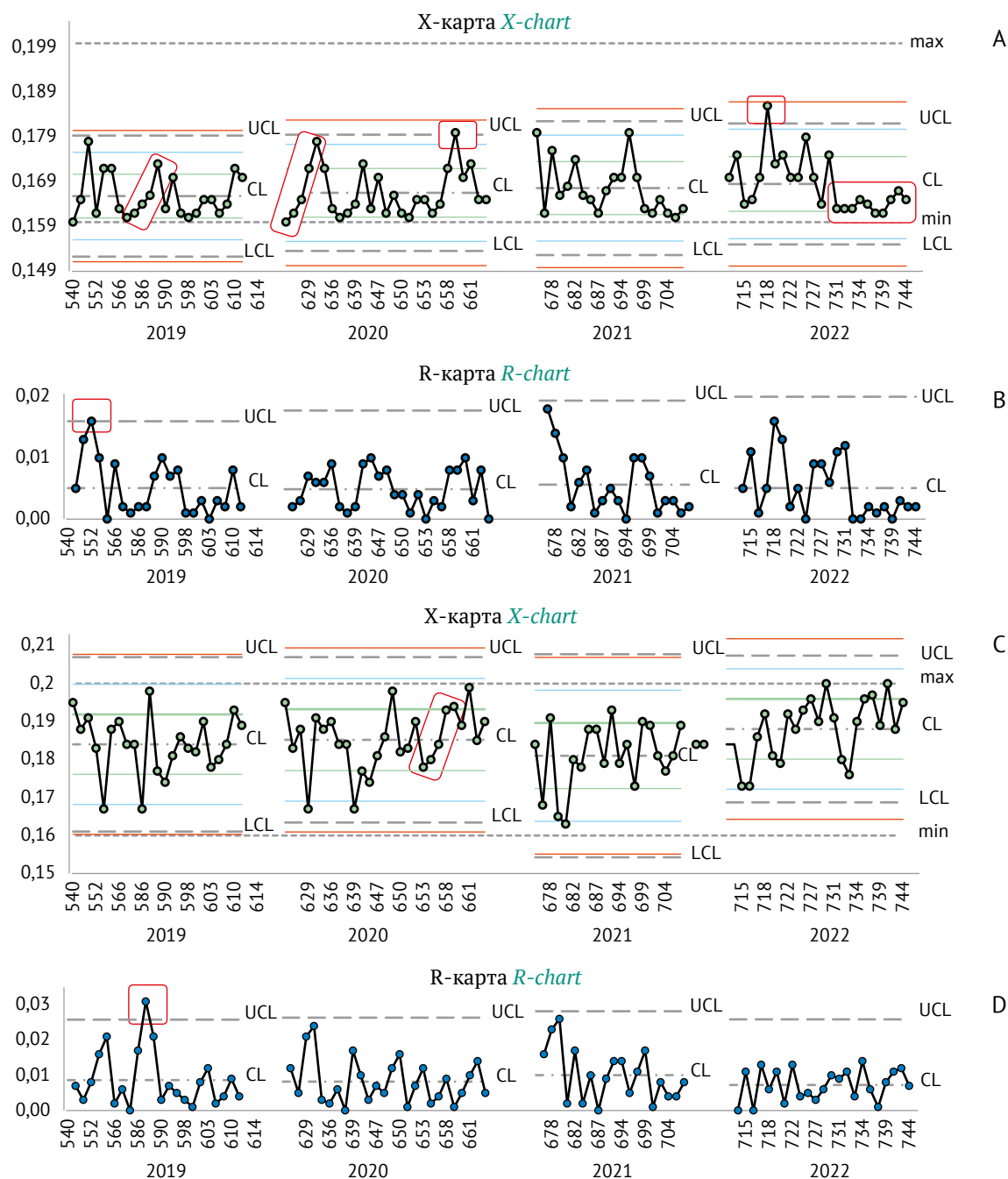


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. X- и R-карты по значениям показателя «Общее содержание бактерий» вакцины БЦЖ-М, построенные по результатам анализа, предоставленным предприятием-производителем (А и В соответственно), и данным, полученным при контроле качества в испытательном центре (С и D соответственно). На X-картах ось Y – индивидуальные значения показателя «Общее содержание бактерий» (оптические единицы); на R-картах ось Y – значения размахов показателя между последовательными сериями вакцин. На X-картах и R-картах ось X – порядковые номера серий вакцины за 2019, 2020, 2021 и 2022 гг. CL – центральная линия; UCL/LCL – верхняя и нижняя контрольные границы; min и max – границы нормативных значений показателя, указанные в нормативной документации. Зелеными, голубыми и красными линиями отмечены 1, 2 и 3 стандартных отклонения (σ) соответственно. Область, выделенная красным цветом, включает точки, соответствующие критерию особых причин.

Fig. 4. X- and R-charts for the total bacterial count of the BCG-M vaccine drafted using the testing data submitted by the manufacturer (A and B, respectively) and obtained at the testing centre during quality evaluation (C and D, respectively). The Y-axis in X-charts shows individual total bacterial count values (absorbance units); the Y-axis in R-charts shows moving ranges for consecutive vaccine batches. The X-axis in both charts indicates vaccine batch numbers for 2019, 2020, 2021, and 2022. CL, central line; UCL/LCL, upper and lower control limits; min/max, limits for the reference values specified for the quality parameter in the product specification file. Green, blue and red lines mark 1, 2 and 3 standard deviations (σ), respectively. The area highlighted in red includes points that meet a special cause criterion.

события свидетельствует то, что при контроле качества вакцины в ИЦ высокое значение показателя не было подтверждено. При этом степень корреляции между значениями результатов анализа, предоставленными предприятием-производителем, и данными, полученными в ИЦ, может быть расценена как средняя ($r=0,53$).

Было выявлено, что значения по показателю «Специфическая активность» БЦЖ-М за 2022 г. выше значений за предыдущие годы в среднем на 15%, что, возможно, свидетельствует о некоторой дестабилизации технологического процесса.

При анализе ККШ по показателю качества «Общее содержание бактерий» вакцины БЦЖ-М, построенных по данным производителя, выявлены структуры из последовательно возрастающих точек, а также точки, выходящие за пределы верхних контрольных границ (рис. 4А, 4В). Такой же тренд обнаружен при испытаниях в ИЦ (рис. 4С, 4Д). Согласно Х-карте по данным производителя в 2020 г. выявлена необычная структура из точек (рис. 4А, критерий 2), что может свидетельствовать о реальном изменении в технологическом процессе и требует особого внимания.

На данном этапе исследований не представляется возможным задать контрольные границы для дальнейшего мониторинга качества

туберкулезных вакцин, так как продемонстрированы признаки неуправляемости процесса. При приведении процесса к устойчивому управляемому состоянию и определению контрольных границ ККШ могут быть рекомендованы для непрерывной регистрации характеристик показателей качества продукта.

Выводы

1. Качество вакцин туберкулезных БЦЖ и БЦЖ-М по показателям «Специфическая активность» и «Общее содержание бактерий» согласно проведенному анализу данных предприятия-производителя, а также результатам испытаний в испытательном центре (данные 2019–2021 гг.) стабильно и соответствует требованиям нормативной документации.
2. Проведенный с помощью контрольных карт Шухарта анализ свидетельствует о стабильности процесса производства туберкулезных вакцин, однако наличие предупреждающих сигналов указывает на необходимость осуществления дополнительных мероприятий, направленных на стандартизацию технологического процесса.
3. Подтверждена применимость контрольных карт Шухарта для оценки стабильности технологического процесса.

Литература/References

1. Шпер ВЛ. Инструменты качества и не только! Часть 7. Контрольные карты Шухарта. *Методы менеджмента качества*. 2022;(2):48–54.
Shper VL. Quality tools and more! Part 7. Shewhart's control charts. *Quality Management Methods*. 2022;(2):48–54 (In Russ.).
EDN: [CSBWIL](https://csbwil.ru)
2. Алексеева ИА, Перелыгина ОВ, Колышкина ЕД. Оценка стабильности производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины с помощью контрольных карт Шухарта. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(4):256–65.

Alekseeva IA, Perelygina OV, Kolyshkina ED. Estimation of production consistency of diphtheria, tetanus, and pertussis components of the DTP vaccine using Shewhart charts. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(4):256–65 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-256-265>

3. Уилер Д, Чамберс Д. *Статистическое управление процессами. Оптимизация бизнеса с использованием контрольных карт Шухарта*. М.: Альпина Паблишер; 2020.
Wheeler D, Chambers D. *Statistical process management. Business optimization using Shewhart control charts*. Moscow: Alpina Publisher; 2020 (In Russ.).

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Савина** — дизайн и теоретическое обоснование исследования; экспериментальная работа по определению показателей качества вакцин, обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов; **Н.В. Александрова** — экспериментальная работа по определению показателей качества вакцин; анализ и интерпретация результатов исследования; написание текста рукописи; **Т.И. Немировская** — концепция работы, критический пересмотр текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Savina** designed the study, provided the theoretical framework for the study, tested vaccine samples for the quality parameters of interest, summarised the experimental data, analysed and interpreted the results. **N.V. Aleksandrova** tested vaccine samples for the quality parameters of interest, analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **T.I. Nemirovskaya** conceptualised the study, critically revised the manuscript, and approved the final version for publication.

Об авторах / Authors

Савина Анна Александровна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2134-9159>

Savina@expmed.ru

Александрова Наталья Владимировна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1069-8065>

aleksandrovanv@expmed.ru

Немировская Татьяна Ивановна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>

nemirovskaya@expmed.ru

Anna A. Savina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2134-9159>

Savina@expmed.ru

Natalia V. Aleksandrova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1069-8065>

aleksandrovanv@expmed.ru

Tatiana I. Nemirovskaya, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>

nemirovskaya@expmed.ru

Поступила 08.11.2022

После доработки 20.07.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 8 November 2022

Revised 20 July 2023

Accepted 13 September 2023

УДК 615.371

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-321-332>

Научная статья | Scientific Article



Изучение иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам серологическим методом

Е.И. Комаровская✉, А.А. Солдатов

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

✉ Комаровская Елена Игоревна; komarovskaya@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Современные методы оценки иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов разделяют на две группы: золотой стандарт — с введением токсина иммунизированным животным, и серологические методы — определение уровня защитных антител в сыворотке иммунизированных животных. Международные валидационные исследования серологических методов для определения иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов привели к пересмотру соответствующих глав Руководства Всемирной организации здравоохранения, Европейской и Японской фармакопей. В связи с этим некоторые производители вакцин против дифтерии и столбняка заменили методы с введением токсинов на альтернативные серологические методы в оценке иммуногенности.

Цель. Оценить пригодность, воспроизводимость и возможность внедрения в отечественную практику альтернативного метода иммуноферментного анализа при определении иммуногенности дифтерийного и столбнячного компонентов комбинированных вакцин с цельноклеточным коклюшным компонентом; изучить возможность использования отечественных стандартных образцов и реактивов.

Материалы и методы. Использовали комбинированные вакцины и анатоксины для профилактики дифтерии, дифтерийный токсин, референс-препараты. Определение специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов проводили на морских свинках и мышах фармакопейными методами: летального заражения и иммуноферментного анализа.

Результаты. Получены сопоставимые результаты оценки специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов методами иммуноферментного анализа и летального заражения: 230 МЕ/мл и 264 МЕ/мл, 188 МЕ/мл и 160 МЕ/мл соответственно. Данный серологический метод позволяет использовать одних и тех же особей (в отличие от метода летального заражения) для проверки эффективности нескольких антигенов. Значения титров антител, полученных от каждой особи, при использовании в качестве покрывающих антигенов неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов отечественного производства оказались сопоставимы с таковыми при использовании в качестве покрывающих антигенов международных стандартов.

Выводы. Показана возможность применения метода иммуноферментного анализа для определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов в вакцинах против дифтерии и столбняка, содержащих цельноклеточный коклюшный компонент. В качестве покрывающих антигенов возможно использование дифтерийного и столбнячного неадсорбированных анатоксинов отечественного производства. Необходимо продолжить работу по валидации методики иммуноферментного анализа с целью гармонизации отечественных и международных методов оценки иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов, что не только облегчит регистрацию зарубежных вакцин в России, но и ускорит регистрацию отечественных вакцин в других странах.

Ключевые слова: дифтерийный и столбнячный анатоксины; оценка иммуногенности; альтернативный метод оценки; метод иммуноферментного анализа; серологический тест ИФА; вакцина против дифтерии; вакцина против столбняка

Для цитирования: Комаровская Е.И., Солдатов А.А. Изучение иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам серологическим методом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):321–332. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-321-332>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

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

Evaluation of the immune response to diphtheria and tetanus toxoids by the serological methods

Elena I. Komarovskaya ✉, Aleksandr A. Soldatov

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

✉ Elena I. Komarovskaya; komarovskaya@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. Currently, two types of methods are used to evaluate the potency of diphtheria and tetanus toxoids: the gold standard, which involves administering toxins to immunised animals, and serological methods, which involve quantifying protective antibodies in the serum of immunised animals. International validation studies of serological methods for assessing the potency of diphtheria and tetanus toxoids have resulted in revisions to the relevant chapters of the WHO Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines, as well as the European, Japanese, and several other pharmacopoeias. Consequently, some diphtheria and tetanus vaccine manufacturers have substituted the potency evaluation methods that require administering toxins to animals with alternative serological methods.

Aim. The study aimed to assess the suitability, reproducibility, and feasibility of an alternative enzyme immunoassay method (ELISA) for assessing the potency of diphtheria and tetanus components of diphtheria, tetanus, and whole-cell pertussis (DTwP) vaccines and to determine the possibility of implementing this method in Russia using standards and reagents manufactured in the country.

Materials and methods. The study used combined vaccines for diphtheria prophylaxis, diphtheria toxin, and reference vaccines. The potency of diphtheria and tetanus toxoids was determined in guinea pigs and mice by the pharmacopoeial lethal challenge method and an alternative ELISA method.

Results. ELISA and lethal challenge methods demonstrated comparable results of potency determination: 230 IU/mL vs 264 IU/mL (diphtheria toxoid), 188 IU/mL vs 160 IU/mL (tetanus toxoid), respectively. As opposed to the lethal challenge, the serological method allows testing the efficacy of several antigens in the same animals. The study showed the possibility of using purified diphtheria and tetanus toxoids manufactured in Russia as coating antigens. The authors obtained comparable antibody titres for each animal, using plates coated with international standards and Russian-made diphtheria and tetanus toxoids.

Conclusions. The authors demonstrated the possibility of using ELISA to determine the potency of diphtheria and tetanus toxoids in DTwP vaccines. Moreover, the study demonstrated the suitability of Russian purified diphtheria and tetanus toxoids as coating antigens. Researchers should continue working on enzyme immunoassay validation with a view to harmonising national and international methods for assessing the potency of diphtheria and tetanus toxoid vaccines, as these efforts will not only facilitate the registration of foreign vaccines in Russia but also accelerate the approval of Russian vaccines in other countries.

Key words: diphtheria and tetanus toxoids; alternative immunogenicity assay; enzyme immunoassay; serological enzyme immunoassay; ELISA; diphtheria vaccine; tetanus vaccine

For citation: Komarovskaya E.I., Soldatov A.A. Evaluation of the immune response to diphtheria and tetanus toxoids by the serological methods. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):321–332. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-321-332>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 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.

Введение

Дифтерия и столбняк представляют собой заболевания, клинические проявления которых связаны с действием токсинов, выделяемых бактериями *Corynebacterium diphtheriae* и *Clostridium tetani* соответственно. Иммуитет к обоим заболеваниям зависит главным образом от присутствия антитоксических антител класса IgG, способных связываться с токсином и нейтрализовать его. Иммунизация вакцинами против дифтерии и столбняка, стимулируя выработку протективных антител, нейтрализующих токсины, защищает от этих болезней. Это наиболее широко используемые во всем мире вакцины. Они получают путем химической инактивации соответствующих токсинов, в результате чего образуются дифтерийный анатоксин (ДА) и столбнячный анатоксин (СА). Данные вакцины — ключевые компоненты всех национальных программ иммунизации детей, также используются во всем мире для повышения ранее выработанного иммунитета у подростков и взрослых.

В состав многих комбинированных вакцин входят ДА и СА, которые также выпускаются в виде монопрепаратов. Чаще всего ДА (D) и СА (T) используют в сочетании с коклюшной вакциной, цельноклеточной (wP) или бесклеточной (aP). Современные комбинации также могут включать инактивированные полиомиелитные компоненты (IPV), а также компоненты вакцины против гепатита В (HepB) и (или) *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), они представлены на рынке в качестве тетра-, пента- или гексавалентных препаратов. К ним относится, например, DTwP-HepB-Hib — Pentavac® (Serum Institute of India, Ltd., Индия), DTaP-Hib-IPV — Пентаксим® (Sanofi Pasteur, Ltd, Франция).

В настоящее время в Европе лицензировано более 15 комбинаций вакцин, содержащих ДА и СА, различных производителей [1]. В Российской Федерации зарегистрировано 7 комбинированных вакцин отечественного производства, 4 — иностранных производителей¹.

Оценка иммуногенности (эффективности) ДА и СА основана на методах *in vivo* — сравнение уровня защиты от летальных доз токсина, вызываемой у иммунизированных животных испытываемой вакциной, с уровнем защиты, которую вызывает введение референс-препарата (эталона), откалиброванного в международных единицах (МЕ).

Методы с введением летальных (ДА и СА) или парализующих (СА) доз токсинов приняты в качестве международного золотого стандарта и применялись на практике с 1950-х годов до настоящего времени. В то же время производители вакцин начали поиск альтернативных методов оценки иммуногенности. Развитие альтернативных серологических методов было продиктовано следованием принципам 3R (replacement, reduction, refinement — замена, сокращение, совершенствование), сформулированным в 1959 г. W.M.S. Russell и R.L. Burch. Данная концепция вызвала широкий интерес в научном сообществе и стимулировала разработку новых альтернативных методов. Развитие альтернативных серологических методов привело к тому, что они были включены в Руководство ВОЗ по контролю качества АКДС-вакцины², Европейскую фармакопею (ЕФ)³, Японскую фармакопею⁴. Европейские производители вакцин применяют серологические методы в производственном процессе, они включены в нормативную документацию для контроля качества вакцин органами-регуляторами [2–5].

¹ <https://www.grls.rosminzdrav.ru>

² WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

³ Assay of diphtheria vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.6 version 01/2008:20706. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019.

Assay of tetanus vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.8 version 01/2008:20708. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019.

⁴ Minimum requirements for biological products. National Institute of Infectious Diseases, Japan.

В настоящее время применяемые в мире методы определения иммуногенности могут быть разделены на две категории: *in vivo* — иммунизация животных с последующим введением токсина и определением защитного действия вакцин, *in vivo*, и *in vitro* — иммунизация животных с последующим определением уровня защитных антител в сыворотке крови, т.е. альтернативные серологические методы.

Оценку активности ДА и СА при помощи альтернативных серологических методов проводят путем сравнения гуморального ответа, индуцированного через 5–6 нед. у животных, иммунизированных тестируемой вакциной, и у животных, иммунизированных эталонным препаратом, откалиброванным в МЕ.

В международной практике существуют следующие серологические методы обнаружения антител, специфичных к дифтерийному и столбнячному анатоксинам.

Метод иммуноферментного анализа для определения уровня антител к возбудителям дифтерии и столбняка

Для определения титра антител 96-луночные планшеты высокой сорбции покрывают очищенным неадсорбированным дифтерийным (или столбнячным) анатоксином. Специфичные к возбудителям дифтерии (или столбняка) антитела, связанные с анатоксином, выявляют при помощи IgG морской свинки, конъюгированных с пероксидазой хрена с последующим добавлением подходящего субстрата — ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид) или АБТС (2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоислоты) диаммониевая соль). Измеряют оптическую плотность (optical density, OD) и рассчитывают титр антител для каждого отдельного образца сыворотки относительно положительного контроля, стандарт NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control — Национальный институт биологических стандартов и контроля, Великобритания).

В международных коллаборативных испытаниях показана возможность использования сыворотки крови одного животного для определения иммуногенности как ДА, так и СА; выявлено, что развитие окраски лунок прямо пропорционально концентрации дифтерийных и столбнячных антител в образце [6–8].

Важное преимущество этого метода состоит в том, что полученные сыворотки крови исполь-

зуют для определения активности как дифтерийного, так и столбнячного анатоксинов.

В настоящее время метод определения иммуногенности ДА и СА при помощи метода иммуноферментного анализа (ИФА) включен в Руководство ВОЗ⁵, ЕФ⁶.

Определение уровня антител к возбудителю дифтерии клеточным методом (на культуре клеток Vero)

Основой для разработки данного метода послужил токсин-нейтрализующий тест (ТНТ), утвержденный Национальным Институтом здоровья (National Institutes of Health, США) в 1947 г. для определения иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов [9]. В 1957 г. К. Miyamura с соавт. впервые показал, что дифтерийный токсин подавляет рост клеточной культуры Vero. В 1970-х годах тест был преобразован в анализ на микропланшетах. Метод с использованием культивируемых клеток Vero (ТНТ *in vitro*) считается альтернативой теста ТНТ *in vivo*. Клетки Vero были идентифицированы как подходящая модель для специфического обнаружения защитных антител к дифтерии в сыворотке как человека, так и животных [10–12].

Тест отличается длительная подготовка клеточной линии для анализа: до достижения концентрации 4×10^5 клеток/мл, а также определение минимальной цитопатической дозы дифтерийного токсина как наименьшей концентрации токсина (Lf/мл), которая способна вызвать цитопатические эффекты в клетках Vero после 6 сут инкубирования в культуре.

Для анализа нейтрализации токсина образцы сывороток помещают в планшет для тканевых культур, вносят дифтерийный токсин. Нейтрализованный токсин выявляют добавлением клеток Vero, погибающих в присутствии токсина, который не подвергся нейтрализации, в инкубационной смеси. Чем больше нейтрализующих антител присутствует в сыворотке, тем в большем числе разведений будет присутствовать положительный рост клеток. При помощи красителя (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ), способного по-разному окрашивать живые и мертвые клетки, определяют метаболическую активность клеток (МТТ-анализ). Измеряют OD, концентрацию исследуемых образцов сыворотки, рассчитывают относительно эталонного стандарта и выражают

⁵ WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

⁶ Assay of diphtheria vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.6 version 01/2008:20706. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019.

в МЕ/мл. Специфическую активность рассчитывают методом параллельных линий. Необходимо подчеркнуть, что чувствительность к дифтерийному токсину клеточной культуры различается для каждой серии, в связи с этим минимальную цитопатическую дозу необходимо определять для каждого исследования⁷.

В настоящее время метод определения иммуногенности ДА на культуре клеток Vero включен в Руководство ВОЗ⁸, ЕФ⁹.

Определение уровня антител к дифтерийному анатоксину в реакции пассивной (непрямой) гемагглютинации

Реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА) с 1950-х годов применяют для определения уровня антител в сыворотке крови иммунизированных животных и человека. Используют сенсibilизированные дифтерийным анатоксином, предварительно формализированные и танизированные, эритроциты барана, индейки, лошади или человека, агглютинирующие в последствии со специфическими антителами. Метод РПГА прост в выполнении и не требует специального лабораторного оснащения, легко воспроизводим и чувствителен, а также позволяет получить результаты уже через 1 ч. Анализ результатов некоторых исследований показывает высокую корреляцию РПГА с результатами теста ТНТ и методом летального заражения [13, 14]. В то же время в Руководстве по лабораторным методам ВОЗ¹⁰ отмечено, что вопрос о степени корреляции между индивидуальными титрами антител, обнаруженными при помощи РПГА и методом ТНТ, остается дискуссионным. С другой стороны, РПГА надежен в тех случаях, когда необходимо сравнение уровня стимуляции иммунного ответа антител у животных, иммунизированных исследуемой вакциной и референс-вакциной, т.е. определение титра защитных антител не актуально. Вследствие этого в Руководстве по лабораторным методам ВОЗ РПГА рекомендовано рассматривать как вторичный метод для определения иммуногенности вакцин.

Следует отметить, что метод РПГА не стандартизирован. Национальные лаборатории каждой страны определяют вид животного, эритроциты которого применяют в методе, а также способы танизации и формализации. Метод внесен в Японскую фармакопею.

Определение уровня антител к возбудителю столбняка методом ингибирования связывания токсина (ToBI)

Метод ингибирования связывания токсина (Toxin-Binding Inhibition, ToBI) — модифицированный метод ИФА. Анализ состоит из двух этапов:

- 1) инкубация испытуемых сывороток и сывороток положительного и отрицательного контроля с известным количеством столбнячного токсина (или анатоксина);
- 2) определение несвязанного токсина (или анатоксина) методом ИФА.

Несвязанный токсин (или анатоксин) выявляют с помощью противостолбнячной сыворотки, нанесенной на лунки микропланшета. После удаления из лунок свободных реагентов оценивают количество токсина (или анатоксина), связавшегося с сывороткой путем последовательной инкубации со специфическим IgG морской свинки, конъюгированным с пероксидазой хрена, и последующей хромогенной реакции с субстратом ТМБ и H₂O₂. В результате реакции содержимое лунок окрашивается в желтый цвет, интенсивность которого измеряется при помощи соответствующего оборудования. Специфическую активность анализируемой вакцины рассчитывают путем интерполяции полученных результатов на кривую для стандартного образца и выражают в МЕ/мл.

В настоящее время метод включен в Руководство ВОЗ¹¹, ЕФ¹².

В России для определения иммуногенности вакцин против дифтерии и столбняка с 1960-х годов используют метод летального заражения¹³ для вакцин со сниженным содержанием антигенов — метод анализа вы-

⁷ WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

⁸ Там же.

⁹ Assay of diphtheria vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.6 version 01/2008:20706. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019.

¹⁰ WHO/VSQ/97.04. Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization. WHO; 1997.

¹¹ WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

¹² Assay of diphtheria vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.6 version 01/2008:20706. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019.

¹³ ОФС.1.7.2.0003.15 Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

живаемости¹⁴ [15], альтернативные методы для определения специфической активности вакцин для профилактики дифтерии и столбняка не разрабатывались.

В связи с активным развитием и применением в мире альтернативных методов контроля очевидна актуальность и необходимость установить возможность применения данных методов, в частности ИФА, для вакцин российского производства. Это позволит гармонизировать фармакопейные требования по подтверждению специфической активности вакцин отечественного производства с требованиями ведущих фармакопей мира, повысить конкурентоспособность российских вакцин.

Определение иммуногенности вакцин иммунохимическим методом

В расширенных международных исследованиях выявлено, что в серологическом тесте ИФА цельноклеточный коклюшный компонент комбинированных вакцин может влиять на результаты испытаний. Присутствие в таких вакцинах инактивированных полиомиелитных компонентов (IPV), компонентов вакцины против гепатита В и (или) антигена *H. influenzae* типа *b* также могут искажать результаты опыта [6–8].

Согласно рекомендациям ВОЗ¹⁵ для внедрения в практику нового альтернативного метода следует подтвердить его эквивалентность тесту летального заражения с использованием вакцин отечественного производства.

Цель работы – оценить пригодность, воспроизводимость и возможность внедрения в отечественную практику альтернативного метода иммуноферментного анализа при определении иммуногенности дифтерийного и столбнячного компонентов комбинированных вакцин с цельноклеточным коклюшным компонентом; изучить возможность использования отечественных стандартных образцов и реактивов.

Для достижения указанной цели решались следующие задачи:

- установить возможность применения ИФА для определения специфической активности ДА и СА в вакцинах против дифтерии и столбняка, содержащих цельноклеточный коклюш-

ный компонент, а также возможность подтверждения критериям приемлемости;

- провести сравнительные испытания альтернативного метода ИФА относительно метода летального заражения (золотой стандарт);
- определить возможность замены международных образцов, применяемых в качестве реактивов, на российские аналоги.

Материалы и методы

Лабораторные животные

Использовались животные, выращенные в условиях конвенционального вивария (питомник «Андреевка», филиал ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России):

- морские свинки аутбредные (самцы и самки, вес от 250 до 300 г);
- мыши белые аутбредные (самки, вес от 18 до 20 г).

В период проведения исследования животных содержали в изолированном помещении конвенционального вивария при температуре +22–24 °С и относительной влажности воздуха не выше 60%, на стандартном рационе кормления, в условиях свободного доступа к корму и воде.

При проведении экспериментов соблюдали общепринятые этические нормы обращения с животными на основе стандартных операционных процедур, которые соответствуют основному международному регулируемому стандарту в области Надлежащей лабораторной практики (GCP) и Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях¹⁶.

Материалы

- 1) Diphtheria Toxoid for use in Flocculation Test, 3rd WHO International Standard, 1870 Lf/ampoule (NIBSC code: 13/212). Возможно использование в качестве покрывающего антигена для определения специфической активности адсорбированного дифтерийного анатоксина в сыворотке крови морских свинок методом ИФА.
- 2) Tetanus Toxoid for use in Flocculation Test, 2nd WHO International Standard, 690 Lf/ampoule (NIBSC code: 04/150). Возможно использование в качестве покрывающего антигена для определения специфической активности адсорби-

¹⁴ ФС.3.3.1.0003.15 Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

¹⁵ Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

¹⁶ ГОСТ 33044–2014. Принципы надлежащей лабораторной практики.

ETS No. 123. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg; 1986.

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

рованного столбнячного анатоксина в сыворотке крови морских свинок методом ИФА.

- 3) Guinea Pig Serum, Diphtheria and Tetanus Antitoxin, Non-WHO Reference Material (NIBSC code: 98/572) – сыворотка морских свинок, иммунизированных адсорбированным дифтерийным и столбнячным анатоксинами, смешанными в соотношении 1:1. Содержит специфические антитела к возбудителям дифтерии и столбняка. Применяется в качестве положительного контроля для определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов в сыворотке крови морских свинок методом ИФА. Каждая ампула содержит 3,1 МЕ дифтерийного антитоксина и 3,5 МЕ столбнячного антитоксина.
- 4) Guinea Pig Serum, Non-WHO Reference Material (NIBSC code: 98/686) – нативная сыворотка крови морских свинок Dunkin-Hartley (Великобритания). Материал может быть использован как негативный контроль в исследованиях по определению иммунного ответа на вакцинацию дифтерийной и столбнячной вакцинами.
- 5) Отраслевой стандартный образец активности адсорбированного дифтерийного анатоксина, ОСО 42-28-250. Специфическая (иммуногенная) активность 330 МЕ/ампула.
- 6) Отраслевой стандартный образец активности адсорбированного столбнячного анатоксина, ОСО 42-28-247. Специфическая (иммуногенная) активность 180 МЕ/ампула.
- 7) Анатоксин дифтерийный очищенный концентрированный жидкий (ОКДА), АО «НПО «Микроген», Россия.
- 8) Анатоксин столбнячный очищенный концентрированный жидкий (ОКСА), АО «НПО «Микроген», Россия.
- 9) Референс-вакцина, стандарт Sanofi Pasteur, Ltd (Франция), серия ADA15G.
- 10) Конъюгат козьего иммуноглобулина с пероксидазой хрена с антителами к IgG морской свинки (Sigma, кат. № A7289).

Методы

Метод летального заражения применяли в соответствии с фармакопейной статьей (ФС) «Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная ад-

сорбированная», метод с одним разведением и метод с тремя разведениями¹⁷.

Метод ИФА использовался в соответствии с Руководством по контролю качества вакцин против дифтерии, столбняка, коклюша (ВОЗ)¹⁸.

Животных иммунизировали, подвергали однократному или многократному анализу (в соответствии с ФС.3.3.1.0010.15¹⁹). Через 6 нед. путем кардиальной пункции проводили забор крови в объеме от 1,5 до 2,5 мл, отделяли сыворотку.

Забор крови методом кардиальной пункции. Животное фиксировали в положении на спине при помощи ассистента. Используя шприц (объем – 5 мл, игла 21G 1,5" (0,8×40 мм), проводили прокол грудной стенки в VI межреберье (локализацию уточняли вручную – как место с самым сильным сердцебиением). Иглу вводили в грудную полость приблизительно на одну треть. Кровь из шприца переливали в предварительно промаркированную пробирку, содержащую гель с активатором свертывания. Для каждого животного использовали отдельный шприц.

Получение сыворотки крови

- 1) Инкубирование пробирок с кровью: в течение 2 ч при +37 °С; далее еще в течение 2 ч при +4 °С.
- 2) Центрифугирование пробирок в течение 20 мин при 2000 rpm (в случае обнаружения в сыворотке клеток крови проводили повторное центрифугирование).
- 3) Инкубирование на водяной бане (+56 °С, 30 мин) сыворотки, перенесенной из центрифуги при помощи пипетки в чистую пробирку. Сыворотку, полученную от каждого животного, разделяли на аликвоты. Если анализ проводили в течение 2 сут после получения сыворотки, пробы хранили при +4 °С, затем их помещали на хранение при –20 °С.

Определение специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов методом ИФА

Для определения титра антител 96-луночные планшеты (NUNC® MaxiSorp®) покрывали (100 мкл на лунку) неадсорбированным ДА (NIBSC 13/212 или ОКДА), разведенным до концентрации 0,5 Лф/мл, или неадсорбированным СА (NIBSC 04/150 или ОКСА), разведенным до концентрации 0,5 Лф/мл, в карбонат-бикарбонат-

¹⁷ ФС.3.3.1.0003.15 Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

¹⁸ WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

¹⁹ ФС.3.3.1.0010.15 Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

²⁰ WHO/IVB/11.11. Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines. WHO; 2013.

ном буфере (рН=9,6). Планшеты инкубировали в течение (20±4) ч при +4 °С, затем промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 0,05% Tween 20 и 0,1% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА). После цикла промывки (300 мкл×3) в каждую лунку вносили 250 мкл блокирующего буферного раствора (0,1 % БСА), инкубировали при +37 °С в течение 1 ч. После второй промывки в лунки рядов В–Н вносили ФСБ по 100 мкл на лунку, затем в ряд А вносили по 200 мкл на лунку контрольные сыворотки и тестируемые образцы (разведение 1:200) согласно схеме (табл. 1), делали серию двукратных разведений.

Планшеты инкубировали при +37 °С в течение 1 ч. После цикла промывки в каждую лунку вносили антигенспецифические IgG-антитела морской свинки, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, кат. № А7289) (100 мкл/

вали при комнатной температуре, затем следовал цикл промывки. Вносили раствор хромогена (ТМБ), реакции давали развиваться в течение 30 мин. Останавливали реакцию внесением 1 М раствора серной кислоты (50 мкл на лунку). Оптическую плотность исследуемого раствора измеряли при длине волны 450 нм (длина волны сравнения – 540 нм). Преобразование данных OD (путем вычитания среднего значения OD холостой пробы) проводили в программе Microsoft Excel, расчет специфической активности – методом параллельных линий с использованием программного обеспечения in-house на платформе SAS® University Edition Software (Sanofi Pasteur, Канада). Данный программный продукт представляет стандартную кривую (4PL) с ассоциированным наклоном и коэффициентом корреляции (R^2); среднееквадратичное отклонение (SD), коэффициент вариации CV (%).

Таблица 1. Схема внесения стандартных и испытуемых образцов для определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов методом ИФА (составлена авторами по данным Руководства по контролю качества вакцин против дифтерии, столбняка и коклюша ВОЗ²⁰)

Table 1. Plate layout of test and reference serum samples for assessing the potency of diphtheria and tetanus toxoids by enzyme immunoassay (prepared by the authors using the WHO Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines²⁰)

Ряд планшета <i>Column</i>	Проба <i>Sample</i>											
	ХП <i>B</i>	ИС 1 <i>TS 1</i>	ИС 2 <i>TS 2</i>	ПК <i>PSC</i>	ИС 3 <i>TS 3</i>	ИС 4 <i>TS 4</i>	ИС 5 <i>TS 5</i>	ПК <i>PSC</i>	ОК <i>NSC</i>	ИС 6 <i>TS 6</i>	ИС 7 <i>TS 7</i>	ИС 8 <i>TS 8</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ХП <i>B</i>	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*
B	ХП <i>B</i>	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
C	ХП <i>B</i>	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
D	ХП <i>B</i>	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
E	ХП <i>B</i>	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16
F	ХП <i>B</i>	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32
G	ХП <i>B</i>	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64
H	ХП <i>B</i>	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ИФА – иммуноферментный анализ; ХП – холостая проба; ИС – исследуемая сыворотка; ПК – положительный контроль; ОК – отрицательный контроль; 1–12 – номер лунки ряда микропланшета. * Фактор разведения.

Note. B, blank control; TS, test serum; PSC, positive serum control; NSC, negative serum control. Numbers 1–12 indicate plate wells. * Dilution ratio.

лунка), разведенные в 1:2000 в ФСБ. Инкубиро-

В случае многодозового анализа программа проводит расчет концентраций определяемого компонента в каждом разведении (МЕ/мл) положительного контроля и испытуемых образцов, определяет среднее геометрическое значение, среднее квадратическое отклонение, доверительный интервал, коэффициент корреляции, критерий Бартлетта, хи-квадрат. Если вакцину исследуют методом однодозового анализа, программа демонстрирует, что содержание анатоксина достоверно выше минимально требуемого.

Достоверность результатов, полученных методом ИФА, оценивали в соответствии со следующими критериями:

- R^2 стандартной кривой не менее 0,95;
- в случае положительной контрольной сыворотки морской свинки должна регистрироваться кривая «доза – ответ» с линейным диапазоном, охватывающим не менее 3 точек;
- в случае отрицательного контрольного образца не должен регистрироваться положительный ответ;
- среднее значение OD холостой пробы не более 0,100.

Результаты и обсуждение

Поскольку существует потенциальная возможность влияния цельноклеточного коклюшного компонента на результат ИФА, для анализа степени влияния проведена следующая серия опытов. Животных иммунизировали АКДС-вакциной (Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная), АДС-М-анатоксином (Анатоксин дифтерийно-столбнячный очищенный, адсорбированный, с уменьшенным содержанием антигенов, жидкий), а также Адасель (Вакцина для профилактики дифтерии (с уменьшенным содержанием антигена), коклюша (с уменьшенным содержанием антигена, бесклеточная) и столбняка, комбинированная, адсорбированная). Адасель использовали в качестве контроля как вакцину, исключающую влияние цельноклеточного коклюшного компонента; АДС-анатоксин применяли в таком же качестве, но со сниженным содержанием антигенов.

На первом этапе исследования выполнена серия опытов по определению активности СА и ДА методом однодозового анализа. Животных иммунизировали эквивалентными дозами (2 МЕ/мл) соответствующей вакцины. Через 6 нед. получали сыворотку крови животных, помещали образцы сывороток на один микропланшет для сравнения значений оптической плотности. Данные величины OD преобразовывали в программе Microsoft Excel: коррекция значений OD, построение кривой стандартного

образца (зависимость OD от логарифма концентрации). По результатам опытов установлено, что значения титров антител к дифтерийному и столбнячному анатоксинам у животных, иммунизированных вакциной сравнения и тестируемыми вакцинами, сопоставимы.

Правильность выполнения подтверждена критериями приемлемости, программным обеспечением in-house на платформе SAS® University Edition Software (Sanofi Pasteur, Канада) и CombiStats® (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM). Однодозовый анализ не ставит задачу определить количественное содержание анатоксинов в препарате, а показывает, что содержание анатоксина достоверно выше минимально требуемого. По результатам представленных опытов содержание СА и ДА в исследуемых вакцинах достоверно выше, чем в вакцине сравнения. Достоверность различия между исследуемой вакциной и вакциной сравнения по результатам шести опытов: $p < 0,05$. Исходя из этого можно заключить, что цельноклеточный коклюшный компонент не оказывает влияния на результаты реакции ИФА при определении титров специфических антител к дифтерийному и столбнячному анатоксинам в сыворотках морских свинок.

Следующий этап исследования – проведение сравнительных испытаний метода ИФА относительно летального заражения (золотой стандарт) методом многодозового анализа. Работу проводили на одних и тех же особях в соответствии с протоколом ранее проведенных коллаборативных испытаний по валидации серологических методов под эгидой EDQM [5–10]: морские свинки были разделены на шесть групп по 10 особей в каждой. Три группы иммунизировали референс-вакциной, разведенной до 4, 2, 1 МЕ/мл, и три группы – испытуемой АКДС-вакциной, разведенной аналогично. Для контроля токсина сформировали три группы, в каждой по пять неиммунизированных морских свинок. Животным подкожно вводили по 1,0 мл соответствующих разведений вакцин. Морские свинки после иммунизации находились под наблюдением 42 сут (6 нед.) вместо 28 сут (4 нед.). На 42-е сутки у животных проводили забор крови (сердечная пункция), получали сыворотку. Через 2 сут после забора крови морским свинкам делали инъекции провокационного дифтерийного токсина, регистрировали количество выживших животных в каждой группе в течение 4 сут. Для подтверждения правильности выбранной дозы контрольного токсина неиммунизированным морским свинкам вводили три дифференцированные дозы токсина

(2, 1, 0,5 Ld_{50} /мл). Результаты, полученные методом летального заражения, для ДА рассчитывали по формуле Кербера. Для определения содержания СА методом летального заражения этой же серии вакцины испытание проводили согласно ФС.3.3.1.0010.15²¹.

Сыворотки исследовали методом ИФА. Полученные значения OD преобразовывали с использованием программы Microsoft Excel, как описано выше, затем обрабатывали при помощи программного обеспечения in-house на платформе SAS® University Edition Software (Sanofi Pasteur, Канада).

Определение специфической активности ДА и СА в составе вакцин, содержащих цельноклеточный коклюшный компонент, продемонстрировало сопоставимые результаты, полученные методами ИФА и летального заражения:

- специфическая активность дифтерийного компонента вакцины АКДС, определенная методом ИФА, составила 230 МЕ/мл, методом летального заражения – 264 МЕ/мл. Нормативные требования к содержанию дифтерийного анатоксина – не менее 60 МЕ/мл;
- специфическая активность столбнячного компонента вакцины АКДС, определенная мето-

дом ИФА, составила 188 МЕ/мл, методом летального заражения (на мышах) – 160 МЕ/мл. Нормативные требования к содержанию столбнячного анатоксина – не менее 120 МЕ/мл.

Следующие эксперименты были посвящены определению возможности замены международных образцов, применяемых в качестве покрывающих антигенов, на российские аналоги. В качестве покрывающего антигена, согласно методике ВОЗ²², используют международные стандарты неадсорбированных дифтерийного (NIBSC 13/212) и столбнячного (NIBSC 04/150) анатоксинов для реакции флуклюации. В Российской Федерации подобные стандартные образцы отсутствуют. Вместе с тем следует учесть, что при производстве АКДС-вакцины получают субстанции, которые представляют собой очищенные концентрированные неадсорбированные анатоксины (дифтерийный и столбнячный) с установленной концентрацией. В следующих опытах мы определяли возможность использования в качестве покрывающих антигенов ОКДА и ОКСА вместо соответствующих международных стандартных образцов. В проведенной серии тестов использовались сыворотки животных, полученные в предыдущих опытах. Раз-

Таблица 2. Сравнение значений титров антител в сыворотке крови иммунизированных АКДС-вакциной морских свинок для определения IgG, специфичных к дифтерийному и столбнячному анатоксинам, с использованием различных покрывающих антигенов

Table 2. Comparison of measurements of diphtheria-specific and tetanus-specific IgG titres in the sera of DTwP-immunised guinea pigs using plates coated with different toxoids

Покрывающий антиген <i>Coating antigen</i>	Образцы сыворотки <i>Serum samples</i>											
	ИС 1 <i>TS 1</i>	ИС 2 <i>TS 2</i>	ИС 3 <i>TS 3</i>	ИС 4 <i>TS 4</i>	t+	ИС 5 <i>TS 5</i>	ИС 6 <i>TS 6</i>	t+	t–	ИС 7 <i>TS 7</i>	ИС 8 <i>TS 8</i>	ИС 9 <i>TS 9</i>
Неадсорбированный дифтерийный анатоксин (NIBSC 13/212) <i>Purified diphtheria toxoid (NIBSC 13/212)</i>	2,73	1,42	1,56	1,83	2,99	1,64	1,42	2,79	0,6	2,61	1,64	1,26
ОКДА (Россия) <i>Purified diphtheria toxoid (Russia)</i>	4,81	3,02	2,18	2,71	3,00	3,33	2,14	2,99	0,9	3,33	2,14	1,59
Неадсорбированный столбнячный анатоксин NIBSC 04/150 <i>Purified tetanus toxoid (NIBSC 04/150)</i>	3,20	2,32	1,93	4,2	3,00	4,27	3,30	3,2	1,0	6,79	4,74	2,99
ОКСА (Россия) <i>Purified tetanus toxoid (Russia)</i>	2,93	2,21	1,84	6,2	3,10	4,20	3,88	4,05	1,3	9,56	5,39	2,97

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. АКДС-вакцина – вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная, цельноклеточная; ИС – исследуемая сыворотка; t+ – сыворотка морских свинок NIBSC 98/572 (положительный контроль); t– – нативная сыворотка морских свинок NIBSC 68/686 (отрицательный контроль), ОКДА – анатоксин дифтерийный очищенный концентрированный жидкий, ОКСА – анатоксин столбнячный очищенный концентрированный жидкий.

Note. DTwP, adsorbed diphtheria, tetanus, and whole-cell pertussis vaccine; TS, test serum; t+, Guinea Pig Serum NIBSC 98/572 (positive control); t–, Guinea Pig Serum NIBSC 98/686 (negative control).

²¹ ФС.3.3.1.0010.15 Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

²² WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

водили ОКДА и ОКСА до концентрации 0,5 Lf/мл. Параллельно те же образцы сывороток исследовали на микропланшетах, покрытых стандартами NIBSC. Получены сопоставимые значения OD (табл. 2) и титров антител каждого животного, что подтвердило потенциальную возможность использовать ОКДА и ОКСА в качестве покрывающих антигенов.

В ходе исследований были определены критические точки методики ИФА: режим инкубации; условия перемешивания при разведении сывороток в лунках микропланшета; срок использования и хранения исследуемых сывороток, не подвергшихся замораживанию; срок хранения планшетов, покрытых антигеном и др.

Заключение

Проведенные исследования комбинированных вакцин отечественного производства позволяют сделать вывод о том, что оцен-

ка специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов в вакцинах против дифтерии и столбняка, содержащих цельноклеточный коклюшный компонент, при помощи метода иммуоферментного анализа возможна. Результаты сравнительного исследования оценки специфической активности методом летального заражения и методом иммуоферментного анализа оказались сопоставимы.

Установлено, что в качестве покрывающего антигена возможно применение неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов российского производства, что позволяет снизить стоимость анализа и зависимость от поставок из-за рубежа.

Необходимо продолжить работу по валидации методики, а также уточнить оптимальные рабочие концентрации неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов в качестве покрывающих антигенов.

Литература/References

1. Stickings P, Rigsby P, Coombes L, Hockley J, Tierney R, Sesardic D. Animal refinement and reduction: alternative approaches for potency testing of diphtheria and tetanus vaccines. *Procedia Vaccinol.* 2011;5:200–12. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.020>
2. Akkermans A, Chapsal JM, Coccia EM, Depraetere H, Dierick JF, Duangkhae P, et al. Animal testing for vaccines. Implementing replacement, reduction and refinement: challenges and priorities. *Biologicals.* 2020;68:92–107. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.07.010>
3. Stalpers CAL, Retmana IA, Pennings JLA, Vandebruiel RJ, Hendriksen CFM, Akkermans AM, Hoefnagel MHN. Variability of *in vivo* potency tests of Diphtheria, Tetanus and acellular Pertussis (DTaP) vaccines. *Vaccine.* 2021;39(18):2506–16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.078>
4. Moreira WC, de Souza Machado N, de Souza Freitas JF, de Almeida AECC, de Moura WC. Alternative potency tests for quality control of immunobiologicals: a critical review of the validation approach. *Vigil Sanit Debate.* 2020;8(1):48–61. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.01259>
5. Lilley E, Isbrucker R, Ragan I, Holmes A. Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals. *Biologicals.* 2021;74:24–7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2021.10.002>
6. Winsnes R, Sesardic D, Daas A, Behr-Gross ME. Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of diphtheria toxoid vaccine (part 2). *Pharmeuropa Bio.* 2006;2006(1):73–88. PMID: 17270133
7. van Ramshorst JD, Sundaresan TK, Ootschoorn AS. International collaborative studies on potency assays of diphtheria and tetanus toxoids. *Bull World Health Organ.* 1972;46(2):263–76. PMID: 4537488
8. Tierney R, Hockley J, Rigsby P, Sesardic D. WHO/BS/10.2150. *International collaborative study: calibration of replacement WHO international standard for tetanus toxoid adsorbed.* World Health Organization; 2010.
9. Keller JE. Overview of currently approved serological methods with a focus on diphtheria and tetanus toxoid potency testing. *Procedia Vaccinol.* 2011;5:192–9. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.019>
10. Dular U. Comparative studies of the *in vivo* toxin neutralization and the *in vitro* Vero cell assay methods for use in potency testing of diphtheria component in combined vaccines/toxoids.: 1: Standardization of a modified Vero cell assay for toxin-antitoxin titration of immunized guinea-pig sera. *Biologicals.* 1993;21(1):53–9. <https://doi.org/10.1006/biol.1993.1046>
11. Miyamura K, Nishio S, Ito A, Murata R, Kono R. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using Vero cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. *J Biol Stand.* 1974;2(3):189–201. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(74\)90015-8](https://doi.org/10.1016/0092-1157(74)90015-8)
12. Miyamura K, Tajiri E, Ito A, Murata R, Kono R. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using Vero cells. II. Comparison with the rabbit skin method and practical application for seroepidemiological studies. *J Biol Stand.* 1974;2(3):203–9. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(74\)90016-x](https://doi.org/10.1016/0092-1157(74)90016-x)
13. Maheshwari SC, Sharma SB, Ahuja S, Saxena SN. The reduction of animal usage by the application of indirect haemagglutination in the potency testing of diphtheria toxoid in combined vaccines. *J Biol Stand.* 1988;16(1):9–14. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(88\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0092-1157(88)90024-8)

14. Комаровская ЕИ, Перелыгина ОВ. Современное состояние методов оценки безопасности и эффективности дифтерийного и столбнячного компонентов комбинированных вакцин. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022;21(3):96–106.

Komarovskaya EI, Perelygina OV. Current state of methods for control the safety and potency of diphtheria toxoid and tetanus toxoid in combined vaccines. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(3):96–106 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-3-96-106>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.И. Комаровская** — анализ, систематизация и обобщение данных научной литературы и нормативной документации, планирование исследования, выполнение экспериментальной части, интерпретация результатов исследования, написание и редактирование текста рукописи, работа с графическим материалом; **А.А. Солдатов** — критический пересмотр и редактирование текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Исследования выполнены в соответствии с принципами, изложенными в основном регулирующем межгосударственном стандарте в области Надлежащей лабораторной практики (GCP) и Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях.

Благодарности. Авторы благодарят А.И. Куряшову, Е.В. Вавилину, инженеров-лаборантов лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, за помощь в выполнении экспериментальной части работы. В планировании экспериментальной части и подведении итогов работы принимала активное участие О.В. Перелыгина (1946–2023), канд. мед. наук, начальник лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.I. Komarovskaya** analysed, collated, and consolidated literature data and regulatory requirements; designed the study; conducted experiments; interpreted the study results; drafted and edited the manuscript; and worked with illustrative material. **A.A. Soldatov** critically revised and edited the manuscript.

Ethics approval. All the experiments were performed according to the principles set forth in the interstate standard on Good Laboratory Practice (GOST 33647-2015) and the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Experiments and Other Scientific Purposes.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to A.I. Kuryashova and E.V. Vavilova, laboratory technicians of the Laboratory of Anatoxins and Antitoxin Products, Testing Centre for Biological Medicinal Products Quality Control, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, for their help with carrying out the experiments. O.V. Perelygina (1946–2023), Doctor of Sciences, Head of the Laboratory of Anatoxins and Antitoxin Products of the Testing Centre for Biological Medicinal Products Quality Control of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, took an active part in planning the experimental part and summing up the results of the work.

Об авторах/Authors

Комаровская Елена Игоревна

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9035-6072>

komarovskaya@expmed.ru

Солдатов Александр Алексеевич, д-р мед. наук

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

soldatov@expmed.ru

Elena I. Komarovskaya

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9035-6072>

komarovskaya@expmed.ru

Aleksandr A. Soldatov, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

soldatov@expmed.ru

Поступила 22.07.2022

После доработки 18.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 22 July 2023

Revised 18 August 2023

Accepted 13 September 2023

УДК 615.371

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-333-347>

Научная статья | Scientific article



Влияние коклюшного токсина и липоолигосахарида *Bordetella pertussis* на специфическую токсичность и защитную активность цельноклеточной коклюшной вакцины

И.А. Алексеева[✉], И.В. Ибрагимхалилова, Д.Н. Лепихова

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

✉ Алексеева Ирина Андреевна; Alekseeval@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Главными факторами, определяющими реактогенность коклюшной цельноклеточной вакцины, принято считать содержание липоолигосахарида *Bordetella pertussis* и остаточное содержание активного коклюшного токсина. Изучение токсического воздействия коклюшных компонентов бактериальной клетки *B. pertussis* на основные показатели качества цельноклеточной коклюшной вакцины (защитную активность и специфическую токсичность — термины, принятые в рекомендациях ВОЗ и Европейской фармакопее) актуально и необходимо для повышения качества препарата.

Цель. Изучение токсического влияния липоолигосахарида *B. pertussis* и остаточного количества активного коклюшного токсина, присутствующих в цельноклеточной адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцине, на специфическую токсичность и защитную активность препарата.

Материалы и методы. Исследовали 57 коммерческих серий адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины на соответствие показателей качества требованиям нормативной документации. К группе 1 отнесли серии, не выдержавшие испытания по показателю «Специфическая токсичность»; к группе 2 — соответствующие требованиям. Защитную активность определяли в тесте экспериментального менингоэнцефалита на мышах линии F1 CBA×C57BL/6j, иммунизированных АКДС- и референс-вакцинами. Специфическую токсичность препарата определяли в тесте изменения массы тела мышей после внутрибрюшинного введения вакцины АКДС. Токсическое действие липоолигосахарида оценивали опосредованно — через изменение массы тела мышей в первые 16–24 ч; коклюшного токсина — на 7-е сутки. Корреляционный анализ тесноты связи между установленными показателями токсического действия исследуемых компонентов и показателями специфической токсичности и защитной активности, полученными в этих же сериях вакцины, проводили при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты. Опосредованно определили токсическое действие липоолигосахарида и остаточного количества активного коклюшного токсина в исследуемых сериях. Коэффициенты корреляции между показателями специфической токсичности и защитной активности вакцины (группа 2) и показателями токсического действия липоолигосахарида составили 0,113 ($p>0,05$) и 0,049 ($p>0,05$) соответственно, для коклюшного токсина — 0,595 ($p<0,01$) и –0,534 ($p<0,01$) соответственно.

Выводы. Выявлено и оценено токсическое действие липоолигосахарида *B. pertussis* и остаточного количества активного коклюшного токсина в цельноклеточной вакцине; установлена обратная корреляционная связь между защитной активностью вакцины и токсическим действием остаточного уровня активного коклюшного токсина. Тесты продемонстрировали, что показатель, оценивающий специфическую токсичность цельноклеточной

коклюшной вакцины, не отражает присутствие и содержание липоолигосахарида в вакцине. Опираясь на результаты исследования, можно утверждать, что в производственных коклюшных штаммах, используемых для изготовления цельноклеточной коклюшной вакцины, целесообразно определять содержание липоолигосахарида *B. pertussis*, что в Российской Федерации в настоящее время не принято.

Ключевые слова: цельноклеточная коклюшная вакцина; ЦКВ; защитная активность и специфическая токсичность вакцины; реактогенность вакцины; токсическое действие коклюшного компонента; липоолигосахарид *Bordetella pertussis*; коклюшный токсин

Для цитирования: Алексеева И.А., Ибрагимхалилова И.В., Лепихова Д.Н. Влияние коклюшного токсина и липоолигосахарида *Bordetella pertussis* на специфическую токсичность и защитную активность цельноклеточной коклюшной вакцины. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):333–347. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-333-347>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

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

Effects of pertussis toxin and *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide on the specific toxicity and potency of whole-cell pertussis vaccines

Irina A. Alekseeva✉, Ilkhamya V. Ibragimkhalilova, Darya N. Lepikhova

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

✉ Irina A. Alekseeva; Alekseeval@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. The content of *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide (LOS) and the residual levels of active pertussis toxin (PT) are generally accepted to be the primary factors that determine the reactogenicity of whole-cell pertussis vaccines. To improve the quality of whole-cell pertussis vaccines, it is both relevant and necessary to study the relationship between the toxicity of *B. pertussis* bacterial cell components and the main quality parameters of these vaccines, including their potency and specific toxicity, as termed in the WHO recommendations and the European Pharmacopoeia.

Aim. This study aimed to analyse the effects of *B. pertussis* LOS and residual active PT on the specific toxicity and potency of adsorbed diphtheria, tetanus, and whole-cell pertussis (DTwP) vaccines.

Materials and methods. The authors tested 57 commercial batches of adsorbed DTwP vaccines for compliance with the regulatory standards and product specification files. Vaccine batches that failed specific toxicity tests formed Group 1, and the other batches were designated as Group 2. The potency was tested in F1 hybrid mice (CBA/Ca×C57BL/6J) with experimentally induced meningoencephalitis that were immunised with DTwP and reference vaccines. The authors assessed the specific toxicity of DTwP vaccines by changes in body weight following intraperitoneal administration. The toxic activity was assessed indirectly by changes in body weight in the first 16–24 h (*B. pertussis* LOS) and on day 7 (PT) after dosing. The authors used Spearman's rank correlation coefficient to measure the strength of correlation between the toxic activity of vaccine components and the specific toxicity and potency of the vaccine, which were established using the same vaccine batches.

Results. The authors measured the toxic activity of LOS and residual active PT in the vaccine batches studied. The correlation coefficients between the specific toxicity and potency of the vaccines (Group 2) and the toxic activity of LOS were 0.113 ($p>0.05$) and 0.049 ($p>0.05$), respectively.

Similarly, the correlation coefficients between the specific toxicity and potency of the vaccines and the toxic activity of PT accounted for 0.595 ($p < 0.01$) and -0.534 ($p < 0.01$), respectively.

Conclusions. The authors studied the toxic activity of *B. pertussis* LOS and residual active PT in whole-cell pertussis vaccines and found an inverse correlation between the potency of the vaccines and the toxic activity of residual active PT. The study demonstrated that the specific toxicity test for whole-cell pertussis vaccines fails to detect and quantify *B. pertussis* LOS in the samples. The authors advise to determine the content of LOS in the *B. pertussis* strains intended for the production of whole-cell pertussis vaccines, which is not yet an accepted practice in the Russian Federation.

Key words: whole-cell pertussis vaccine; wP vaccine; potency; specific toxicity; vaccine reactogenicity; pertussis component toxic activity; *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide; pertussis toxin

For citation: Alekseeva I.A., Ibragimkhalilova I.V., Lepikhova D.N. Effects of pertussis toxin and *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide on the specific toxicity and potency of whole-cell pertussis vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):333–347. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-333-347>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 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.

Введение

Bordetella pertussis — патоген, способный развиваться исключительно в организме человека и вызывать развитие коклюша, высококонтагиозного заболевания дыхательных путей, которое особенно опасно для детей раннего возраста. В современном мире коклюш — серьезная проблема здравоохранения, поскольку служит одной из основных причин смертности среди младенцев [1]¹.

Для борьбы с коклюшем с 1940-х годов в качестве самостоятельного препарата использовали коклюшную цельноклеточную вакцину (ЦКВ), которая в качестве коклюшного компонента с 1960-х годов была введена в состав адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной (АКДС) вакцины.

Широкое использование коклюшной ЦКВ продемонстрировало ее профилактическую эффективность: снижение заболеваемости коклюшем с 400–600 случаев на 100 тыс. населения до спорадических значений [2]². В то же время следует учитывать отрицательную черту ЦКВ — ее реактогенность [3, 4]. В 1990–2000-е годы развитые западные страны в связи с чрезмерными опасениями по поводу ожидаемых поствакцинальных осложнений отказались от применения коклюшной ЦКВ³. Как альтернативу стали применять коклюшную бесклеточную вакцину

(БКВ), в состав которой входит от одного до пяти антигенов: коклюшный анатоксин, филаментозный гемагглютинин, пертактин, фимбриальные агглютиногены 2 и 3 [5, 6].

Постмаркетинговые исследования не подтвердили взаимосвязь между вакцинацией и негативными реакциями организма, такими как повреждение головного мозга, неврологические расстройства, появление или развитие энцефалопатии (ранее подобные проявления приписывались воздействию коклюшной ЦКВ) [7].

Определенные опасения, связанные с возможными поствакцинальными нежелательными явлениями, привели к использованию в развитых странах альтернативной БКВ. Однако во многих странах продолжают производить и широко применять ЦКВ [8]. При сравнительном наблюдении за коклюшными БКВ и ЦКВ отмечено, что в отношении тяжелых поствакцинальных реакций обе вакцины, по-видимому, характеризуются приемлемой токсичностью. Легкие и умеренные поствакцинальные реакции, как установлено, чаще происходят после введения ЦКВ. Разнообразные комбинации БКВ по сравнению с ЦКВ обладают меньшей реактогенностью, но значительно уступают ей в эффективности [9–11].

В настоящее время в профилактической медицине сложилась непростая ситуация. Используются два типа коклюшных вакцин — эффективная

¹ WHO Technical Report Series No. 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. WHO; 2007.

² <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6239md.htm>

³ Prevention and care of illness. Neonates and infants newborn health and survival. A call to action. Geneva: World Health Organization; 2004.

ЦКВ с более высокой реактогенностью, что снижает возможность ее повсеместного применения, и слабо реактогенная БКВ с ограниченной иммуногенной активностью. Показано, что пять прививочных доз коклюшной БКВ не могут сформировать такую же пролонгированную защиту от коклюшной инфекции, которую индуцирует одна доза коклюшной ЦКВ [10]. Вследствие этого в Австралии, развитых странах Европы и Северной Америки, где применяют коклюшную БКВ, наблюдается выраженная тенденция к росту заболеваемости коклюшем, сопровождающаяся эпидемическими вспышками. В научной литературе обсуждается «возрождение» коклюша [11–13].

Проблема «возрождения» коклюша в практике здравоохранения свидетельствует о важности проведения исследований, направленных на повышение качества существующих вакцинных препаратов, которое характеризуется такими показателями, как специфическая токсичность и защитная активность (термины, принятые в рекомендациях ВОЗ и Европейской фармакопее)⁴.

Исследования по повышению защитной активности БКВ должны быть связаны с высокоперспективными направлениями: обнаружение новых защитных антигенов со стабильной структурой, которая не будет меняться в зависимости от селективного давления вакцины; поиск антигенов и адъювантов, корректирующих иммунный Th2-ответ (развивается после использования БКВ) в сторону ответов Th1 и Th17, индуцируемых естественной коклюшной инфекцией и ЦКВ [14]. Одной из важных особенностей новой коклюшной БКВ должна стать ее усиленная способность стимулировать противобактериальный иммунитет. При этом нужно учитывать, что полный цикл разработки новой вакцины — длительный процесс со значительными материальными вложениями.

Напротив, для коклюшной ЦКВ, которая характеризуется высокой защитной активностью и может стать эффективным препаратом при условии снижения ее реактогенности, по-видимому, возможны более простые решения. Одно из них — снижение числа клеток *B. pertussis* в дозе вакцины [15]. Другие подходы — совершенствование технологического процесса изготовления ЦКВ, а также селекция штаммов *B. pertussis*, позволяющая отобрать

при помощи генно-инженерной техники штаммы, продуцирующие приемлемые уровни токсинов [16–18].

В постинфекционном или поствакцинальном иммунитете определенную роль, до конца не ясную, играют бактериальные токсины *B. pertussis* — коклюшный токсин (КТ), дермoneкротический токсин, трахеальный цитотоксин, аденилатциклаза и эндотоксин (липоолигосахарид, ЛОС). Возможна связь между некоторыми токсинами *B. pertussis* и проявлением реактогенности вакцины. Выявление токсического действия препарата — необходимый и важный этап характеристики безопасности вакцины. Используя в настоящей работе термин «показатель токсического действия» компонентов (ЛОС и КТ) вакцины, мы имеем в виду не количественное значение, определяемое каким-либо иммунохимическим методом, а условное, относительное понятие, так как токсическое действие в наших опытах выявлялось опосредованно — через изменение общей массы тела животных, и оценивалось в условных единицах.

Принято считать, что ЛОС и остаточное содержание активного КТ — главные факторы, определяющие реактогенность ЦКВ [19]⁵. В связи с этим представляется актуальным и важным дальнейшее изучение способности токсинов бактериальной клетки *B. pertussis* влиять на безопасность вакцины. Защитная активность — также один из основных и определяющих показателей качества ЦКВ, следовательно, необходимы исследования влияния ЛОС и КТ также и на этот показатель.

Цель работы — изучение токсического влияния липоолигосахарида *B. pertussis* и остаточного количества активного коклюшного токсина, присутствующих в цельноклеточной адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцине, на специфическую токсичность и защитную активность препарата.

Задачи исследования:

- определение токсического действия ЛОС и КТ *B. pertussis* в испытуемых сериях вакцины АКДС;
- проведение корреляционного анализа между показателями токсического действия ЛОС и КТ и показателями специфической токсичности и защитной активности коклюшного компонента, определенных в этих же сериях вакцины.

⁴ Recommendations for whole-cell pertussis vaccine, Annex 6, TRS No 941. WHO; 2007.
Pertussis vaccine (whole cell, adsorbed). European Pharmacopoeia 11.2. Strasbourg; 2023.
2.7.7. Assay of pertussis vaccine (whole cell). European Pharmacopoeia 11.2. Strasbourg; 2023.

⁵ WHO Technical Report Series No. 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. WHO; 2007.

Материалы и методы

Исследовано 57 коммерческих серий вакцины АКДС, поступивших в Испытательный центр экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, для подтверждения соответствия показателей качества препарата требованиям нормативной документации (НД). В цельноклеточном коклюшном компоненте вакцины АКДС определяли два основных показателя качества: защитную активность и специфическую токсичность. В документах Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) эти показатели соответствуют терминам *potency* и *specific toxicity*⁶.

По результатам испытаний 57 серий вакцины были разделены:

- группа 1 – 9 серий вакцины, не выдержавших испытания по показателю «Специфическая токсичность» (токсические свойства превышали допустимый уровень) и забракованных после исследования;
- группа 2 – 48 серий вакцины, соответствующих требованиям НД.

В опытах использовались мыши линии F1 CBA×C57BL/6j. Все исследования проводились в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях⁷, принципами этического кодекса CIOMS «Международные рекомендации по проведению биомедицинских исследований с использованием животных», Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях⁸ (ГОСТ 33216–2014⁹).

Оценку вышеуказанных показателей качества препарата проводили по общепринятым в мировой практике методам, рекомендованным ВОЗ¹⁰ и изложенным в ОФС.1.7.2.0005.15¹¹

и ФС.3.3.1.0010.15¹² Государственной фармакопеи Российской Федерации (XIV изд.). Защитную активность определяли в тесте экспериментального менингоэнцефалита, в соответствии с которым мышам линии F1 CBA×C57BL/6j, иммунизированным АКДС- и референс-вакцинами, интрацеребрально заражали вирулентным штаммом *B. pertussis* 18323. Через 14 сут учитывали число выживших и погибших животных, затем рассчитывали показатель защитной активности вакцины. В качестве референс-вакцины использовали фармакопейный стандартный образец иммуногенной активности коклюшной вакцины ФСО 3.2.00089 (ОСО 42-28-89)¹³, откалиброванный относительно 4-го Международного стандарта коклюшной вакцины, сер. 94/532.

Специфическую токсичность препарата (в %) определяли в тесте изменения массы тела (средние арифметические значения) мышам после внутрибрюшинного введения вакцины АКДС и оценивали по относительному показателю, который рассчитывали на 7-е сутки наблюдения как отношение приростов массы тела вакцинированных мышам и контрольных (им вводили физиологический раствор с консервантом в концентрации, соответствующей таковой в вакцине).

Считается, что колебания массы тела мышам в первые 16–24 ч после введения ЦКВ обусловлены присутствием в вакцине ЛОС, а действие КТ проявляется на 7-е сутки после введения препарата¹⁴.

Говоря о содержании и токсическом действии токсина в препарате, мы имели в виду не количественное значение, которое определяется каким-либо иммунохимическим методом, а условное, относительное, которое выявляется опосредованно через изменение массы тела опытных животных и оценивается в условных единицах. В настоящем исследовании определение токсического действия ЛОС и остаточного содержания активного КТ в коклюшном компоненте вакцины оценивали через изменения

⁶ WHO Technical Report Series No. 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. WHO; 2007.

⁷ https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf

⁸ European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg; 1986. <https://norecopa.no/media/2iydns5h/ets-123-original.pdf>

⁹ ГОСТ 33216–2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

¹⁰ WHO Technical Report Series No. 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. WHO; 2007.

¹¹ ОФС.1.7.2.0005.15 Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018. С. 2760–99.

¹² ФС.3.3.1.0010.15 Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018. С. 5245–54.

¹³ ФСО 3.2.00089 (ОСО 42-28-89). Стандартный образец иммуногенной активности коклюшной вакцины.

¹⁴ WHO Technical Report Series No. 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. WHO; 2007.

массы тела мышей после введения им одной дозы вакцины АКДС. Исходили из того, что выявляемая токсичность пропорциональна содержанию ЛОС и КТ и характеризуется потерей массы мышей. Токсическое действие ЛОС оценивали по изменению массы тела мышей в первые 16–24 ч, а КТ — на 7-е сутки. С этой целью в обеих группах мышей определяли общую массу животных через 24 ч и на 7-е сутки после введения вакцины АКДС. Далее токсическое действие ЛОС выражали через разницу общей массы группы животных до начала испытания (исходная масса) и через 24 ч после него. Токсическое действие КТ рассчитывали как разницу между массой тела мышей на 7-е сутки (проявление действия КТ) и на 2-е (или 3-и) сутки, т.е. в тот период, когда у них восстанавливалась исходная масса тела (до действия ЛОС). Например, если исходная масса тела восстановилась на 2-е сутки, то токсическое действие КТ рассчитывали как разницу значений общей массы тела мышей, измеренной на 7-е и 2-е сутки. Полученные величины, выраженные в абсолютных (г) и относительных (%) значениях, отражали токсическое действие ЛОС и КТ. Абсолютные единицы массы (г) заменили на условные (усл. ед.), токсическое действие ЛОС и КТ выражали в усл. ед., а также через относительные (%) значения изменения массы мышей.

Между показателями специфической токсичности и защитной активности и значениями токсического действия ЛОС и КТ, полученными для этих же серий вакцины, проведен корреляционный анализ при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s), который позволяет определить полноту (силу) и направление корреляционной связи между двумя признаками [20]. Значение p -критерия для коэффициента Спирмена: меньше или равно 0,3 — показатель слабой полноты связи; в диапазоне между 0,4 и 0,7 — умеренной полноты связи; больше или равно 0,7 — высокой полноты связи. В корреляционном анализе использовали следующие пары результатов (значений), полученные при испытании одной и той же серии:

- токсическое действие ЛОС и КТ;
- специфическая токсичность (или защитная активность) вакцины.

Статистическую обработку данных проводили с применением программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Образцы в группе 1 проявляли повышенную остаточную токсичность: показатели 9 серий вакцины, не соответствующих требованиям НД по показателю специфической токсичности,

не достигали 60% (табл. 1), требуемых НД. В таблице 1 приводятся следующие фактические данные: масса тела мышей после введения им дозы вакцины (0,5 мл) — в разные сроки после вакцинации; защитная активность вакцины, определенная в этих же образцах серий. Масса тела животных через 24 ч после введения препарата опосредованно отражает влияние токсического действия ЛОС, а на 7-е сутки — токсического действия остаточного содержания активного КТ.

Представленные в таблице 1 данные использовали в корреляционном анализе для определения взаимосвязи между значениями, отражающими токсическое действие ЛОС и КТ, и значениями специфической токсичности и защитной активности образцов вакцин. Так, для выявления взаимосвязи между токсическим действием ЛОС и специфической токсичностью препарата проводили корреляционный анализ между парами значений, отражающими потерю общей массы мышей в группе через 24 ч, и показателями специфической токсичности. Например, между парами –6,5 и 49, –6,1 и 49,4 и т.д. Для определения взаимосвязи между значениями, отражающими токсическое действие ЛОС, и показателями защитной активности использовали аналогичные пары значений, например –6,5 и 10,9, –6,1 и 9,5 и т.д.

Таким же образом выявляли взаимосвязь токсического действия остаточного уровня активного КТ и показателей специфической токсичности и защитной активности вакцины.

В таблице 2 представлены установленные значения коэффициентов корреляции между значениями токсического действия ЛОС и КТ и показателями специфической токсичности и защитной активности, определенными в этих же сериях вакцины АКДС.

Значение коэффициента корреляции (см. табл. 2) между показателями (в усл. ед.), отражающими токсическое действие ЛОС в разных сериях вакцины в группе 1, и показателями специфической токсичности для этих же серий вакцины составляет 0,899 ($p < 0,01$), что выявляет прямую, высокую и достоверную тесноту связи. Та же зависимость между значениями токсического действия ЛОС (в %) и показателями специфической токсичности этих же серий характеризуется коэффициентом 0,851 ($p < 0,05$), что подтверждает прямую, высокую и достоверную тесноту связи. Установленные в работе коэффициенты корреляции указывают на значительное влияние ЛОС на остаточную токсичность вакцины.

Корреляционный анализ между токсическим действием ЛОС (в усл. ед.) и защитной активно-

Таблица 1. Влияние коклюшного компонента серий вакцины АКДС с повышенной остаточной токсичностью на показатели качества препарата в группе 1 ($n=9$)**Table 1.** Influence of the pertussis component of DTP vaccines with increased residual toxicity on the quality of vaccine batches in Group 1 ($n=9$)

Номер образца <i>Sample No.</i>	Масса тела мышей <i>Total body weight of mice</i>						Специфи- ческая токсич- ность, % <i>Specific toxicity, %</i>	Защитная активность, МЕ/мл <i>Potency, IU/mL</i>
	До введения вакцины (исходная), г <i>Before vaccine administration (baseline weight), g</i>	После введения вакцины <i>After vaccine administration</i>						
		Через 24 ч <i>In 24 h</i>		На 2- е (или 3-и) сутки, г <i>Day 2 (or 3), g</i>	На 7- е сутки, г <i>Day 7, g</i>	Прирост за период меж- ду 2 (или 3) и 7-ми сутками, г (%) <i>Weight gain between days 2 (or 3) and 7, g (%)</i>		
		Абсолютное значение, г <i>Absolute value, g</i>	Изменение (от исходной массы), г (%) <i>Weight loss (change from the baseline), g (%)</i>					
1	153,9	147,4	−6,5 (−4,2)	156,1	178,9	22,8 (14,8)	49	10,9
2	152,5	146,4	−6,1 (−4,0)	155,8	177,7	21,9 (14,4)	49,4	9,5
3	142,1	136,1	−6,1 (−4,3)	143,7	176,3	32,6 (22,9)	53,1	13,9
4	146,0	135,4	−10,7 (−7,3)	147,5	165,0	17,5 (12,0)	41,9	14,8
5	147,8	134,8	−13,0 (−8,8)	153,5	163,8	10,3 (7,0)	40,5	15,6
6	148,5	138,1	−10,5 (−7,0)	154,5	165,0	10,5 (7,1)	36,5	12,3
7	156,7	153,2	−3,5 (−2,2)	159,0	188,7	29,7 (19,0)	59,8	8,3
8	146,5	—	—	147,8	166,7	18,9 (13,0)	32,8	15,1
9	152,3	148,9	−3,4 (−2,2)	157,1	199,0	41,9 (27,5)	58,8	12,9

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. АКДС — адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина; «—» — не измеряли.

Note. DTP, adsorbed diphtheria-tetanus-pertussis vaccine; —, not measured.

стью коклюшного компонента вакцины показал обратную умеренную недостоверную тесноту связи ($r_s = -0,589$, $p > 0,05$). Коэффициент корреляции между ЛОС (в %) и защитной активностью отражает обратную высокую достоверную тесноту связи ($r_s = -0,756$, $p < 0,05$), что демонстрирует возможное отрицательное влияние ЛОС бактериальной клетки на индукцию противококлюшного иммунитета.

Токсическое действие остаточного уровня активного КТ, присутствующего в вакцине, коррелирует с полученными значениями специфической токсичности, демонстрируя прямую высокую тесноту связи: $r_s = 0,817$ ($p < 0,05$) — для значения, выраженного в усл. ед.; $r_s = 0,817$ ($p < 0,05$) — для значения, выраженного

в %. Можно заключить, что чем выше токсическое действие КТ, тем выше специфическая токсичность препарата.

Полученные результаты в группе 1 указывают на несколько более выраженное влияние ЛОС по сравнению с КТ, на формирование специфической токсичности вакцины. Для ЛОС, выраженного в усл. ед. и %, коэффициенты корреляции составили 0,899 ($p < 0,01$) и 0,851 ($p < 0,05$) соответственно. Коэффициенты для КТ (усл. ед. и %), отражающие корреляцию между токсическим действием КТ и показателями специфической токсичности: 0,817 ($p < 0,05$) и 0,817 ($p < 0,05$) соответственно.

Установлено, что три четверти поверхности клеточной стенки занимают молекулы ЛПС (или

Таблица 2. Влияние ЛОС и остаточного количества активного КТ на показатели специфической токсичности и защитной активности коклюшной ЦКВ в группе 1 ($n=9$)**Table 2.** Effects of the *B. pertussis* LOS and residual active PT levels on the specific toxicity and potency of wP vaccine batches in Group 1 ($n=9$)

Показатель токсического действия <i>Toxic activity</i>	Значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s) для показателя <i>Spearman's rank correlation coefficient (r_s) for</i>	
	Специфическая токсичность вакцины, <i>p</i> -критерий <i>Specific toxicity, p-value</i>	Защитная активность вакцины, <i>p</i> -критерий <i>Potency, p-value</i>
ЛОС: <i>LOS:</i> – усл. ед. – а. у. – %	0,899, $p<0,01$ 0,851, $p<0,05$	–0,589, $p>0,05$ –0,756, $p>0,05$
КТ: <i>PT:</i> – усл. ед. – а. у. – %	0,817, $p>0,05$ 0,817, $p>0,05$	–0,45, $p>0,05$ –0,45, $p>0,05$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ЛОС – липоолигосахарид *Bordetella pertussis*, КТ – коклюшный токсин *B. pertussis*; ЦКВ – цельноклеточная коклюшная вакцина.*Note.* LOS, lipo-oligosaccharide; PT, pertussis toxin; wP, whole-cell pertussis vaccine; a.u., arbitrary units.

ЛОС в случае *B. pertussis*), остальное пространство занимают белки [21]. Возможно, значительное содержание ЛОС в клеточной стенке грамотрицательных бактерий обуславливает выраженное токсическое влияние на организм мыши [22].

Взаимосвязь между токсическим действием КТ в дозе вакцины и защитной активностью коклюшного компонента этой же серии препарата характеризуется обратной умеренной недостоверной теснотой связи. Так, для показателя токсического действия КТ, выраженного в усл. ед. и %, коэффициент корреляции одинаков: –0,45 ($p>0,05$).

Если сравнить влияние ЛОС и КТ на формирование противокклюшного иммунитета у животных, вакцинированных препаратами группы 1, то можно отметить, что ЛОС оказывает более выраженное отрицательное воздействие на защитную активность ЦКВ по сравнению с КТ: коэффициенты корреляции составили –0,756 ($p<0,05$) и –0,45 ($p>0,05$) для ЛОС и КТ соответственно.

В таблице 3 представлены результаты испытаний на мышах, вакцинированных сериями АКДС, соответствующими требованиям НД. Эти данные отражают влияние коклюшного компонента на показатели качества препарата.

Корреляционный анализ между токсическим действием ЛОС и КТ и показателями специфической токсичности и защитной активности серий вакцин АКДС в группе 2 (табл. 4) проводили аналогично анализу данных по группе 1.

Группы 1 и 2 значительно отличаются по показателю взаимосвязи между токсическим дей-

ствием ЛОС в дозе вакцины и специфической токсичностью вакцины: в группе 1 (вакцины с повышенной остаточной токсичностью) выявлена прямая высокая достоверная теснота связи; в группе 2 (вакцины, соответствующие требованиям) – слабая недостоверная. Так, коэффициенты корреляции для токсического действия ЛОС, выраженного в усл. ед. и %, в группе 2 составили 0,113 ($p>0,05$) и 0,121 ($p>0,05$) соответственно против 0,899 ($p<0,01$) и 0,851 ($p<0,05$) в группе 1 соответственно.

Так же резко отличаются обе группы по показателю взаимосвязи между токсическим действием ЛОС (в %) в одной дозе вакцины и защитной активностью данной серии вакцины: высокая обратная теснота связи показателей в группе 1 (–0,756 ($p<0,05$)) и слабая и недостоверная связь в группе 2 (0,045 ($p>0,05$)). Коэффициент корреляции, отражающий указанную взаимосвязь для показателя ЛОС (в усл. ед.), в группе 2 составил 0,049 ($p>0,05$) против –0,756 ($p<0,05$) в группе 1.

Взаимосвязь между токсическим действием остаточного количества активного КТ и показателями специфической токсичности препарата по сравнению с группой 1 (высокая достоверная теснота связи) в группе 2 несколько иная – выявлена умеренная достоверная теснота связи. Так, коэффициент корреляции составил 0,595 ($p<0,01$) для показателя токсического действия КТ, выраженного в усл. ед., и 0,546 ($p<0,01$) – для такового, рассчитанного в %.

В группе 2 взаимосвязь между токсическим действием КТ и защитной активностью вакцины

Таблица 3. Влияние коклюшного компонента серий вакцины АКДС ($n=48$) на показатели качества препарата (группа 2)
Table 3. Influence of the pertussis component of DTP vaccines on the quality of vaccine batches in Group 2 ($n=48$)

Номер образца <i>Sample No.</i>	Масса тела мышей <i>Total body weight of mice</i>						Специфи- ческая ток- сичность, % <i>Specific toxicity, %</i>	Защитная активность, МЕ/мл <i>Potency, IU/ mL</i>
	До введения вакцины (исходная), г <i>Before vaccine administration (baseline weight), g</i>	После введения вакцины <i>After vaccine administration</i>						
		Через 24 ч <i>In 24 h</i>		На 2-е (или 3-и) сутки, г <i>Day 2 (or 3), g</i>	На 7-е сутки, г <i>Day 7, g</i>	Прирост за пе- риод между 2 (или 3) и 7-ми сутками, г (%) <i>Weight gain between days 2 (or 3) and 7, g (%)</i>		
		Абсолютное значение, г <i>Absolute value, g</i>	Изменение (от исходной массы), г (%) <i>Weight loss (change from the baseline), g (%)</i>					
1	144,6	135,9	-8,7 (-6,0)	153,9	230,4	76,5 (52,9)	109,3	—
2	147,2	149,3	2,2 (-1,5)	149,4	202,0	52,6 (35,7)	101,9	8,2
3	152,4	140,8	-11,6 (-7,6)	153,1	220,1	67,0 (44,0)	100,1	8,0
4	157,1	145,6	-11,5 (-7,3)	160,1	228,6	68,5 (43,6)	105,8	8,1
5	151,3	147,4	-3,9 (-2,6)	157,5	215,0	57,5 (38,0)	78,4	8,9
6	148,5	139,4	-9,1 (-6,1)	151,7	180,9	29,2 (19,7)	65,3	—
7	158,3	152,8	-5,5 (-3,5)	160,0	201,8	41,8 (26,4)	63,8	—
8	163,1	154,1	-9,0 (-5,5)	166,1	214,8	48,7 (29,9)	71,0	8,2
9	159,1	152,5	-6,6 (-4,1)	162,5	213,4	50,9 (32,0)	74,5	—
10	142,0	152,3	10,3 (-7,3)	152,3	202,1	49,8 (35,1)	101,5	8,0
11	151,3	144,3	-7,0 (-4,6)	155,3	184,1	28,8 (19,0)	62,8	14,9
12	149,2	144,7	-4,5 (-3,0)	149,2	186,3	37,1 (24,9)	70,0	8,2
13	142,9	145,7	2,8 (-1,95)	150,9	193,6	42,7 (29,9)	60,7	11,2
14	154,5	143,7	-10,8 (-6,9)	154,5	188,3	33,8 (21,9)	60,0	19,9
15	152,6	145,4	-7,2 (-4,7)	154,3	189,0	34,7 (22,7)	65,7	—
16	151,3	147,3	-4,0 (-2,6)	156,4	196,6	40,2 (26,6)	76,4	13,2
17	147,4	139,8	-7,6 (-5,2)	147,4	182,4	35,0 (23,8)	60,0	12,3
18	146,0	143,1	-2,9 (-2,0)	152,5	197,1	44,6 (30,6)	79,7	—
19	153,8	146,9	-6,9 (-4,5)	156,8	195,1	38,3 (24,9)	64,6	8,9
20	150,2	143,1	-7,1 (-4,7)	—	199,0	—	68,8	8,7
21	147,2	149,7	2,2 (1,7)	149,7	188,2	38,5 (26,2)	67,1	16,9
22	146,0	141,9	-4,1 (-2,8)	153,6	198,1	44,5 (30,5)	64,1	12,1
23	148,2	144,7	-3,5 (-2,4)	151,7	191,4	39,7 (26,8)	68,2	8,2
24	146,7	149,3	2,6 (-1,8)	149,3	193,8	44,5 (30,3)	74,4	14,1
25	147,5	144,4	-3,1 (-2,1)	152,4	196,8	44,4 (30,1)	64,8	11,8

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Номер образца <i>Sample No.</i>	Масса тела мышей <i>Total body weight of mice</i>						Специфи- ческая ток- сичность, % <i>Specific toxicity, %</i>	Защитная активность, МЕ/мл <i>Potency, IU/ mL</i>
	До введения вакцины (исходная), г <i>Before vaccine administration (baseline weight), g</i>	После введения вакцины <i>After vaccine administration</i>						
		Через 24 ч <i>In 24 h</i>		На 2-е (или 3-и) сутки, г <i>Day 2 (or 3), g</i>	На 7-е сутки, г <i>Day 7, g</i>	Прирост за пе- риод между 2 (или 3) и 7-ми сутками, г (%) <i>Weight gain between days 2 (or 3) and 7, g (%)</i>		
		Абсолютное значение, г <i>Absolute value, g</i>	Изменение (от исходной массы), г (%) <i>Weight loss (change from the baseline), g (%)</i>					
26	144,5	142,2	-2,3 (-1,6)	151,4	190,2	38,8 (26,9)	62,2	20,1
27	144,1	141,6	-2,5 (-1,7)	151,0	188,9	37,9 (26,3)	61,0	12,1
28	148,0	143,6	-4,4 (-2,9)	—	182,5	—	60,6	16,0
29	150,2	145,5	-4,7 (-3,1)	153,0	188,3	35,3 (23,5)	70,3	9,9
30	150,1	—	—	151,2	185,2	34,0 (22,7)	78,9	10,5
31	147,0	—	—	152,8	179,6	26,8 (18,2)	73,3	17,8
32	150,7	—	—	151,8	180,5	28,7 (19,0)	67,0	17,0
33	148,5	—	—	150,3	178,8	28,5 (19,2)	68,1	15,2
34	155,3	149,0	-6,3 (-4,1)	155,3	186,6	31,3 (20,2)	60,3	9,1
35	148,4	140,8	-7,6 (-5,1)	149,4	183,4	34,0 (22,9)	60,1	8,7
36	155,2	150,0	-5,2 (-3,4)	158,4	199,7	41,3 (26,6)	67,7	15,1
37	151,2	152,5	1,3 (-0,9)	152,5	189,8	37,3 (24,7)	60,0	10,4
38	145,9	141,1	-4,8 (-3,3)	152,4	198,6	46,2 (31,7)	76,7	9,9
39	152,0	139,4	-12,6 (-8,3)	158,3	176,4	18,1 (11,9)	61,8	17,1
40	141,6	137,2	-4,4 (-3,1)	143,2	178,1	34,9 (24,6)	60,3	16,2
41	151,2	151,1	-0,1 (-0,07)	151,1	192,4	41,3 (27,3)	60,7	13,4
42	147,8	145,1	-2,7 (-1,8)	152,0	187,7	35,7 (24,2)	70,7	11,2
43	147,5	141,0	-6,5 (-4,4)	—	181,5	—	60,9	11,2
44	149,5	145,3	-4,2 (-2,8)	151,4	185,4	34,0 (22,7)	62,5	13,7
45	157,6	156,3	-1,3 (-0,8)	157,6	197,3	39,7 (25,2)	72,8	14,1
46	149,7	149,6	-0,1 (-0,1)	149,7	206,7	57,0 (38,1)	74,3	9,3
47	149,3	141,3	-8,0 (-5,4)	155,5	187,9	32,4 (21,7)	60,9	11,9
48	147,5	140,3	-7,2 (-4,9)	147,5	189,8	42,3 (28,7)	60,7	12,9

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. АКДС — адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина; «—» — не измеряли.

Note. DTP, adsorbed diphtheria-tetanus-pertussis vaccine; —, not measured.

Таблица 4. Влияние ЛОС и остаточного количества активного КТ на показатели специфической токсичности и защитной активности коклюшной ЦКВ в группе 2 ($n=48$)**Table 4.** Effects of the *B. pertussis* LOS and residual active PT levels on the specific toxicity and potency of wP vaccine batches in Group 2 ($n=48$)

Показатель токсического действия <i>Toxic activity</i>	Значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s) для показателя <i>Spearman's rank correlation coefficient (r_s) for</i>	
	Специфическая токсичность вакцины, p -критерий <i>Specific toxicity, p-value</i>	Защитная активность вакцины, p -критерий <i>Potency, p-value</i>
ЛОС: <i>LOS:</i> – усл. ед. – а. у. – %	0,113, $p>0,05$ 0,121, $p>0,05$	0,049, $p>0,05$ 0,045, $p>0,05$
КТ: <i>PT:</i> – усл. ед. – а. у. – %	0,595, $p<0,01$ 0,546, $p<0,0$	–0,534, $p<0,01$ –0,514, $p<0,01$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ЛОС — липоолигосахарид *Bordetella pertussis*, КТ — коклюшный токсин *B. pertussis*; ЦКВ — цельноклеточная коклюшная вакцина.*Note.* LOS, lipo-oligosaccharide; PT, pertussis toxin; wP, whole-cell pertussis vaccine; a.u., arbitrary units.

по сравнению с группой 1 осталась умеренной. При этом значения коэффициентов корреляции оказались несколько выше, а связь — достоверной. Так, коэффициенты корреляции составили: $-0,557$ ($p<0,01$) для показателя токсического действия КТ в усл. ед., $-0,534$ ($p<0,01$) для такового, выраженного в %.

Если сравнить результаты исследования обеих групп, то можно отметить наиболее резкое отличие вакцин по корреляционным связям ЛОС. Так, если в группе 1 коэффициенты корреляции между показателями токсического действия ЛОС (в усл. ед. и %) и специфической токсичности отражали прямую высокую достоверную тесноту связи ($0,899$ ($p<0,01$) и $0,851$ ($p<0,05$) соответственно), то в группе 2 значения коэффициентов корреляции для тех же анализируемых показателей продемонстрировали прямую слабую недостоверную тесноту связи: $0,113$ ($p>0,05$) и $0,121$ ($p>0,05$) соответственно.

Аналогичные отличия наблюдались в отношении взаимосвязи токсического действия ЛОС (% усл. ед.) и защитной активности вакцины: высокая обратная достоверная связь ($-0,756$ ($p<0,05$) и $-0,589$ ($p>0,05$) соответственно) в группе 1; слабая недостоверная — в группе 2 ($0,049$ ($p>0,05$) и $0,045$ ($p>0,05$) соответственно).

Следует отметить, что взаимосвязь между токсическим действием КТ и специфической токсичностью вакцины в обеих группах принципиально не отличалась и была прямой и достоверной. Отличие заключалось в том, что в группе 1 связь была высокой ($0,817$, $p<0,05$), а в группе 2 — умеренной ($0,595$ ($p<0,01$) и $0,546$ ($p<0,05$)). Взаимосвязь между токсическим действием КТ и защитной активностью вакцины в группе 1 была недостоверной, в группе 2 — достоверной. Коэффициент корреляции между токсическим действием КТ и защитной активностью вакцины: $-0,45$ ($p>0,05$) в группе забракованных препаратов; $-0,534$ ($p<0,01$) и $-0,514$ ($p<0,01$) — в группе вакцин надлежащего качества.

Возможной причиной описанных выше различий может быть разное содержание токсинов в вакцинах групп 1 и 2. Можно предположить, что специфическая токсичность вакцины прямо пропорциональна содержанию ЛОС и КТ в препарате. В данном исследовании более выраженное токсическое действие ЛОС соответствовало более значительному снижению массы тела мышей через 24 ч, а более выраженное токсическое действие КТ — меньшему приросту массы тела на 7-е сутки. Очевидно, что изменение массы тела мышей после введения вакцины в описанном эксперименте напрямую отражает количественное содержание токсина в препарате. Чтобы оценить содержание ЛОС в вакцинах обеих групп, рассчитывались средние арифметические значения потери массы в первые 24 ч после вакцинации мышей. Установлено, что в группе 1 (повышенная остаточная токсичность вакцины) через 24 ч средняя арифметическая величина снижения массы тела животных составила $-7,49$ усл. ед. с 95% доверительным интервалом (ДИ) в интервале $-3,95...-11,03$, или $-7,2\%$ с 95% ДИ в интервале $-3,48...-10,92$. Для группы 2 (соответствующие требованиям НД вакцины) средняя арифметическая величина

потери в массе через 24 ч оказалась значительно меньше: $-4,35$ усл. ед. с 95% ДИ в интервале $-0,17...-8,87$, или $-2,85\%$ с 95% ДИ в интервале $-0,16...-5,86$. Мыши группы 1 (вакцинация препаратом с повышенной остаточной токсичностью) получили примерно в 2 раза больше ЛОС ($7,49$ усл. ед.), чем мыши группы 2 ($4,35$ усл. ед.).

Большее содержание ЛОС в вакцинах группы 1 обуславливает высокие значения коэффициентов корреляции между показателями ЛОС и специфической токсичности и защитной активности вакцин. Значительно меньшее количество ЛОС в вакцинах группы 2 практически не оказывает влияния на защитную активность и специфическую токсичность, определяемые общепринятым методом. Если рассмотреть обратную взаимосвязь, можно констатировать, что показатель специфической токсичности, полученный общепринятым методом, практически не отражает содержание ЛОС в вакцинах надлежащего качества. Показатель, оценивающий специфическую токсичность ЦКВ, рассчитывают как отношение прироста массы тела вакцинированных мышей между седьмыми и нулевыми сутками к приросту массы тела контрольной группы животных за этот же период, т.е. учитывают проявление действия КТ только на 7-е сутки после введения препарата. Однако в расчетах общепринятого показателя специфической токсичности практически не учитывается потеря в массе, характерная для действия ЛОС и происходящая через 16–24 ч после введения препарата, а также не принимается в расчет восстановление массы тела на 2-е (или 3-и) сутки.

Разное количественное содержание эндотоксина в разовой дозе вакцины отразилось как на специфической токсичности, так и на защитной активности ЦКВ, что установлено для обеих групп вакцин. Так, значительно большее количество ЛОС, присутствующее в вакцинах группы 1, оказало выраженное отрицательное влияние на формирование противококлюшного иммунитета. Выявлена обратная высокая достоверная теснота связи ($-0,756$, $p < 0,05$) между содержанием в дозе вакцины ЛОС и защитной активностью препарата. Взаимосвязь между токсическим действием ЛОС и защитной активностью оказалась значительно слабее в группе 2, в этих сериях вакцин содержание ЛОС было практически в два раза ниже по сравнению с группой 1.

Необходимо отметить, что в молекуле ЛОС (комплекс липида и олигосахарида) *B. pertussis* эндотоксической активностью обладает только липид [23], поэтому, рассчитывая потерю массы

животных в первые 24 ч после введения вакцины, по сути определяют токсическое действие липида, входящего в состав ЛОС. Таким образом, установив взаимосвязь между ЛОС (вычисленному по изменению массы тела животного) и показателями качества препарата, можно выявить взаимосвязь между влиянием липида ЛОС на организм и показателями специфической токсичности и защитной активности вакцины.

Оценку содержания КТ, как и ЛОС, проводили опосредованно, через определение изменения массы тела мышей (средняя арифметическая величина) после введения вакцины. Прирост массы тела мышей между 2 (или 3) и 7-ми сутками (отражает содержание КТ): в опыте с забракованными вакцинами (группа 1) составил $22,43$ ($14,40-30,46$) усл. ед., или $14,98$ ($9,55-20,41\%$; в исследовании с вакцинами, соответствующими требованиям НД (группа 2), оказался практически в два раза больше — $40,24$ ($30,88-49,60$) усл. ед., или $26,25$ ($20,13-32,37\%$). По-видимому, меньший прирост массы тела мышей ($22,43$ усл. ед.), получивших дозы забракованных вакцин, обусловлен большей остаточной токсичностью КТ в данных сериях препарата. Большой прирост массы тела мышей ($40,24$ усл. ед.) указывает на меньшую остаточную токсичность КТ в вакцинах надлежащего качества. Можно сделать вывод, что вакцины группы 1 содержали больше ЛОС и остаточного количества активного КТ и в связи с этим оказывали большее токсическое действие по сравнению с группой 2.

Необходимо отметить, что взаимосвязь между токсическим действием КТ в дозе препарата и специфической токсичностью в обеих группах принципиально не отличалась. Связь была прямой и достоверной, но коэффициент корреляции в группе 1 ($0,817$ ($p < 0,05$), высокая теснота связи) был больше, чем в группе 2 ($0,595$ ($p < 0,01$), умеренная взаимосвязь).

В вакцинах группы 1 повышенное токсическое действие КТ (в усл. ед.) достоверно не влияло на показатели защитной активности. В группе 2 (препарат с менее выраженным токсическим действием КТ), наоборот, выявлена отрицательная и достоверная взаимосвязь, т.е. препарат с меньшей остаточной токсичностью КТ индуцировал лучшую противококлюшную защиту у мышей, чем вакцины с повышенной остаточной токсичностью.

Учитывая, что в настоящем исследовании взаимосвязь КТ с показателями качества вакцины определялась по изменению массы тела мышей, т.е. по токсическому действию КТ, можно предположить, что таким образом выявляется взаимосвязь между субъединицей S1 КТ, обладающей

токсическими свойствами¹⁵, и показателями качества коклюшного компонента вакцины АКДС. Молекула КТ имеет сложную структуру, и представляется важным изучение влияния других ее субъединиц на формирование адаптивного противокклюшного иммунитета.

Представленные результаты демонстрируют, что токсины ЛОС и КТ, являясь основными факторами вирулентности бактериальной клетки *B. pertussis* [24], активно влияют на формирование иммунного ответа, что подтверждается рассчитанными коэффициентами корреляции.

В ряде работ показано, что ЛОС как консервативный молекулярный паттерн участвует в обеспечении жизненно важных для бактериальной клетки функций, играет важную роль в патогенезе коклюшной инфекции [25, 26]; обеспечивает структурную целостность бактериальной клетки и защищает мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды [23]; выполняет иммуномодулирующую функцию, способствует трансформации врожденного иммунитета в адаптивный [27]; задействован в дифференцировке наивных Т-клеток в Т-хелперы типа 1 (Th1) [28], активно участвуя в формировании эффективного иммунного ответа [24, 29, 30]; защищает бактериальную клетку *B. pertussis* от действия врожденного иммунитета хозяина [31]. В ответ на воздействие ЛОС клеточной стенки *B. pertussis* организм хозяина вырабатывает нейтрализующие антитела, обладающие способностью к прямому уничтожению бактериальных клеток. В научной литературе высказывается мнение, что иммуногенная активность в определенной степени обусловлена внутренним олигосахаридным ядром молекулы ЛОС. Установлено, что олигосахарид ядра, имеющий отрицательный заряд, за счет ионного взаимодействия усиливает сродство к рецепторному комплексу TLR4 и MD-2 дендритных клеток, активация которых запускает иммунный ответ [32, 33]. И наоборот, для липида А молекулы ЛОС характерна пониженная способность активировать комплекс рецепторов TLR4 и MD-2 [34–36].

Гипотетически можно объяснить полученные в настоящем исследовании данные. Взаимосвязь между показателями ЛОС (вероятное влияние липида молекулы) и защитной активности в группе 1 характеризуется коэффициентами корреляции, равными $-0,589$ ($p > 0,05$, обратная умеренная недостоверная связь) и $-0,756$ ($p < 0,05$, обратная сильная достоверная связь) соответственно; в группе 2 слабая недостоверная

связь — $0,049$ ($p > 0,05$) и $0,045$ ($p > 0,05$) соответственно. Если предположить, что отрицательная и слабая взаимосвязь в группах 1 и 2 в определенной степени обусловлена пониженной способностью липида А активировать рецепторы TLR4 и MD-2 дендритных клеток, то вполне вероятно отрицательное влияние липида А на формирование адаптивного противокклюшного иммунитета.

Корреляционный анализ, проведенный между основными показателями качества вакцины и остаточным количеством активного КТ и ЛОС, продемонстрировали и подтвердил существенное влияние указанных токсинов на специфическую токсичность и защитную активность препарата. В исследовании получены ожидаемые данные, свидетельствующие о наличии взаимосвязи КТ и высоких доз ЛОС со специфической токсичностью. Продemonстрировано, что содержание ЛОС, входящего в состав препаратов надлежащего качества (группа 2), не выявляется общепринятым в мировой практике методом оценки безопасности коклюшной вакцины, рекомендованным ВОЗ. Установлена обратная взаимосвязь между токсическим действием ЛОС и КТ и защитной активностью вакцины.

Представляется очевидным, с учетом выраженного токсического действия ЛОС на организм человека, что необходимо определять содержание этого компонента в коклюшных штаммах, используемых для производства ЦКВ (в настоящее время в Российской Федерации это не практикуется).

Полученные в работе данные могут способствовать дальнейшей разработке подходов к снижению специфической токсичности и повышению защитной активности ЦКВ. Изучение токсинов ЛОС и КТ и ответных реакций организма имеет важное значение для разработки оптимальных вакцин для профилактики коклюша.

Выводы

1. Было выявлено и опосредованно оценено токсическое действие липоолигосахарида и остаточного количества активного коклюшного токсина в образцах исследуемых серий адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины.
2. Корреляционный анализ продемонстрировал наличие обратной связи между защитной активностью вакцины и токсическим действием остаточного уровня активного коклюшного токсина, входящего в состав серий адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбняч-

¹⁵ WHO Immunological basis for immunization series. Module 4: Pertussis. WHO; 2017.

ной вакцины, удовлетворяющих требованиям нормативной документации.

- Показатель, оценивающий специфическую токсичность цельноклеточной коклюшной вакцины в соответствии с рекомендациями ВОЗ, не отражает присутствие, содержание и токсическое действие липоолигосахарида в сериях исследуемой вакцины, соответ-

ствующих требованиям нормативной документации.

- Представляется целесообразным в используемых для изготовления цельноклеточной вакцины коклюшных штаммах определять содержание липоолигосахарида *B. pertussis*, что в настоящее время не принято в производственной практике в Российской Федерации.

Литература/References

- Wirsing von König CH, Campins-Martí M, Finn A, Guiso N, Mertsola J, Liese J. Pertussis immunization in the global pertussis initiative European region: recommended strategies and implementation considerations. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(5 Suppl):S87–92. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000160920.75623.a3>
- Simondon F, Preziosi MP, Yam A, Kane CT, Chabirand L, Iteman I, et al. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine*. 1997;15(15):1606–12. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(97\)00100-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(97)00100-x)
- Winter K, Harriman K, Zipprich J, Schechter R, Talarico J, Watt J, Chavez G. California pertussis epidemic, 2010. *J Pediatr*. 2012;161(6):1091–6. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.05.041>
- Libster R, Edwards KM. Re-emergence of pertussis: what are the solutions? *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(11):1331–46. <https://doi.org/10.1586/erv.12.118>
- McGirr A, Fisman DN. Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2015;135(2):331–43. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-1729>
- Pertussis vaccines: WHO position papers. *Wkly Epidemiol Rec*. 1999;74(18):137–44.
- Pertussis vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2010;85(40):385–400. PMID: 20939150
- Lugauer S, Heininger U, Cherry JD, Stehr K. Long-term clinical effectiveness of an acellular pertussis component vaccine and a whole cell pertussis component vaccine. *Eur J Pediatr*. 2002;161(3):142–6. <https://doi.org/10.1007/s00431-001-0893-5>
- Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(4):274–88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3235>
- Witt MA, Arias L, Katz PH, Truong ET, Witt DJ. Reduced risk of pertussis among persons ever vaccinated with whole cell pertussis vaccine compared to recipients of acellular pertussis vaccines in a large US cohort. *Clin Infect Dis*. 2013;56(9):1248–54. <https://doi.org/10.1093/cid/cit046>
- Klein NP, Bartlett J, Fireman B, Baxter R. Waning Tdap effectiveness in adolescents. *Pediatrics*. 2016;137(3):e20153326. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-3326>
- Liko J, Robison SG, Cieslak PR. Priming with whole-cell versus acellular pertussis vaccine. *N Engl J Med*. 2013;368(6):581–2. <https://doi.org/10.1056/nejmc1212006>
- Klein NP, Bartlett J, Fireman B, Rowhani-Rahbar A, Baxter R. Comparative effectiveness of acellular versus whole-cell pertussis vaccines in teenagers. *Pediatrics*. 2013;131(6):e1716–22. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-3836>
- Warfel JM, Edwards KM. Pertussis vaccines and the challenge of inducing durable immunity. *Curr Opin Immunol*. 2015;35:48–54. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.05.008>
- Чупринина РП, Алексеева ИА. Возможность повышения иммуногенной активности и стабильности цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014;(2):89–95.
- Чупринина РП, Алексеева ИА. The possibility of increasing the potency and stability of whole-cell pertussis component of combined vaccines. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014;(2):89–95 (In Russ.). EDN: SBEUOR
- Hozbor D. New pertussis vaccines: a need and a challenge. In: Fedele G, Ausiello C, eds. *Pertussis infection and vaccines. Advances in experimental medicine and biology*. Springer; 2019. P. 115–26. https://doi.org/10.1007/5584_2019_407
- Locht C, Papin JF, Lecher S, Debie AS, Thalen M, Solovay K, et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *Bordetella pertussis* disease and infection. *J Infect Dis*. 2017;216(1):117–24. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix254>
- Li P, Asokanathan C, Liu F, Khaing KK, Kmiec D, Wei X, et al. PLGA nano/micro particles encapsulated with pertussis toxin (PTd) enhances Th1/Th17 immune response in a murine model. *Int J Pharm*. 2016;513(1–2):183–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.059>
- Barkoff AM, Knuutila A, Mertsola J, He Q. Evaluation of anti-PT antibody response after pertussis vaccination and infection: the importance of both quantity and quality. *Toxins (Basel)*. 2021;13(8):508. <https://doi.org/10.3390/toxins13080508>
- Зубов НН, Кувакин ВИ, Умаров СЗ. *Биомедицинская статистика: информационные технологии анализа данных в медицине и фармации*. М.: RuScience; 2023. Zubov NN, Kuvakin VI, Umarov SZ. *Biomedical statistics: information technologies of data analysis in medicine and pharmacy*. Moscow: RuScience; 2023 (In Russ.).
- Nikaido H, Vaara M. Outer membrane. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberg HE, eds. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium – cellular and molecular biology*. Washington DC: ASM; 1987. P. 7–22.
- Whitfield C, Trent MS. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem*. 2014;83:99–128. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035600>
- Sperandeo P, Martorana AM, Polissi A. Lipopolysaccharide biogenesis and transport at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(11):1451–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.10.006>
- Pittman M. Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. *Rev Infect Dis*. 1979;1(3):401–12. <https://doi.org/10.1093/clinids/1.3.401>
- Koj S, Ługowski C, Niedziela T. *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide-derived neoglycoconjugates – new components of pertussis vaccine. *Postępy Hig Med Dosw (Online)*. 2015;69:1013–30 (In Pol.). PMID: 26400888
- Flak TA, Goldman WE. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol*. 1999;1(1):51–60. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00004.x>

27. Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KHG. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol.* 2006;177(11):7980–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7980>
28. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(12):984–93. <https://doi.org/10.1038/nri1246>
29. Arenas J, Pupo E, Phielix C, David D, Zariri A, Zamyatina A, et al. Shortening the lipid A acyl chains of *Bordetella pertussis* enables depletion of lipopolysaccharide endotoxic activity. *Vaccines (Basel).* 2020;8(4):594. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040594>
30. Trollfors B, Lagergard T, Taranger J, Bergfors E, Schneerson R, Robbins JB. Serum immunoglobulin G antibody responses to *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide and B. parapertussis lipopolysaccharide in children with pertussis and parapertussis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(5):1015–7. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.5.1015-1017.2001>
31. Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, Weiss AA. *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A. *J Immunol.* 2004;173(3):1959–65. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1959>
32. Zahringer U, Ittig S, Lindner B, Moll H, Schombel U, Gisch N, Cornelis GR. NMR-based structural analysis of the complete rough-type lipopolysaccharide isolated from *Capnocytophaga canimorsus*. *J Biol Chem.* 2014;289(34):23963–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.571489>
33. Raetz CRH, Garrett TA, Reynolds CM, Shaw WA, Moore JD, Smith DCJ Jr, et al. Kdo2–lipid A of *Escherichia coli*, a defined endotoxin that activates macrophages via TLR-4. *J Lipid Res.* 2006;47(5):1097–111. <https://doi.org/10.1194/jlr.m600027-jlr200>
34. Needham BD, Carroll SM, Giles DK, Georgiou G, Whiteley M, Trent MS. Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(4):1464–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218080110>
35. Needham BD, Trent MS. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(7):467–81. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3047>
36. Teghanemt AD, Zhang D, Levis EN, Weiss JP, Gioannini TL. Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins. *J Immunol.* 2005;175(7):4669–76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4669>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.А. Алексеева** — обоснование концепции исследования, разработка дизайна экспериментального исследования, анализ и систематизация экспериментальных данных, формулировка выводов, написание текста рукописи. **И.В. Ибрагимхалилова** — анализ и обобщение данных литературы; проведение испытаний вакцины, работа с графическим материалом. **Д.Н. Лепихова** — анализ и обобщение данных литературы; проведение испытаний вакцины, работа с графическим материалом.

Соответствие принципам этики. Все исследования проводились в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, принципами этического кодекса CIOMS «Международные рекомендации по проведению биомедицинских исследований с использованием животных», Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ГОСТ 33216–2014).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **I.A. Alekseeva** substantiated the study concept, designed the experiment, analysed and collated the experimental data, formulated the conclusions, and drafted the manuscript. **I.V. Ibragimkhalilova** analysed and summarised literature data, conducted vaccine tests, and prepared graphical material. **D.N. Lepikhova** analysed and summarised literature data, conducted vaccine tests, and prepared graphical material.

Ethics approval. All the experiments were performed according to the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes, the CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, and European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (GOST 33216–2014).

Об авторах / Authors

Алексеева Ирина Андреевна, д-р. мед. наук,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5586-2933>
Alekseeval@expmed.ru

Ибрагимхалилова Ильхамья Вейсальевна,
канд. биол. наук,
ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-8002-2407>
ibragimhalilova@expmed.ru

Лепихова Дарья Николаевна
ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-4061-8892>
lepihovadn@expmed.ru

Поступила 25.01.2023

После доработки 01.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Irina A. Alekseeva, Dr. Sci. (Med.),
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5586-2933>
Alekseeval@expmed.ru

Ilkhamya V. Ibragimkhalilova, Cand. Sci. (Biol),
ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-8002-2407>
ibragimhalilova@expmed.ru

Darya N. Lepikhova
ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-4061-8892>
lepihovadn@expmed.ru

Received 25 January 2023

Revised 1 August 2023

Accepted 13 September 2023

УДК 579.61

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-348-360>

Научная статья | Scientific article



Лиофилизация бактериальных тест-штаммов в аппарате коллекторного типа: влияние параметров замораживания и высушивания, объема заполнения ампул и плотности ватного фильтра

А.А. Воропаев[✉], О.В. Фадейкина, Т.Н. Ермолаева, Д.С. Давыдов

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

✉ Воропаев Андрей Андреевич; voropaev@expmed.ru

Резюме

Актуальность. В работе Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России основной метод работы — лиофилизация, обеспечивающая сохранение свойств депонированных тест-штаммов. Для успешной лиофилизации необходимо экспериментальное определение основных параметров и критических условий процесса.

Цель. Оценить влияние скорости и времени замораживания, времени высушивания, объема заполнения ампул, плотности ватного фильтра на качество коллекционных бактериальных тест-штаммов при лиофилизации на аппарате коллекторного типа.

Материалы и методы. Тест-штаммы *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788, *Salmonella Abony* NCTC 6017 высушивали методом лиофилизации на аппарате коллекторного типа. Замораживание велось при температуре -70 ± 2 °C в низкотемпературном морозильнике (медленная заморозка) и в смеси «сухого льда» со спиртом (быстрая заморозка). Статистическую обработку данных проводили при помощи программ MS Excel и Statistica, v. 10.

Результаты. Время замораживания ампул в низкотемпературном морозильнике при -70 ± 2 °C не менее 4 ч, дальнейшее хранение возможно при данной температуре до 1 мес. без потери качества конечного продукта. Время замораживания ампул в смеси «сухого льда» и спирта составило менее 1 мин. Различий в показателях качества лиофилизатов, полученных при быстрой и медленной заморозке, не выявлено, кроме внешнего вида: при быстром замораживании таблетка лиофилизата формируется неровная, легко отделяется от стекла и крошится, что нежелательно. Длительность этапа первичного высушивания ампул заполнения 0,2 мл составила 6–8 ч. Показано, что время досушивания в течение 11, 18, 35 и 59 ч приводит к получению лиофилизатов сравнимого качества: количество жизнеспособных микробных клеток (КОЕ/мл) сразу после лиофилизации и по завершении стресс-теста во всех случаях статистически значимо не отличалось. Содержание остаточной влаги при досушивании в течение 59 ч — менее 2%. Плотность ватного фильтра имеет критическое влияние на качество лиофилизата, рекомендуется использование ватного фильтра массой не более 50 мг.

Выводы. Изучены основные этапы высушивания коллекционных тест-штаммов на аппарате коллекторного типа. Исследовано влияние на качество конечного продукта следующих факторов: скорости и времени замораживания, длительности высушивания, объема заполнения ампул, плотности ватного фильтра. Полученные результаты используются в работе Государственной коллекции микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Ключевые слова: тест-штаммы микроорганизмов; параметры лиофилизации; замораживание; сублимация; досушивание; лиофилизатор коллекторного типа; ватный фильтр

Для цитирования: Ворopaев А.А., Фадейкина О.В., Ермолаева Т.Н., Давыдов Д.С. Лиофилизация бактериальных тест-штаммов в аппарате коллекторного типа: влияние параметров замораживания и досушивания, объема заполнения ампул и плотности ватного фильтра. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):348–360. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-348-360>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

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

Lyophilisation of bacterial test strains in a manifold-type apparatus: effects of freezing and drying parameters, ampoule fill volume, and cotton filter density

Andrey A. Voropaev✉, Olga V. Fadeikina, Tatyana N. Ermolaeva, Dmitry S. Davydov

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

✉ Andrey A. Voropaev; voropaev@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. Lyophilisation is the preferred method at the National Collection of Pathogenic Microorganisms (NCPM) of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation. Lyophilisation is used to provide for high standards of test-strain deposition, storage, and transportation and to ensure that test strains maintain their properties. Successful lyophilisation requires conducting experiments to establish the key parameters and critical conditions of the process.

Aim. The study aimed to evaluate the effects that the speed and time of freezing, the time of drying, the fill volume of ampoules, and the density of cotton filters have on the quality of NCPM indicator microorganisms lyophilised in a manifold-type apparatus.

Materials and methods. *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788, and *Salmonella Abony* NCTC 6017 were freeze-dried using a manifold-type apparatus. The authors used a low-temperature freezer at -70 ± 2 °C for slow freezing and a mixture of dry ice and alcohol for quick freezing. The statistical analysis was performed using Microsoft Excel and STATISTICA 10.

Results. The minimum time needed for freezing the samples in a low-temperature freezer at -70 ± 2 °C was 4 hours. Further storage at this temperature for up to 1 month was shown possible without compromising the quality of the final product. The time needed for freezing the samples in a mixture of dry ice and alcohol was under 1 minute. No differences in quality parameters were observed between the lyophilised samples frozen slowly or quickly, except for the cake appearance. Quick freezing resulted in cakes that were non-uniform, crumbled, and pulled away from the ampoule walls, which is considered undesirable. The primary drying stage for ampoules with a fill volume of 0.2 mL took 6–8 hours. The secondary drying stage of 11, 18, 35, and 59 hours resulted in comparable lyophilisate quality: the authors observed no statistically significant differences in viable cell counts (CFU/mL) at the end of lyophilisation and at the end of stress testing. The residual moisture content after 59-hour secondary drying was less than 2%. The cotton filter density had a critical influence on the lyophilisate quality. Therefore, the authors recommend using cotton filters weighing 50 mg or less.

Conclusions. The authors analysed the main stages of the lyophilisation process used for NCPM test strains and considered the effects that the speed and time of freezing, the time of drying,

the fill volume of ampoules, and the density of cotton filters have on the quality of the final lyophilised product. The NCPM has implemented the results of this study in its work.

Key words: test strains; indicator microorganisms; lyophilisation parameters; freezing; sublimation; secondary drying; desorption; manifold-type lyophiliser; cotton filter

For citation: Voropaev A.A., Fadeikina O.V., Ermolaeva T.N., Davydov D.S. Lyophilisation of bacterial test strains in a manifold-type apparatus: effects of freezing and drying parameters, ampoule fill volume, and cotton filter density. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):348–360. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-348-360>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 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.

Введение

Ведение коллекции патогенов предусматривает хранение и поддержание свойств депонированных штаммов¹. Лиофильное высушивание — основной метод для поддержания коллекционного фонда микроорганизмов. Высушенную культуру микроорганизмов, запаянную в стеклянных ампулах в условиях вакуума, можно хранить в течение многих лет при температуре 2–8 °С и транспортировать в условиях окружающей среды. Данные факторы делают метод лиофилизации основным в работе Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по обеспечению эталонными бактериальными тест-штаммами лабораторий и фармацевтического производства Российской Федерации.

Лиофильные аппараты выпускают двух типов: камерного и коллекторного. В аппаратах первого типа ампулы устанавливают на полку в камере лиофилизатора, где проходят все этапы высушивания. В аппаратах коллекторного типа замороженные ампулы подключают к конденсору. При работе с патогенными микроорганизмами необходимое условие — соблюдение требований биологической безопасности. Применение лиофильных аппаратов камерного типа требует работ по их адаптации для обеспечения необходимого уровня биологической безопасности при лиофилизации тест-штаммов III и IV групп патогенности [1]. Этому недостатка лишены аппараты коллекторного типа, которые используют, в частности, для высушивания коллекционных штаммов возбудителей особо опасных инфекций [2]. Например, аппарат M. S. R. 18 (Usifroid, Франция) состоит из конденсора, ва-

куумного насоса, стаканов (в них помещают ампулы для лиофилизации) и системы шлангов (соединяют стаканы с конденсором). Конструкция установки не предусматривает контролируемое охлаждение или нагревание образцов. Образцы нагреваются до комнатной температуры за счет естественного притока тепла из окружающей среды. Температура конденсора постоянна, обеспечивается смесью твердого диоксида углерода («сухой лед») со спиртом этиловым.

Для успешного проведения лиофилизации с использованием коллекторного аппарата необходимо экспериментальное определение основных параметров и критических условий высушивания тест-штаммов микроорганизмов.

Лиофилизация состоит из трех этапов: замораживание, первичное высушивание (сублимация), вторичное высушивание (досушивание, или десорбция)². На начальном этапе лиофилизации необходимо перевести всю воду в образце в твердое состояние для последующей ее возгонки. Этот этап наиболее сложный и важный для всего процесса [3–5]. В лабораторной практике применяют две техники замораживания, отличающиеся по скорости и способу охлаждения образцов:

- медленная заморозка — в камере низкотемпературного морозильника;
- быстрая заморозка — в охлаждающей жидкости (например, в смеси спирта этилового и «сухого льда»).

При медленном замораживании вначале происходит образование кристаллов льда снаружи клетки, а внутри нее остается жидкая вода, в которой постепенно образуется гипертонический раствор, который может приводить

¹ Постановление Правительства Российской Федерации от 30.09.2021 № 1668 «Об утверждении Правил создания, пополнения, ведения и использования коллекций патогенных микроорганизмов и вирусов, а также Правил создания и ведения национального каталога коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и вирусов» (с измен. на 16.06.2022).

² ОФС.1.4.1.0031.18 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018. С. 2025–30.

к деградации белка, повреждению мембран, и в конечном итоге — к снижению выживаемости лиофилизируемых микроорганизмов [6–10].

При быстром замораживании существует опасность образования внутриклеточного льда, который вызывает физическое разрушение клеток, что является более критичным, чем влияние гипертонического раствора [11]. Замораживание сложных растворов, содержащих лиопротекторы (например, сахарозу), происходит по механизму стеклования: с понижением температуры увеличивается вязкость раствора, и полное замораживание идет при температуре стеклования. Биологический материал при стекловании избегает повреждения и сохраняет естественные структуру и функции. Для растворов сахарозы температура стеклования составляет $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ [12].

Второй этап лиофилизации — первичное высушивание, или сублимация. Сублимация воды происходит из замороженного состояния в условиях пониженного давления (вакуум).

Третий этап лиофилизации — вторичное высушивание, или десорбция. На данной стадии скорость удаления воды уменьшается, так как оставшаяся вода прочно связана [13]. От продолжительности этапа зависит содержание остаточной воды в лиофилизате, которое должно быть в оптимальном диапазоне. Как высокое содержание остаточной воды, так и очень низкое могут оказывать негативное влияние на сохранение жизнеспособности клеток [14].

Основной параметр лиофилизации — общая продолжительность процесса, складывающаяся из времени прохождения каждого этапа. Дополнительный фактор, влияющий на конечный продукт, — использование в ампулах ватных фильтров. Их применяют для обеспечения биологической безопасности и защиты лиофилизата от загрязнения, поступающего из внешней среды, что является важным аспектом лиофилизации. Ватные фильтры изготавливают вручную, что требует стандартизации. Так, плотные ватные фильтры могут создавать сопротивление выходу водяного пара и повышать парциальное давление внутри ампулы, что изменяет условия высушивания и может ухудшить качество лиофилизата [15].

Цель работы — оценка влияния скорости и времени замораживания, времени высушивания, объема заполнения ампул, плотности ватного фильтра на качество коллекционных бак-

териальных тест-штаммов при лиофилизации на аппарате коллекторного типа.

В ходе экспериментов решался ряд задач:

- оценить влияние на конечный продукт различных этапов лиофилизации: времени и скорости замораживания, длительности первичного и вторичного высушивания;
- изучить зависимость времени первичного высушивания от объема заполнения ампул;
- исследовать влияние плотности ватного фильтра на качество лиофилизата;
- провести оценку качества конечного продукта, полученного при разных условиях проведения этапов лиофилизации, по следующим характеристикам: описание (внешний вид), время растворения, потеря в массе при высушивании и количество жизнеспособных микробных клеток.

Материалы и методы

Материалы

В работе применяли следующие материалы:

- тест-штаммы микроорганизмов, рекомендуемые для проведения испытаний в ОФС.1.2.4.0002.15³: *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924/ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788, *Salmonella Abony* NCTC 6017;
- питательная среда: соево-казеиновый агар (Merck, кат. № 1.05458.0500, серия VM805658 737);
- защитная среда: сахарозо-желатиновая среда, содержащая 20% сахарозы (Merck, кат. № 1.07653, серия K48546153) и 2% желатина (Merck, кат. № 1.04070, серия VM918570);
- фармакопейный стандартный образец мутности бактериальных взвесей ФСО 3.1.00084 (ОСО 42-28-84), серия S-2/8-010122, 20 МЕ, производство ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России;
- ампулы (внутренний диаметр — 8 мм), изготовленные из стеклотрубки боросиликатного стекла Simax;
- спирт этиловый 96%, производство ООО «Гатчинский спиртовой завод» (Россия);
- твердый диоксид углерода («сухой лед»), изготовленный по ГОСТ 12162–77 «Двуокись углерода твердая. Технические условия» (ООО «Ритек», Россия).

Оборудование

Работа проводилась при помощи измерительного и испытательного оборудования, прошедшего поверку (квалификацию, аттестацию):

³ ОФС.1.2.4.0001.15 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.: 2018. С. 848–900.

- весы специальные класса 1 ML204T/A00 (Mettler Toledo, Швейцария);
- морозильник MDF-193AT (Panasonic Healthcare Co., Ltd, Япония);
- лиофильный аппарат Usifroid M.S.R. 18 (Usifroid, Франция);
- вакуумно-сушильный шкаф VD 23 (Binder, Германия);
- термостат ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия);
- шкаф ламинарный БАВ п-01-1,2, класс защиты II (ЗАО «Ламинарные системы», Россия);
- измеритель температуры многоканальный прецизионный МИТ 8.10М1, в комплекте с термометром сопротивления платиновым вибропрочным (ООО «ИзТех», Россия).

Методы

Подготовка тест-штаммов к высушиванию.

Культивирование тест-штаммов проводили при температуре $+37\pm 2$ °С на поверхности агаризованной среды в чашках Петри. Для высушивания использовали 20-часовую культуру пассажа 2. Колонии отбирали бактериологической петлей и готовили суспензию, соответствующую 20 МЕ ФСО мутности бактериальных взвесей, в стерильной воде. Десятикратными разведениями разводили до концентрации 10^3 КОЕ/мл. Такое разведение было необходимо, чтобы избежать «чувства кворума» микроорганизмов и оценить только влияние исследуемого фактора, так как при высокой концентрации клеток выживаемость увеличивается [16]. Разведенную суспензию объединяли в равном объеме с защитной средой. Для оценки времени досушивания десятикратные разведения не проводили.

Замораживание образцов. Для быстрой заморозки подготовленные ампулы с тест-штаммами помещали в приготовленную смесь спирта этилового (96%) с порошком диоксида углерода в равном объеме, для медленного замораживания – в низкотемпературный морозильник.

Леофильное высушивание. Тест-штаммы микроорганизмов высушивали на аппарате коллекторного типа под вакуумом не менее 0,2–0,3 Па. Температура конденсора поддерживалась смесью «сухого льда» и спирта этилового (96%).

Весовой метод определения времени первичного высушивания. Взвешивали (с точностью

до 0,0001 г) пустые ампулы, которые заполняли защитной средой и взвешивали до и после высушивания. По разнице масс рассчитывали массу сублимированной влаги.

Определение времени растворения. Проводили согласно ОФС.1.4.1.0031.18⁴.

Определение потери в массе при высушивании. В испытании, по способу 1 из ОФС.1.2.1.0010.15⁵, использовали 10 ампул с лиофилизатом.

Определение количества жизнеспособных микробных клеток. Лиофилизат в ампуле восстанавливали стерильной водой. Для каждого исследуемого параметра при определении количества жизнеспособных микробных клеток использовали по три ампулы. Биоматериал каждой ампулы десятикратно разводили; проводили посев в три чашки с питательной средой, инкубировали 24 ч при температуре $+37\pm 2$ °С. При подсчете колоний оценивали культуральные свойства тест-штаммов: морфологию, размер и окраску колоний.

Стресс-тест. Испытание проводили с учетом рекомендаций ОФС.1.1.0020.18⁶, ампулы с лиофилизированными тест-штаммами помещали в термостат на хранение при $+37\pm 2$ °С на сроки 1 и 3 мес.

Статистическая обработка результатов. Сравнение двух групп данных (быстрая и медленная заморозка) проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента. Сравнение нескольких групп данных (оценка влияния времени замораживания, досушивания и плотности ватного фильтра) – при помощи критерия Краскела–Уоллиса.

Результаты и обсуждение

Замораживание

При медленном замораживании ампулы распределяли в стакане для лиофилизации таким образом, чтобы половина датчиков находилась в центре стакана, а половина – по краям. Затем стаканы помещали в низкотемпературный морозильник и измеряли температуру до достижения -70 ± 2 °С, фиксируя время. При быстром замораживании ампулы с датчиком помещали в смесь спирта этилового с «сухим льдом».

Минимальное время медленного замораживания составило 4 ч, быстрого – менее 1 мин.

Все образцы высушивали в течение 24 ч. Качество лиофилизатов, замороженных с различной

⁴ ОФС.1.4.1.0031.18 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018. С. 2025–30.

⁵ ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018. С. 557–9.

⁶ ОФС.1.1.0020.18 Стабильность биологических лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018. С. 405–22.

Таблица 1. Влияние способа замораживания на качество лиофилизированных образцов тест-штаммов
Table 1. Quality of lyophilised test-strain samples depending on the freezing method

Тест-штамм <i>Test strain</i>	Способ замораживания ^a <i>Freezing method^a</i>	Показатель качества лиофилизата <i>Lyophilisate quality parameter</i>			
		Описание (внешний вид) <i>Description (Appearance)</i>	Время рас- творения, с <i>Reconstitution time, s</i>	Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Количество жизнеспособных клеток ^b , КОЕ/мл <i>Viable cell count^b, CFU/mL</i>
<i>S. Abony</i> NCTC 6017	Медленное <i>Slow</i>	+	≤10	1,8	(6,4±1,0)×10 ³
	Быстрое <i>Quick</i>	–	≤10	1,8	(4,5±0,4)×10 ³
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 12924	Медленное <i>Slow</i>	+	≤10	1,8	(2,7±0,4)×10 ²
	Быстрое <i>Quick</i>	–	≤10	1,8	(2,0±0,8)×10 ²
<i>S. aureus</i> NCTC 10788	Медленное <i>Slow</i>	+	≤10	1,8	(4,6±0,8)×10 ²
	Быстрое <i>Quick</i>	–	≤10	1,8	(4,2±1,7)×10 ²

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «+» — сухая пористая масса в виде таблетки, цельная; «–» — таблетка неровная, крошится.

^a Способы замораживания: медленное замораживание — в низкотемпературном морозильнике; быстрое — в смеси спирта этилового (96%) с порошком твердого диоксида углерода в равном объеме.

^b Среднеарифметическое значение и стандартное отклонение: $\bar{X}_{cp} \pm S$.

Note. +, uniform, porous, and dry cake; –, non-uniform, crumbling cake.

^a Slow freezing in a low-temperature freezer and quick freezing in equal volumes of powdered carbon dioxide and ethanol (96%).

^b Arithmetic means and standard deviations: $\bar{X}_{cp} \pm S$.

скоростью, оценивали по следующим характеристикам (табл. 1): описание (внешний вид), время растворения, потеря в массе при высушивании и количество жизнеспособных микробных клеток.

Статистически значимые различия ($t_{\text{экс}}=5,29 > t_{\text{табл}}(df=16;0,05)=2,12$) по количеству КОЕ после высушивания наблюдались в образцах тест-штамма *S. Abony* NCTC 6017: при медленном замораживании количество КОЕ было выше, чем при быстром, на 30%. Для двух других штаммов (*P. aeruginosa* NCTC 12924, *S. aureus* NCTC 10788) результаты сопоставимы: значения находятся в пределах стандартного отклонения от среднего значения, т.е. количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) практически не зависело от скорости замораживания. Различия по времени растворения и потере массы при высушивании, в зависимости от разных скоростей замораживания, не обнаружены, однако внешний вид лиофилизатов значительно различался. После быстрого замораживания таблетка лиофилизата формируется неровная, легко отделяется от стекла и крошится, после медленного — ровная, плотно прилегает к стеклу.

Варьирование времени замораживания необходимо в практической работе, так как позволяет рационально использовать ресурсы коллекции. С учетом этого дополнительно провели

оценку влияния продолжительности хранения при -70 ± 2 °C на качество лиофилизированных образцов (табл. 2). Одновременно приготовленные ампулы с суспензией штамма *S. Abony* NCTC 6017 поместили в морозильник в разных стаканах для лиофилизации. По одному стакану вынимали через 4, 28, 168 ч (1 нед.), 336 ч (2 нед.), 720 ч (1 мес.) замораживания и лиофилизировали в течение 24 ч. Анализ результатов позволяет сделать вывод, что жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов практически не зависит от времени замораживания (в нашем случае от 4 ч до 1 мес.) — статистически значимые отличия не выявлены: рассчитанное по экспериментальным данным значение критерия Краскала–Уоллиса ($H_{(4, n=15)}=8,29$) менее табличного значения ($H_{\text{табл}}=8,33$) при $\alpha=0,05$ и достигнутом уровне значимости $p=0,0814$. Следовательно, допустимо хранение при -70 ± 2 °C медленно замороженных образцов до 720 ч (1 мес.) без потери качества конечного продукта.

Первичное высушивание (сублимация)

Определение длительности этапа первичного высушивания проводили двумя методами.

1. Визуальный метод: по энергии движения сублимируемой воды из высушиваемого материала к конденсору. Время начала и окончания

Таблица 2. Результаты оценки качества лиофилизированных образцов штамма *S. Abony* NCTC 6017 в зависимости от времени замораживания

Table 2. Quality assessment results for lyophilised samples of *S. Abony* NCTC 6017 depending on the freezing time

Время замораживания и хранения при -70 ± 2 °C, ч <i>Freezing and storage time at -70 ± 2 °C, h</i>	Показатели качества лиофилизата <i>Lyophilisate quality parameters</i>			
	Описание (внешний вид) <i>Description (Appearance)</i>	Время растворения, с <i>Reconstitution time, s</i>	Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Количество жизнеспособных клеток ^a , КОЕ/мл <i>Viable cell count^a, CFU/mL</i>
4	+	≤10	1,7	$(1,3 \pm 0,3) \times 10^3$
28	+	≤10	1,8	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^3$
168	+	≤10	1,2	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^3$
336	+	≤10	1,2	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^3$
720	+	≤10	1,1	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^3$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «+» — сухая пористая масса в виде таблетки, цельная.

^a Среднеарифметическое значение и стандартное отклонение: $X_{cp} \pm S$.

Note. +, uniform, porous, and dry cake.

^a Arithmetic means and standard deviations: $X_{cp} \pm S$.

первичного высушивания определяли визуально, фиксируя наличие и отсутствие вращения специальных индикаторных турбинок, помещенных в патрубок крышки стакана с образцами. Турбинки приводятся во вращательное движение потоком сублимируемой воды (паром). При окончании сублимации скорость движения пара падает и вращательное движение турбинок останавливается.

2. Весовой метод: по изменению в единицу времени массы лиофилизированного материала, которая определяется как разница масс ампулы с содержимым до и после высушивания (масса сублимируемой влаги).

Время сублимации оценивали для ампул с объемом содержимого 0,2 мл (стандартное заполнение ампул с тест-штаммами). Результаты представлены в таблице 3. Время сублимации для ампул по 0,2 мл составило 6–8 ч.

Результаты экспериментов позволяют выделить два периода сублимации:

- прогрев материала от температуры замораживания (-70 ± 2 °C) до температуры, при которой начинается эффективный процесс сублимации: длится до 1 ч, вращение турбинок отсутствует;
- период первичной сушки (сублимации): характеризуется вращением турбинок, происходит

Таблица 3. Результаты определения времени первичного высушивания для медленно и быстро замороженных образцов (заполнение ампул — 0,2 мл)

Table 3. Determination of primary drying time for slowly and quickly frozen samples (ampoule fill volume: 0.2 mL)

Время первичного высушивания, ч <i>Primary drying time, h</i>	Остаточная масса образца ($X_{cp} \pm S$), % <i>Residual sample weight ($X_{cp} \pm S$), %</i>		Вращение турбинок <i>Rotation of impellers</i>	
	Медленное замораживание <i>Slow freezing</i>	Быстрое замораживание <i>Quick freezing</i>	Медленное замораживание <i>Slow freezing</i>	Быстрое замораживание <i>Quick freezing</i>
0	100,0±0	100,0±0	–	–
1	100,0±0	100,0±0	–	–
2	89,5±1,6	93,0±2,2	+	+
4	24,2±11,5	45,1±3,2	+	+
6	11,9±0,1	16,4±6,7	–	+
8	11,3±0,1	11,0±0,1	–	–
9	11,0±0,1	11,0±0,1	–	–

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «+» — есть вращение турбинок; «–» — нет вращения турбинок.

Note. +, rotation of impeller flow indicators; –, no rotation of impeller flow indicators.

углубление зоны высушенного материала; основная часть влаги удаляется в течение 8 ч после установки образцов в лиофильный аппарат.

По истечении 8 ч заканчивается период первичного высушивания и начинается этап вторичного высушивания.

Вторичное высушивание (десорбция)

Это самый продолжительный этап, так как десорбции подвергается связанная вода. Возможно несколько оптимальных и практически удобных режимов лиофилизации коллекционных штаммов. Исследуемые режимы и оценка влияния более продолжительного досушивания на качество лиофилизатов представлены в таблице 4.

Результаты эксперимента (табл. 5) продемонстрировали, что досушивание в течение 11–59 ч не оказывает влияния на качество лиофилизата, что подтверждается отсутствием статистически значимых отличий значений КОЕ/мл в готовых лиофилизатах тест-штаммов. Рассчитанные по экспериментальным данным значения критерия Краскела–Уоллиса для исследуемых тест-штаммов меньше табличного значения ($H_{\text{табл}}=7,0$ при $\alpha=0,05$):

- *S. Abony* NCTC 6017 – $H_{(3, n=12)}=4,6$ ($p=0,2044$);
- *S. aureus* NCTC 10788 – $H_{(3, n=12)}=4,8$ ($p=0,1887$);
- *P. aeruginosa* NCTC 12924 – $H_{(3, n=12)}=6,8$ ($p=0,0798$).

Значительное влияние время десорбции оказывает на остаточную влажность. Притом что все образцы имеют содержание остаточной влажности менее 3%, для всех тест-штаммов потеря влаги при разной экспозиции существенно отличалась: 0,7–2,1% – за 11 ч, 0,6–0,8% – за 59 ч (табл. 5).

Проведение стресс-теста

Теоретически при полном отсутствии влаги исключается возможность почти всех химических реакций, которые могут привести к необратимым изменениям биомолекул и снижению жизнеспособности тест-штаммов микроорганизмов [17]. В связи с этим была поставлена задача оценить долговременные эффекты остаточного содержания воды в лиофилизате. Провели тепловой стресс-тест: образцы выдерживались при температуре $+37\pm 2$ °C в течение 1 и 3 мес.

Тест основан на правиле Вант-Гоффа, согласно которому повышение температуры влечет за собой ускорение скорости химических реакций [18]. При увеличении температуры хранения (увеличится и скорость химических реакций) произойдет снижение активности лиофилизированных образцов. Скорость уменьшения количества жизнеспособных клеток (снижение активности), выраженную в десятичном логарифме, можно математически аппроксимировать линейной моделью вида $y = kx + b$.

Угловым коэффициентом (k) характеризует скорость снижения активности: чем выше значение коэффициента, тем выше скорость уменьшения количества жизнеспособных клеток. Сравнение коэффициентов, рассчитанных для каждого из изученных тест-штаммов (табл. 6), позволяет оценить влияние различного содержания воды в образце и, как следствие, времени досушивания.

Значения угловых коэффициентов при разном времени досушивания в пределах одного штамма различаются незначительно. Четкой зависимости активности от времени досушивания не обнаружено для штаммов *S. Abony* NCTC 6017 и *P. aeruginosa* NCTC 12924. Для штамма *S. aureus*

Таблица 4. Определение временных режимов первичного и вторичного высушивания коллекционных штаммов

Table 4. Selection of time modes for primary and secondary drying of test strains

Режим Mode	Время начала замораживания Start of freezing	Время начала лиофилизации Start of lyophilisation	Время окончания лиофилизации End of lyophilisation	Продолжительность высушивания, ч Drying stage duration, h		
				Первичное высушивание Primary drying	Вторичное высушивание Secondary drying	Общее время Total time
1	1-й день, 13:00 Day 1, 13:00	1-й день, 17:00 Day 1, 17:00	2-й день, 10:00 Day 2, 10:00	6	11	17
2	1-й день, 17:00 Day 1, 17:00	2-й день, 10:00 Day 2, 10:00	3-й день, 10:00 Day 3, 10:00	6	18	24
3	1-й день, 13:00 Day 1, 13:00	1-й день, 17:00 Day 1, 17:00	4-й день, 10:00 Day 4, 10:00	6	35	41
4	1-й день, 13:00 Day 1, 13:00	1-й день, 17:00 Day 1, 17:00	5-й день, 10:00 Day 5, 10:00	6	59	65

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 5. Результаты оценки качества образцов лиофилизата тест-штаммов, полученных при разном времени досушивания
Table 5. Quality assessment results for lyophilised test-strain samples obtained using different drying times

Тест-штамм <i>Test strain</i>	Время досушивания, ч <i>Secondary drying time, h</i>	Показатель качества лиофилизата <i>Lyophilisate quality parameter</i>			
		Описание (внешний вид) <i>Description (Appearance)</i>	Время растворения в воде, с <i>Reconstitution time (water), s</i>	Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Количество жизнеспособных микробных клеток, $X_{cp} \pm S$, КОЕ/мл <i>Viable cell count, $X_{cp} \pm S$, CFU/mL</i>
<i>S. Abony</i> NCTC 6017	11	+	≤10	1,7	$(6,0 \pm 1,4) \times 10^8$
	18	+	≤10	1,4	$(5,7 \pm 1,4) \times 10^8$
	35	+	≤10	1,0	$(6,0 \pm 1,4) \times 10^8$
	59	+	≤10	0,6	$(4,9 \pm 1,6) \times 10^8$
<i>S. aureus</i> NCTC 10788	11	+	≤10	2,1	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^8$
	18	+	≤10	1,3	$(1,1 \pm 0,5) \times 10^8$
	35	+	≤10	1,1	$(1,1 \pm 0,4) \times 10^8$
	59	+	≤10	0,8	$(0,7 \pm 0,3) \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 12924	11	+	≤10	2,0	$(3,9 \pm 0,4) \times 10^7$
	18	+	≤10	1,6	$(3,7 \pm 0,4) \times 10^7$
	35	+	≤10	1,0	$(2,8 \pm 0,7) \times 10^7$
	59	+	≤10	0,8	$(2,7 \pm 0,6) \times 10^7$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 6. Результаты воздействия стресс-условий (повышенная температура хранения +37±2 °С в течение 1 и 3 мес.) на выживаемость лиофилизированных тест-штаммов

Table 6. Lyophilised test-strain survival as a function of stress conditions (storage at an elevated temperature of +37±2 °C for 1 and 3 months)

Тест-штамм <i>Test strain</i>	Время досушивания, ч <i>Secondary drying time, h</i>	Количество жизнеспособных микробных клеток, lg КОЕ/мл <i>Viable cell count, log₁₀ CFU/mL</i>			Угловой коэффициент, <i>k</i> <i>Slope, k</i>	Коэффициент детерминации, <i>R</i> ² <i>Coefficient of determination, R²</i>
		До стресс-теста <i>Baseline</i>	После стресс-теста <i>Under stress conditions</i>			
			через 1 мес. <i>after 1 mo</i>	через 3 мес. <i>after 3 mos</i>		
<i>S. Abony</i> NCTC 6017	11	8,78	6,97	4,12	1,53	1,00
	18	8,76	6,99	4,48	1,40	1,00
	35	8,78	6,90	4,51	1,39	0,99
	59	8,69	6,78	4,37	1,41	0,99
<i>S. aureus</i> NCTC 10788	11	8,11	7,91	7,34	0,26	1,00
	18	8,04	8,03	7,42	0,22	0,95
	35	8,04	8,04	7,52	0,19	0,94
	59	7,86	7,85	7,68	0,06	0,96
<i>P. aeruginosa</i> NCTC 12924	11	7,59	6,62	6,21	0,42	0,91
	18	7,57	6,55	6,26	0,40	0,88
	35	7,45	6,48	6,11	0,41	0,90
	59	7,43	6,22	5,79	0,50	0,90

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

NCTC 10788 в стресс-тесте наблюдается увеличение выживаемости при меньшей остаточной влажности: значение углового коэффициента (k) составило 0,06 при досушивании в течение 59 ч и содержании остаточной влажности в лиофилизате 0,8%, при этом для 11–35 ч досушивания и остаточной влажности 2,1–1,1% k находился в пределах 0,26–0,19. Также наблюдаются различия в скорости снижения количества жизнеспособных микробных клеток в зависимости от штамма: для *S. aureus* NCTC 10788 и *P. aeruginosa* NCTC 12924 снижение за 3 мес. составило около 1 lg; для *S. Abony* NCTC 6017 – 4 lg. Такие результаты можно объяснить тонким слоем пептидогликана и наличием полисахаридов у грамотрицательных бактерий. Из данных литературы также известно, что грамположительные микроорганизмы менее чувствительны к лиофилизации [19].

Оценка влияния плотности ватного фильтра в ампуле

Для определения влияния плотности ватного фильтра на качество лиофилизата суспензию тест-штамма *S. Abony* NCTC 6017 разливали в ампулы по 0,2 мл и укупоривали ватными фильтрами разной массы: 20, 50, 150 мг. Часть ампул была без фильтра. После этого ампулы помещали в стакан для лиофилизации и проводили все этапы досушивания по режиму № 2 (см. табл. 4). После досушивания ампулы запаивали под вакуумом, определяли содержание остаточной влажности по показателю «Потеря в массе при досушивании». Часть ампул хранилась в стресс-условиях ($+37\pm 2^\circ\text{C}$) в течение 1 мес.

Вне зависимости от плотности ватного фильтра получаемые колонии тест-штамма *S. Abony* NCTC 6017 были типичными, дифференциации не наблюдалось.

Сразу после лиофилизации количество жизнеспособных микробных клеток, вне зависимости от плотности ватного фильтра, было сопоставимым, а различия не были статистически значимы. Так, значение критерия Краскела–Уол-

лиса, рассчитанное по экспериментальным данным ($H_{(3, n=12)}=3,5$), меньше табличного ($H_{\text{табл}}=7,0$) при $\alpha=0,05$ и достигнутом уровне значимости $p=0,3261$.

Однако образцы, полученные с использованием ватного фильтра массой 150 мг, имели высокую остаточную влажность (5,0%) и неудовлетворительный внешний вид: лиофилизат уменьшился в объеме, имеет неровные края (рис. 1). Изменение внешнего вида можно объяснить увеличением давления пара внутри ампулы (из-за массивного, труднопроходимого для пара фильтра), вследствие чего происходит разрушение лиофилизата и увеличение содержания влаги в нем [20]. Кроме того, лиофилизат из ампулы с ватным фильтром массой 150 мг сложно растворялся: время растворения составило около 1 мин, что в 5–6 раз превышало значение этого показателя для образцов с меньшими ватными фильтрами (20, 50 мг) или без фильтра (табл. 7).

Воздействие стресс-условий (температура $+37\pm 2^\circ\text{C}$) в течение 1 мес. выявило негативное влияние плотного ватного фильтра (150 мг) не только на растворимость и внешний вид таблетки, но и на количество жизнеспособных микробных клеток: число КОЕ/мл уменьшилось на 96%. В то время как в ампулах, высушенных с фильтрами массой 20 и 50 мг, число КОЕ/мл снизилось на 22–25%, что сопоставимо со значением 22% для ампул, высушенных без фильтра, когда отсутствует преграда для испарения влаги из лиофилизируемого материала. Очевидно, что плотный ватный фильтр препятствовал испарению влаги при лиофилизации, способствуя созданию высокой остаточной влажности, которая повлияла как на жизнеспособность образца, так и на внешний вид и время растворения лиофилизата. Следовательно, для получения оптимальной остаточной влажности в готовых лиофилизированных образцах необходимо учитывать плотность ватных фильтров. Рекомендуется использовать ватный фильтр массой не более 50 мг.

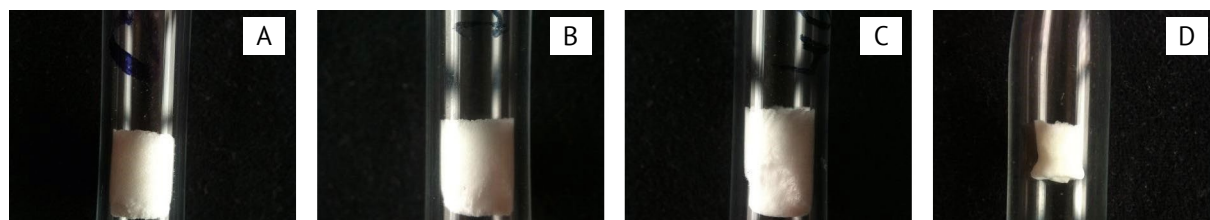


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Внешний вид лиофилизата тест-штамма *S. Abony* NCTC 6017 в случаях применения ватного фильтра с разной массой: А – 0 мг (без фильтра); В – 20 мг; С – 50 мг; D – 150 мг.

Fig. 1. Appearance of *S. Abony* NCTC 6017 samples lyophilised using cotton filters of different weights: A, 0 mg (no filter); B, 20 mg; C, 50 mg; D, 150 mg.

Таблица 7. Оценка влияния массы ватного фильтра на показатели качества лиофилизата тест-штамма *S. Abony* NCTC 6017 до и после воздействия стресс-условий (повышенная температура хранения $+37\pm 2$ °C в течение 1 и 3 мес.)
Table 7. Quality of lyophilised samples of *S. Abony* NCTC 6017 before and after stress testing (storage at an elevated temperature of $+37\pm 2$ °C for 1 and 3 months) depending on the cotton filter weight

Масса ватного фильтра, мг <i>Cotton filter weight, mg</i>	Показатели качества лиофилизата <i>Lyophilisate quality parameters</i>					
	До стресс-теста <i>Baseline</i>				После стресс-теста ($+37$ °C в течение 1 мес.) <i>After stress testing (+37 °C for 1 mo)</i>	
	Описание (внешний вид) <i>Description (Appearance)</i>	Время растворения, с <i>Reconstitution time, s</i>	Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Количество жизнеспособных клеток ^a , КОЕ/мл <i>Viable cell count^a, CFU/mL</i>	Время растворения, с <i>Reconstitution time, s</i>	Количество жизнеспособных клеток ^a , КОЕ/мл <i>Viable cell count^a, CFU/mL</i>
0	+	10	1,4	$(6,5\pm 0,5)\times 10^4$	10	$(1,4\pm 0,1)\times 10^4$
20	+	10	1,5	$(6,4\pm 0,8)\times 10^4$	10	$(1,6\pm 0,1)\times 10^4$
50	+	10	1,5	$(6,7\pm 0,8)\times 10^4$	10	$(1,5\pm 0,3)\times 10^4$
150	–	50–60	5,0	$(6,8\pm 1,0)\times 10^4$	120	$(0,3\pm 0,1)\times 10^4$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «+» — сухая пористая масса в виде таблетки, цельная; «–» — таблетка неровная, крошится.

^a Среднеарифметическое значение и стандартное отклонение: $X_{cp} \pm S$.

Note. +, uniform, porous, and dry cake; –, non-uniform, crumbling cake.

^a Arithmetic means and standard deviations: $X_{cp} \pm S$.

Выводы

1. Определено время замораживания ампул с тест-штаммами в низкотемпературном морозильнике (-70 ± 2 °C): не менее 4 ч; допускается хранение в условиях замораживания до 1 мес. без потери качества конечного продукта.
2. Длительность этапа первичного высушивания для ампул объема заполнения 0,2 мл составила 6–8 ч.
3. С помощью стресс-теста изучено влияние этапа вторичного досушивания продолжительностью 11, 18, 35 и 59 ч на показатели качества лиофилизата. Количество жизнеспособных микробных клеток (КОЕ/мл) в готовых лиофилизатах тест-штаммов сразу после лиофилизации при любом изученном времени досушивания не имеет статистически значимых отличий. Содержание остаточной влаги варьирует от 2 до менее 1% при досушивании в течение 59 ч. Вторичное досушивание продолжительностью от 11 до 59 ч не оказывает влияния на качество готового продукта, что позволяет более широко варьировать параметры процесса лиофилизации.
4. Плотность ватного фильтра имеет критическое влияние на качество лиофилизата. Рекомендуется использование ватного фильтра массой не более 50 мг.

Литература/References

1. Червякова НС, Валова ТВ, Осин АВ. Использование лиофильных аппаратов камерного типа в коллекциях патогенных микроорганизмов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014;(3):65–8. Chervyakova NS, Valova TV, Osin AV. Application of freeze-dryers of chamber type in the collections of pathogenic microorganisms. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2014;(3):65–8. (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-3-65-68>
2. Чемисова ОС, Сагакянц ММ, Голенищева ЕН, Полеева МВ, Морозова ИВ. Лиофилизация коллекционных штаммов холерных вибрионов на аппарате коллекторного типа с использованием адсорбентов. *Бактериология*. 2018;3(4):16–20. Chemisova OS, Sagakyants MM, Golenischeva EN, Poleeva MV, Morozova IV. Lyophilization of collection strains of *Vibrio cholerae* on a collector-type apparatus using adsorbents. *Bacteriology*. 2018;3(4):16–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2018-4-16-20>
3. Блынская ЕВ, Тишков СВ, Алексеев КВ, Минаев СВ. Математическое моделирование этапа замораживания в технологии лиофилизированных лекарственных форм. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(2):15–21. Blynskaya EV, Tishkov SV, Alekseyev KV, Minaev SV. Mathematical modeling of the stage of freezing in technology of lyophilized drugs. *Russian Journal of Biotherapy*. 2018;17(2):15–21. (In Russ.). <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-2-15-21>
4. Kasper JC, Friess W. The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing

- methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011;72(2):248–63.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.03.010>
5. Assegehegn G, Brito-de la Fuente E, Franco JM, Gallegos C. The importance of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process performance. *J Pharm Sci*. 2019;108(4):1378–95.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.039>
 6. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984;247(3 Pt 1):C125–42.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
 7. Zhao G, Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol*. 2005;99(2):333–8.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x>
 8. Wang GQ, Pu J, Yu XQ, Xia YJ, Ai LZ. Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *J Dairy Sci*. 2020;103(4):3066–75.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17685>
 9. Jena S, Krishna Kumar NS, Aksan A, Suryanarayanan R. Stability of lyophilized albumin formulations: role of excipient crystallinity and molecular mobility. *Int J Pharm*. 2019;569:118568.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118568>
 10. Piszkiwicz S, Pielak GJ. Protecting enzymes from stress-induced inactivation. *Biochemistry*. 2019;58(37):3825–33.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00675>
 11. Rockinger U, Funk M, Winter G. Current approaches of preservation of cells during (freeze-) drying. *J Pharm Sci*. 2021;110(8):2873–93.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.018>
 12. Horn J, Friess W. Detection of collapse and crystallization of saccharide, protein, and mannitol formulations by optical fibers in lyophilization. *Front Chem*. 2018;6:4.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00004>
 13. Gaidhani KA, Harwalkar M, Bhambere D, Nirgude PS. Lyophilization/freezing drying — a review. *WJPR*. 2015;4(8):516–43.
 14. Chang LL, Shepherd D, Sun J, Tang XC, Pikal MJ. Effect of sorbitol and residual moisture on the stability of lyophilized antibodies: Implications for the mechanism of protein stabilization in the solid state. *J Pharm Sci*. 2005;94(7):1445–55.
<https://doi.org/10.1002/jps.20363>
 15. Peiren J, Hellemans A, de Vos P. Impact of the freeze-drying process on product appearance, residual moisture content, viability, and batch uniformity of freeze-dried bacterial cultures safeguarded at culture collections. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(14):6239–49.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7359-1>
 16. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J Microbiol Methods*. 2006;66(2):183–93.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
 17. Rey L, May JC, eds. *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. 3rd ed. CRC Press; 2010.
<https://doi.org/10.3109/9781439825761>
 18. Сакаева ИВ, Бунятян НД, Ковалева ЕЛ, Саканян ЕИ, Митькина ЛИ, Прокопов ИА и др. Основные подходы к изучению стабильности лекарственных средств: отечественный и международный опыт. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;(3):8–11.
 Sakaeva IV, Bunyatyan ND, Kovaleva EL, Sakanyan EI, Mitkina LI, Prokopov IA, et al. Basic approaches drug stability studies: domestic and international experience. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013;(3):8–11. (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2013-0-3>
 19. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J Gen Appl Microbiol*. 2008;54(1):9–24.
<https://doi.org/10.2323/jgam.54.9>
 20. Patel SM, Nail SL, Pikal MJ, Geidobler R, Winter G, Hawe A, et al. Lyophilized drug product cake appearance: what is acceptable? *J Pharm Sci*. 2017;106(7):1706–21.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.014>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Вклад распределен следующим образом: **А.А. Ворopaев** — формирование цели и задач исследований, выполнение всех экспериментальных исследований, анализ и интерпретация результатов, сбор, анализ и обобщение данных литературы, написание текста рукописи; **О.В. Фадейкина** — обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка результатов, написание текста рукописи; **Т.Н. Ермолаева** — проведение всех экспериментальных исследований, руководство при проведении лиофильного высушивания; **Д.С. Давыдов** —

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The contributions were as follows. **A.A. Voropaev** formulated the aim and objectives of the study; carried out all the experiments; analysed and interpreted the study results; collected, analysed, and summarised literature data; and drafted the manuscript. **O.V. Fadeikina** summarised experimental data, analysed and interpreted the results, carried out statistical processing of the results; and drafted the manuscript. **T.N. Ermolaeva** carried out all the experiments and supervised the freeze-drying process. **D.S. Davydov** provided advisory assistance in assessing the state of the art and

консультативная помощь при оценке состояния проблемы и анализе результатов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

analysing the results and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Воропаев Андрей Андреевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>
voropaev@expmed.ru

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
fadeikina@expmed.ru

Ермолаева Татьяна Николаевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0960-7194>
ermolaeva@expmed.ru

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>
davydov@expmed.ru

Andrey A. Voropaev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>
voropaev@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
fadeikina@expmed.ru

Tatyana N. Ermolaeva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0960-7194>
ermolaeva@expmed.ru

Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>
davydov@expmed.ru

Поступила 01.11.2022

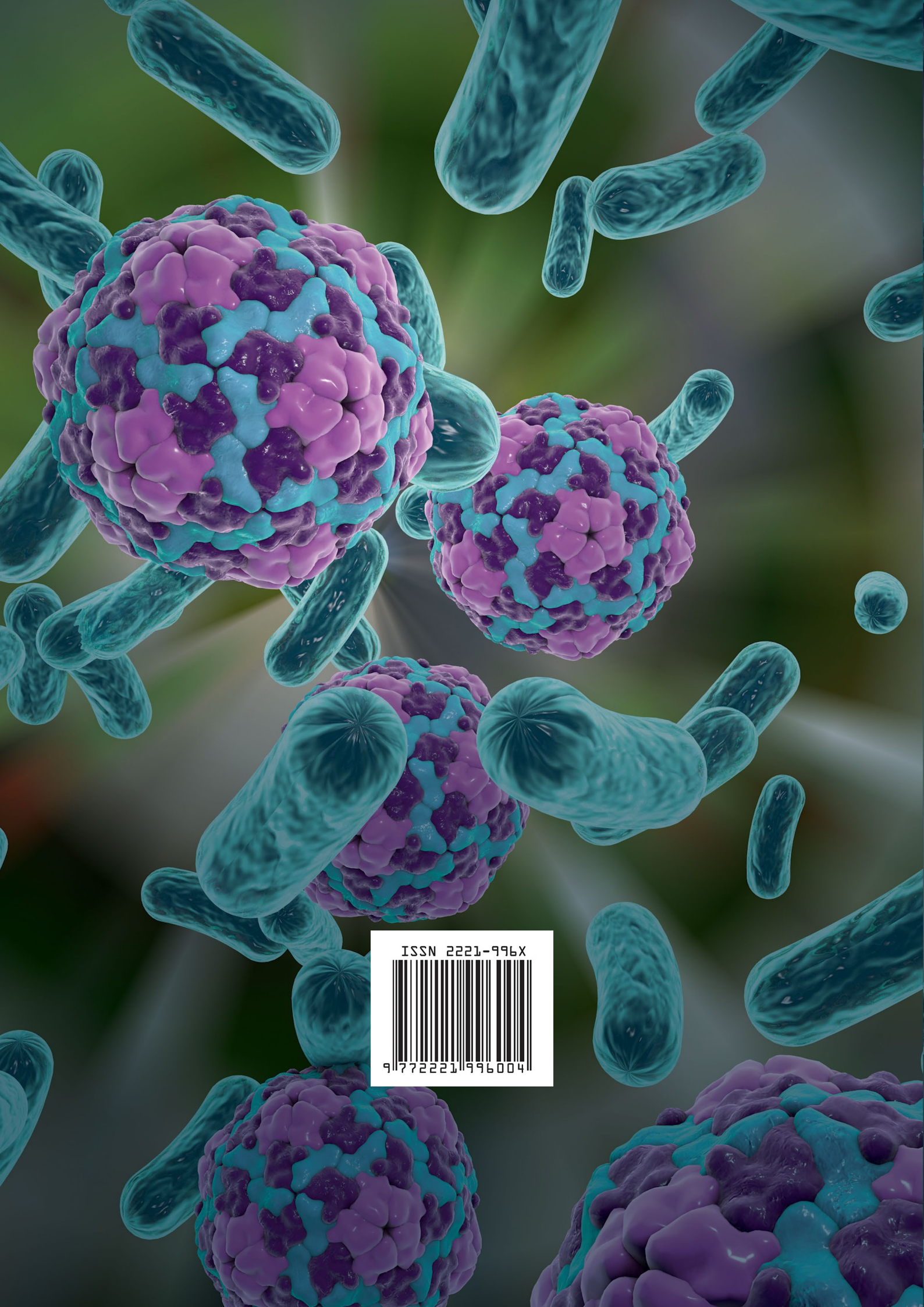
После доработки 03.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 1 November 2023

Revised 3 August 2023

Accepted 13 September 2023



ISSN 2221-996X



9 772221 996004