

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

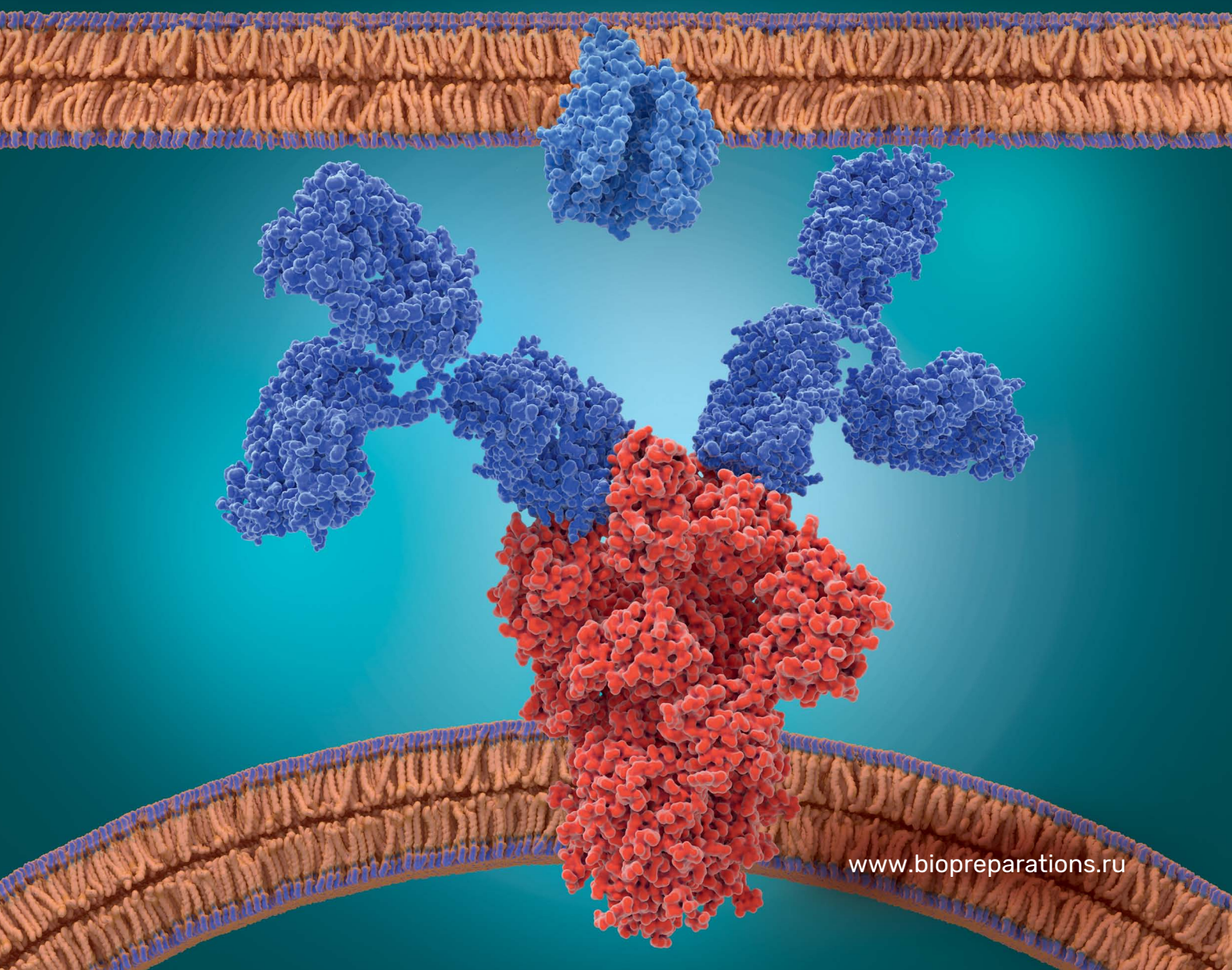
БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume	№ / No.
23	4
2023	



www.biopreparations.ru

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

ТОМ 23, № 4, 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 0,960.

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. 4, 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 0.960.

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 the Creative Commons Attribution 4.0 International licence (CC BY 4.0).

На обложке: Антитела, связывающиеся с Spike-белком коронавируса, предотвращают его связывание с ACE2 в клетке человека (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX362108360/>)

Cover image: Antibodies binding to the spike protein of the coronavirus prevent its binding to ACE2 on a human cell (a licensed image from the Photogenica image bank <https://photogenica.ru/zoom/PHX362108360/>)

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, MD, 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 «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия)

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

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

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

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

Токаревич 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

Гукасова 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

11.12.2023

Дата выхода в свет

23.12.2023

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

Л.А. Гайдерова, Н.А. Алпатова, С.Л. Лысикова, М.Л. Байкова,
А.М. Гуськов, Д.А. Зубков

**Международные стандартные образцы моноклональных
антител для оценки биологической активности
лекарственных препаратов: современное состояние.....480**

А.С. Коровкин, Г.М. Игнатьев

**Результаты и перспективы вакцинопрофилактики
ротавирусной инфекции в Российской Федерации.....499**

А.А. Солдатов, Д.В. Горенков, Ж.И. Авдеева, В.А. Меркулов

**Современные нормативные требования
к проведению клинических исследований вакцин
против вирусных инфекций.....513**

Оригинальные статьи

В.А. Евсеев, А.В. Зайковская, А.С. Гудымо, О.С. Таранов,
С.Е. Олькин, А.Р. Иматдинов, Е.Ю. Прудникова,
Н.В. Данильченко, И.С. Шульгина, М.Н. Косенко, Е.И. Даниленко,
С.А. Пьянков, А.Б. Рыжиков

**Оценка гуморального иммунного ответа экспериментальных
животных на введение рекомбинантного эктодомена
поверхностного S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2
с ИСКОМ-адьювантом.....530**

Е.В. Отрашевская, К.В. Каа, Т.Г. Самарцева, А.С. Оксанич,
Г.М. Игнатьев

**Эффективность применения индуктора интерферонов
против вируса Чикунгунья *in vitro*.....544**

Н.В. Абзаева, И.В. Кузнецова, С.Е. Гостищева, А.М. Жиров,
Д.А. Ковалев, А.В. Костроминов, А.А. Фисун, Г.Ф. Иванова

**Перспективы применения метода проточной цитометрии
в оценке качества препарата вакцины чумной живой560**

М.В. Абрамцева, Н.С. Алехина, Е.Д. Колышкина

**Экспериментальная оценка возможности определения
бактериальных эндотоксинов с помощью гель-тромб теста
в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной.....570**

А.А. Воропаев, О.В. Фадейкина, В.Ф. Евлашкина, Т.Д. Боханова,
Д.С. Давыдов

**Валидационные исследования методики спирального
посева для определения «Специфической активности»
лактосодержащих пробиотических препаратов.....584**

Благодарности рецензентам.....594

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 and Biological Agency (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, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (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 Scientific Center for Applied Microbiology and 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 and 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 Editors

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 LLC:

9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver

170034

Print run

150 copies. Free price

Passed for printing

11 December 2023

Date of publication

23 December 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

L.A. Gayderova, N.A. Alpatova, S.L. Lysikova, M.L. Baykova,
A.M. Guskov, D.A. Zubkov

**International standards for monoclonal antibodies for assessing
the biological activity of medicines: A status update480**

A.S. Korovkin, G.M. Ignatyev

**Results and prospects of rotavirus immunisation
in the Russian Federation499**

A.A. Soldatov, D.V. Gorenkov, Zh.I. Avdeeva, V.A. Merkulov

**Current regulatory requirements for clinical trials
of viral vaccines513**

Original articles

V.A. Evseenko, A.V. Zaykovskaya, A.S. Gudymo, O.S. Taranov,
S.E. Olkin, A.R. Imatdinov, E.Yu. Prudnikova, N.V. Danilchenko,
I.S. Shulgina, M.N. Kosenko, E.I. Danilenko, S.A. Pyankov,
A.B. Ryzhikov

**Evaluation of humoral immune responses of experimental
animals to the recombinant SARS-CoV-2 spike ectodomain
with the ISCOM adjuvant.....530**

E.V. Otrashkevskaja, K.V. Kaa, T.G. Samartseva, A.S. Oksanich,
G.M. Ignatyev

**Efficacy of interferon inducers against Chikungunya virus
in vitro544**

N.V. Abzaeva, I.V. Kuznetsova, S.E. Gostischeva, A.M. Zhirov,
D.A. Kovalev, A.V. Kostrominov, A.A. Fisun, G.F. Ivanova

**Prospects for using flow cytometry in the quality control
of live plague vaccines.....560**

M.V. Abramtseva, N.S. Alekhina, E.D. Kolyshkina

**Experimental evaluation of the possibility of determining
bacterial endotoxins in typhoid Vi polysaccharide vaccines
using the gel-clot test570**

A.A. Voropaev, O.V. Fadeikina, V.F. Evlashkina, T.D. Bohanova,
D.S. Davydov

**Validation studies of the spiral plating method to determine
the potency of lactobacillus-containing probiotics.....584**

Thank you to all our reviewers594



Международные стандартные образцы моноклональных антител для оценки биологической активности лекарственных препаратов: современное состояние

Л.А. Гайдерова, Н.А. Алпатова , С.Л. Лысикова, М.Л. Байкова, А.М. Гуськов, Д.А. Зубков

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

 Алпатова Наталья Александровна; alpatova@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Эффект клинического применения биотехнологических препаратов на основе моноклональных антител (МкАТ) и истечение срока действия патентов на оригинальные (референтные) препараты стимулировали разработку биоаналогичных МкАТ, профиль качества которых должен соответствовать качеству референтного лекарственного средства. Изучение биологических свойств МкАТ при доказательстве биоподобия и определение активности препаратов в рамках контроля качества серий необходимо проводить с использованием подходящих стандартных образцов (СО). В связи с отсутствием международных стандартов производители препаратов МкАТ применяют собственные стандартные образцы, но, учитывая сложную структуру и гетерогенность МкАТ, а также наличие связи между биологической активностью и клинической эффективностью, нельзя исключить наличие риска расхождения данных о качестве и эффективности препаратов.

Цель. Анализ сведений об актуальности и необходимости разработки международных стандартных образцов (МСО) для определения биологической активности биотерапевтических МкАТ, о роли референтных препаратов и МСО при оценке сходства/подобия, а также на разных этапах жизненного цикла биоаналогичных препаратов МкАТ.

Обсуждение. Рассмотрены проблемы, связанные с отсутствием МСО для оценки активности препаратов МкАТ. Приведены сведения о роли и значимости референтных препаратов и МСО для биоаналогичных препаратов. Представлена информация об особенностях изучения биологических свойств МкАТ и обобщены данные о необходимости разработки и применения МСО для стандартизации биологических тестов. В обзоре представлены результаты исследований первых утвержденных ВОЗ международных стандартных образцов для оценки биологической активности МкАТ, свидетельствующие о необходимости стандартизации препаратов МкАТ с использованием МСО для обеспечения их качества, безопасности и эффективности.

Заключение. Применение МСО для препаратов МкАТ играет ключевую роль в гармонизации подходов к оценке их биологической активности. Общедоступные МСО препаратов МкАТ необходимы как первичные СО для аттестации вторичных СО, для гармонизации подходов к оценке активности МкАТ (в международных единицах) между лабораториями, а также для согласования активности препаратов одного международного непатентованного наименования разных производителей. Использование МСО производителями МкАТ будет способствовать гарантии качества препаратов МкАТ и обеспечению клинического мониторинга эффективности их применения.

Ключевые слова: моноклональные антитела; терапевтические белки; международные стандартные образцы; биоподобие; биоаналогичные (биоподобные) препараты; референтный препарат; качество; биологическая активность; эффективность; биологические тесты

© Л.А. Гайдерова, Н.А. Алпатова, С.Л. Лысикова, М.Л. Байкова, А.М. Гуськов, Д.А. Зубков, 2023

Для цитирования: Гайдерова Л.А., Алпатова Н.А., Лысикова С.Л., Байкова М.Л., Гуськов А.М., Зубков Д.А. Международные стандартные образцы моноклональных антител для оценки биологической активности лекарственных препаратов: современное состояние. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):480–498. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-480-498>

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.

International standards for monoclonal antibodies for assessing the biological activity of medicines: A status update

Lidia A. Gayderova, Natalia A. Alpatova✉, Svetlana L. Lysikova, Marina L. Baykova, Alexander M. Guskov, Dmitriy A. Zubkov

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

✉ Natalia A. Alpatova; alpatova@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. The clinical effects and the expiration of patents for original (reference) biotechnological medicines based on monoclonal antibodies (mAbs) stimulated the development of biosimilar mAbs. The quality profile of a biosimilar mAb should correspond to the quality of the reference medicinal product. When demonstrating biosimilarity and determining the activity of medicines as part of batch quality control, analysts should study the biological properties of mAbs using suitable reference standards. The lack of international standards (ISs) makes mAb manufacturers use in-house reference standards. There is a risk of obtaining non-uniform quality and efficacy data because of the use of in-house reference standards, the heterogeneity and structural complexity of mAbs, and the relationship between the biological activity and efficacy of mAbs.

Aim. This study aimed to analyse the relevance of and need for ISs for the biological activity of biotherapeutic mAbs and to define the role of reference medicinal products and ISs in assessing biosimilarity and testing medicines throughout their lifecycle.

Discussion. This review covers the issues arising from the lack of ISs for assessing the biological activity of mAbs and the role and significance of reference products and ISs for biosimilars. The authors describe the specifics of studying the biological properties of mAbs and summarise the data on the need to develop and use ISs for the standardisation of biological tests. This review presents the results of studies on the first ISs established by the World Health Organisation to assess the biological activity of mAbs; these results suggest the need to standardise mAbs using ISs to ensure the quality, safety, and efficacy of mAb therapy.

Conclusions. The use of ISs for mAbs plays a key role in harmonising biological activity assessments. Publicly available ISs serve as primary standards for the calibration of secondary reference materials. Moreover, ISs are required for the harmonisation of activity evaluation (in IU) between laboratories and for the consistency of the activity of various medicinal products from different manufacturers that share the same INN. The use of ISs by mAb manufacturers will contribute to ensuring the quality of mAbs and clinical monitoring of the effectiveness of their use.

Keywords:

monoclonal antibodies; mAbs; therapeutic proteins; international standards; biosimilarity; biosimilars; reference medicinal product; quality; biological activity; efficacy; biological tests

For citation:

Gayderova L.A., Alpatova N.A., Lysikova S.L., Baykova M.L., Guskov A.M., Zubkov D.A. International standards for monoclonal antibodies for assessing the biological activity of medicines: a status update. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):480–498. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-480-498>

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 reporting No. 121022000147-4).

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

Введение

Биофармацевтика является одним из наиболее быстроразвивающихся сегментов мирового фармацевтического рынка. Разработка биотехнологических лекарственных препаратов (БТЛП) способствовала появлению новых методов лечения ряда трудноизлечимых заболеваний. По истечении срока действия патентов на зарегистрированные оригинальные (референтные) БТЛП терапевтические белки становятся открытыми для разработки и производства другими компаниями. Однако новый продукт не может быть воспроизведен идентично оригинальному, учитывая модифицированные условия производства и применение иного штамма-продуцента. К примеру, могут иметь место посттрансляционные модификации продукта, например профиля его гликозилирования [1].

Препараты данной группы определены как «биоаналогичные (биоподобные), содержащие версию активной фармацевтической субстанции (действующего вещества) зарегистрированного оригинального (референтного) препарата, для которого продемонстрировано сходство (подобие) с оригинальным (референтным) лекарственным препаратом по показателям качества, биологической активности, эффективности и безопасности»¹, а также профилю безопасности и иммуногенности. На международном фармацевтическом рынке количество биоподобных препаратов увеличивается с каждым годом, в настоящее время в мире зарегистрировано более 200 биоаналогичных препаратов [2].

Среди БТЛП доминирующим классом являются моноклональные антитела (МкАТ) из-за высокой специфичности их терапевтического воздействия и длительного периода полувыведения, при этом данная группа включает простые терапевтические МкАТ, модифицированные МкАТ (такие как белки слияния, биспецифичные МкАТ, фрагменты МкАТ) и конъюгированные, содержащие МкАТ и лекарственное средство [3].

МкАТ представляют собой иммуноглобулины (Ig), состоящие из двух легких и двух тяжелых цепей, соединенных дисульфидными связями. В структуре МкАТ выделяют три фрагмента: два антигенсвязывающих Fab-фрагмента, каждый из которых содержит переменные домены легкой и тяжелой цепей, а также константный домен тяжелой цепи, и один Fc-фрагмент, содержащий тяжелые цепи [4]. Fab-фрагмент содержит область, определяющую комплементарность (complementarity-determining region, CDR) связывания с антигеном (АГ) и обеспечивающую специфическое взаимодействие МкАТ с мишенью. Гипервариабельные участки в области CDR позволяют антителу (АТ) распознавать различные эпитопы АГ. Fc-фрагмент молекулы МкАТ участвует в активации клеточных сигнальных путей и имеет решающее значение для проявления антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [5]. МкАТ могут быть специфичны к различным рецепторам и лигандам иммунокомпетентных и опухолевых клеток, а также растворимым эндогенным медиаторам. В зависимости от происхождения различают химерные, гуманизированные и полностью человеческие МкАТ [6].

Разработка биоаналогичных препаратов МкАТ представляет собой сложный многоступенчатый процесс, на этапах которого должны быть определены и подробно изучены критические параметры качества МкАТ, включая первичную и пространственную структуры, посттрансляционные модификации, изоформы продукта, биологические функции на молекулярном и клеточном уровнях, что необходимо для оценки свойств препаратов при коммерческом производстве [7]. Влияние параметров качества на безопасность и эффективность препарата основано на структурно-функциональной взаимосвязи [8].

При доказательстве биоподобия необходимо проведение исследований по изучению сходства структурных характеристик и функциональных свойств биоаналогичных препаратов

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

с референтным препаратом (РП)² [2]. Оценка фармакодинамических свойств и биологической активности МкАТ важна для понимания структурно-функциональных особенностей биоаналогичных препаратов, механизмов их взаимодействия с биологическими мишенями, что формирует основу для установления функциональной сопоставимости с РП [8, 9].

Количественная оценка биологической активности, то есть специфической способности препарата вызывать определенный биологический эффект, является одним из критических показателей качества МкАТ. При этом требование количественного определения специфической биологической активности является ее сравнение с соответствующим стандартным образцом (СО)³.

Цель работы — анализ сведений об актуальности и необходимости разработки международных стандартных образцов (МСО) для определения биологической активности биотерапевтических МкАТ, о роли РП и МСО при оценке сходства/подобия, а также на разных этапах жизненного цикла биоаналогичных препаратов МкАТ.

Особенности оценки биологических свойств препаратов моноклональных антител

Решающее значение для проявления функциональных свойств препаратов МкАТ имеет взаимодействие с АГ, поскольку направленность действия МкАТ осуществляется за счет лиганд-опосредованного механизма. Для эффективности МкАТ важными являются их связывающая активность, биологические и эффекторные функции [10].

Методы, используемые для изучения функциональной сопоставимости биоаналогичных МкАТ, подразделяются на две основные группы. К первой относятся методы оценки связывания, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA), метод проточной цитофлуориметрии, методы флуоресцентного резонансного переноса энергии и поверхностного плазмонного резонанса, позволяющие охарактеризовать функции, опосредованные структурой МкАТ [11–14]. С помощью перечисленных методов проводится изучение связывания МкАТ с мишенью или с рецепторами клеточной поверхности, такими как FcγR и FcRn,

а также с компонентами системы комплемента для оценки Fc-опосредованной цитотоксичности [15–17]. Методы *in vitro*, наиболее часто применяемые при изучении биологических свойств препаратов МкАТ, представлены в *таблице 1*.

Механизм действия МкАТ в большинстве случаев опосредован процессами, происходящими после связывания лиганда. В связи с этим оценка только связывания не в полной мере отражает эффективность МкАТ. При связывании МкАТ с разными мишенями наблюдается развитие как раннего ответа (активация сигнальных путей), так и позднего ответа (стимуляция или подавление пролиферации чувствительных клеток, выработка цитокинов). В связи с этим активность препарата МкАТ целесообразно оценивать исходя из понимания его механизма действия, используя соответствующие клеточные линии. При этом должен быть определен маркер, отвечающий за развитие раннего или позднего ответа, клеточную адгезию и др., проявление активности которого подавляется при использовании МкАТ [8].

Для оценки биологической активности препаратов МкАТ применяют в основном методики *in vitro* на культурах клеток, отражающие механизм их действия в организме человека, что позволяет оценить взаимодействие МкАТ с соответствующими мишенями [6, 9, 18]. На *рисунке 1* представлены основные механизмы действия терапевтических МкАТ⁴. Наиболее часто в методиках *in vitro* оценивается активность, проявляющаяся посредством таких механизмов, как подавление пролиферации клеток, антителозависимая клеточная цитотоксичность (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (complement-dependent cytotoxicity, CDC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) и апоптоз [8].

Учитывая, что препараты МкАТ имеют сложную структуру с выраженной гетерогенностью (профиль гликозилирования, степень окисления, дезамидирования, заряд и др.), при доказательстве биоподобия необходимо подтверждение того, что выявляемые различия не оказывают влияния на безопасность и эффективность биоаналогичных препаратов. При этом оценка биологической активности в тестах с использованием клеточных культур играет важную роль

² Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CPMP/42832/2005 Rev1). EMA; 2014. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-2.pdf

³ Guidelines on evaluation of monoclonal antibodies as similar biotherapeutic products (SBPs), Annex 2, TRS No 1004. WHO; 2017.

⁴ https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/session-1-cmc-innovator-industry-presentation-prof-georg-b-kresse_en.pdf

Таблица 1. Методы *in vitro* для изучения препаратов моноклональных антител при оценке сопоставимости
Table 1. *In vitro* methods for assessing the comparability of mAbs

Методы оценки биологических свойств препаратов МкАТ <i>Methods for assessing biological properties of mAbs</i>	
Оценка связывания <i>Methods to assess binding</i>	Оценка функциональных свойств <i>Methods to assess functional properties</i>
1. Специфическое связывание с мишенью. Методы: проточная цитофлуориметрия, твердофазный ИФА <i>1. Specific binding to targets.</i> <i>Methods: FACS, ELISA</i> 2. Связывание с рецепторами клеточной поверхности — FcγR (FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb), FcRn и системой комплемента (C1q). Методы: ППР, БСИ, РПЭФ <i>2. Binding to cell-surface receptors FcγR (FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, and FcγRIIIb) and FcRn, as well as the complement system (C1q).</i> <i>Methods: SPR, BLI, FRET</i>	1. Оценка функций, ассоциированных с Fab-фрагментом: – нейтрализация действия; – активация рецептора; – блокирование рецептора <i>1. Fab-associated functions:</i> – <i>neutralisation of action;</i> – <i>receptor activation;</i> – <i>receptor blockade</i> 2. Оценка функций, ассоциированных с Fc-фрагментом: – антителозависимая клеточная цитотоксичность; – комплементзависимая цитотоксичность; – активация комплемента <i>2. Fc-associated functions:</i> – <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity;</i> – <i>complement-dependent cytotoxicity;</i> – <i>complement activation</i>

Таблица составлена авторами по данным [8] / The table is prepared by the authors using data from [8]

Примечание. ИФА — иммуноферментный анализ, FcγR — Fc-гамма-рецептор, FcRn — неонатальный Fc-рецептор, ППР — поверхностный плазмонный резонанс, БСИ — биослойная интерферометрия, РПЭФ — резонансный перенос энергии флуоресценции.

Note. FACS, fluorescence-activated cell sorting; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FcγR, Fc-gamma receptor; FcRn, neonatal Fc-receptor; SPR, surface plasmon resonance; BLI, bio-layer interferometry; FRET, fluorescence resonance energy transfer.

в установлении такой взаимосвязи и при последующем изучении функциональной сопоставимости с РП [19, 20]. Набор тестов, используемых при изучении сходства биоаналогичного препарата с РП, должен быть подобран с учетом особенностей целевого рецептора/антигена и показания к применению разрабатываемого биоаналогичного МкАТ [8]. Таким образом, набор клеточных тестов для доказательства биоподобия уникален для каждого разрабатываемого биоаналогичного препарата.

Для многих терапевтических МкАТ используются индивидуальные тесты оценки специфической активности [6]. Одним из необходимых условий обеспечения качества БТЛП является определение их активности с использованием валидированных методик, а также международного или фармакопейного СО. В течение многих лет после регистрации первых оригинальных препаратов МкАТ указанные СО отсутствовали, поскольку действующие вещества МкАТ, являясь биотехнологическими продуктами, не имеют природного аналога. Поэтому производители разрабатывали внутренние СО предприятия, которые применяли при оценке качества каждого конкретного препарата. При этом отсутствие доступных образцов сравнения, необходимых

для стандартизации биологических методик и аттестации внутренних СО, являлось проблемой для производителей биоаналогичных препаратов [21].

Необходимость разработки международных стандартных образцов для терапевтических моноклональных антител

Концепция биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов в настоящее время достаточно развита и обоснована, доступны современные аналитические методы, собраны многочисленные сведения и получены знания о неоднородности продуктов вследствие различий в технологическом процессе производства референтных и биоаналогичных препаратов [21, 22].

Развитие технических возможностей и нормативной базы для доказательства биоподобия и оценки качества биоаналогичных препаратов способствовало повышению темпов регистрации биоаналогичных МкАТ. В Европейском союзе к 2023 г. зарегистрировано более 40 препаратов⁵ [23], в России на настоящий момент зарегистрировано 19 биоподобных МкАТ⁶ (табл. 2).

⁵ <https://www.gabionline.net/biosimilars/general/biosimilars-approved-in-europe>

⁶ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru/>

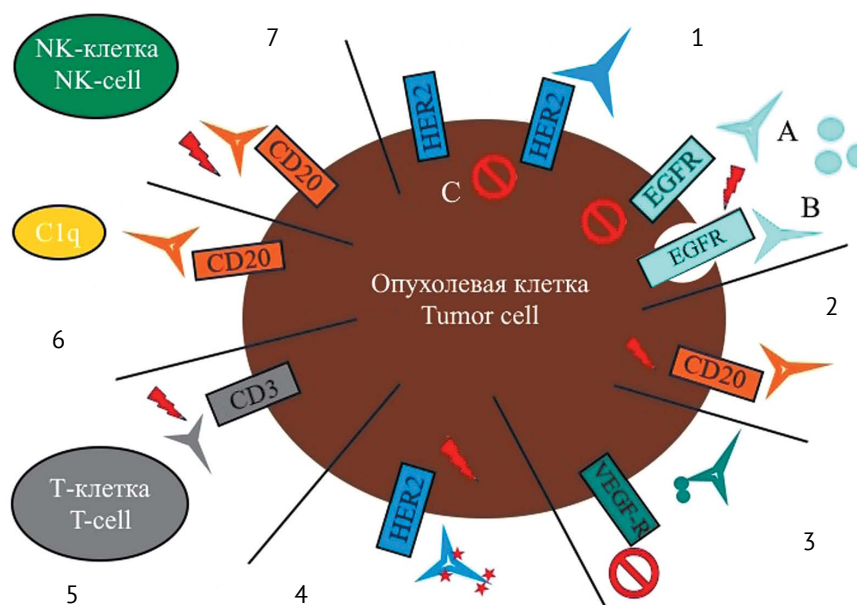


Рисунок подготовлен авторами по материалам EMA⁷ с изменениями / The figure is adapted by the authors from EMA materials⁷

Рис. 1. Механизмы действия препаратов моноклональных антител. 1 – ингибирование передачи сигнала или активации рецептора (А – ингибирование связывания с лигандом, В – индукция интернализации рецептора, С – ингибирование димеризации рецептора); 2 – индукция апоптоза; 3 – блокирование связывания с лигандом; 4 – действие на токсины; 5 – активация Т-клеток; 6 – активация системы комплемента; 7 – активация эффекторных механизмов, антителозависимая клеточная цитотоксичность.

Fig. 1. Mechanisms of action of mAbs. 1, inhibition of signal transduction or receptor activation (A, inhibition of ligand binding; B, induction of receptor internalisation; C, inhibition of receptor dimerisation); 2, induction of apoptosis; 3, blockade of ligand binding; 4, targeting of toxins; 5, activation of T-cells; 6, activation of the complement system; 7, activation of effector mechanisms, antibody-dependent cellular cytotoxicity.

В связи с тем что БТЛП не могут быть адекватно охарактеризованы только с помощью физико-химических методов анализа, обеспечение постоянства их биологической активности является важной задачей нормативного регулирования [23]. В отсутствие первичного МСО сравнение различных лицензированных продуктов одного международного непатентованного наименования (МНН) в течение их жизненного цикла не представляется возможным. Учитывая наличие связи между биологической активностью и клинической эффективностью, нельзя исключить риск расхождения в результатах оценки качества и эффективности продуктов, что, в свою очередь, может вызывать опасения, например при рассмотрении вопроса о взаимозаменяемости оригинальных

и биоаналогичных БТЛП [21, 24, 25]. В связи с этим выражение активности МкАТ в единицах биологической активности по отношению к независимому стандарту является важным инструментом нормативного регулирования [25].

МСО Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) являются первичными СО и доступны для широкого круга действующих веществ лекарственных препаратов, включая БТЛП⁸. Кандидаты в МСО производятся в соответствии с определенными стандартными процедурами, которые оптимизируют сохранение биологической активности и других важных характеристик образцов для повышения их стабильности⁹. После подтверждения пригодности кандидата в рамках международного совместного исследования он утверждается

⁷ https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/session-1-cmc-innovator-industry-presentation-prof-georg-b-kresse_en.pdf

⁸ Providing international biological reference preparations. WHO. https://www.who.int/biologicals/reference_preparations/en/ WHO international standards. NIBSC. https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/who_standards.aspx

⁹ Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards, Annex 2, TRS No 932. WHO; 2004.

Таблица 2. Биоаналогичные (биоподобные) препараты моноклональных антител, зарегистрированные в Российской Федерации

Table 2. Biosimilar monoclonal antibodies approved in the Russian Federation

№	Референтный препарат (МНН) <i>Reference product (INN)</i>	Метод оценки активности <i>Activity evaluation method</i>	Биоподобный препарат <i>Biosimilar</i>
1	Мабтера® (ритуксимаб) <i>MabThera® (rituximab)</i>	Комплементзависимая цитотоксичность на культуре клеток <i>Complement-dependent cytotoxicity in vitro</i>	Ацеллбия® <i>Acellbia®</i> Реддитукс® <i>Reditux®</i> Ритуксара® <i>Rituxara®</i>
2	Ремикейд® (инфликсимаб) <i>Remicade® (infliximab)</i>	Нейтрализация цитолитического действия TNF-α на культуре клеток <i>Neutralisation of the cytolytic activity of TNF-α in vitro</i>	Фламмегис® <i>Flammegis®</i> Инфликсимаб ^a <i>Infliximab^a</i>
3	Герцептин® (трастузумаб) <i>Herceptin® (trastuzumab)</i>	Подавление пролиферации клеток <i>Inhibition of cell proliferation</i>	Гертикад® <i>Herticad®</i> Тразимера® <i>Trazimera®</i>
4	Авастин® (бевацизумаб) <i>Avastin® (bevacizumab)</i>	Подавление пролиферации эндотелиальных клеток <i>Inhibition of endothelial cell proliferation</i>	Авегра® <i>Avegra®</i> Версаво® <i>Versavo®</i> Бевацизумаб <i>Bevacizumab</i>
5	Хумира® (адалимумаб) <i>Humira® (adalimumab)</i>	Нейтрализация цитолитического действия TNF-α на культуре клеток <i>Neutralisation of the cytolytic activity of TNF-α in vitro</i>	Далибра® <i>Dalibra®</i> Эксэмптия® <i>Exemptia®</i>
6	Ксолар® (омализумаб) <i>Xolair® (omalizumab)</i>	Подавление связывания иммуноглобулина Е с рецептом (конкурентный ИФА) <i>Suppression of immunoglobulin E binding to the receptor (competitive ELISA)</i>	Генолар® <i>Genolair®</i>
7	Энбрел® (этанерцепт) <i>Enbrel® (etanercept)</i>	Нейтрализация апоптоза, индуцированного TNF-α; подавление биологической активности TNF-α на культуре клеток; количественное определение гена-репортера <i>Neutralisation of TNF-α-induced apoptosis; inhibition of biological activity of TNF-α in vitro; reporter gene quantitation</i>	Этанерцепт ПСК <i>Etanercept PSK</i> Эрелзи® <i>Erelzi®</i>
8	Солирис® (экулизумаб) <i>Soliris® (eculizumab)</i>	Связывание с белком C5 комплемента человека (ИФА) <i>Binding to human complement C5 protein (ELISA)</i>	Элизария® <i>Elizaria®</i> Ацверис® <i>Acveris®</i>
9	Китруда® (пембролизумаб) <i>Keytruda® (pembrolizumab)</i>	Биологический тест на культуре клеток (ИФА) <i>Bioassay in vitro (ELISA)</i>	Пемброриа <i>Pembroria</i>

Таблица составлена авторами по данным Государственного реестра лекарственных средств¹⁰ / The table is prepared by the authors using the data from the State Register of Medicines¹⁰

Примечание. МНН — международное непатентованное наименование, TNF-α — фактор некроза опухоли альфа, ИФА — иммуноферментный анализ.

^a Зарегистрировано два препарата «Инфликсимаб» (АО «БИОКАД», Россия и ООО «Фармапарк», Россия).

Note. INN, international non-proprietary name; TNF-α, tumour necrosis factor alpha; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

^a There are two infliximab products approved in Russia (by BIOCAD JSC, Russia, and Pharmapark LLC, Russia).

Экспертным комитетом по биологической стандартизации ВОЗ в качестве МСО. Калибруются МСО в единицах или международных единицах (МЕ) на ампулу, которые назначаются

эмпирически. Используются МСО для валидации и стандартизации биологических тестов и при аттестации вторичных или внутренних СО предприятий [26, 27].

¹⁰ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

В ходе разработки и регистрации оригинальных МкАТ подходящих МСО не существует, и, следовательно, когда на рынке присутствует один новый продукт, его биологическая активность выражается в единицах, предложенных производителем, а регуляторные органы разрешают дозировку и маркировку препарата в единицах массы. Напротив, когда на рынок поступают биоаналогичные МкАТ разных производителей, МСО необходимы для обеспечения согласованного измерения их биологической активности [28]. При наличии на рынке нескольких продуктов, каждый из которых имеет свой жизненный цикл, сохраняется возможность расхождения результатов определения биологической активности как между биоаналогичными препаратами, так и по сравнению с РП. Без применения МСО регуляторные органы не могут ни оценить отклонения активности какого-либо отдельного продукта, ни сравнить результаты оценки активности препаратов одного МНН.

Использование единого СО биологической активности, по которому производители могут аттестовать свои внутренние СО, необходимо для выявления различий при определении активности препаратов, представленных на рынке [25]. Хотя отклонения значений активности могут и не иметь клинических последствий, наличие МСО позволяет как регуляторным органам, так и производителям выявлять проблемы в случае их возникновения, определять их клиническую значимость и принимать меры при необходимости. При этом МСО могут применяться производителями оригинальных и биоаналогичных препаратов как при разработке продуктов, так и после их регистрации [21].

На разных этапах жизненного цикла референтного и биоаналогичных препаратов в процессы их производства возможно внесение изменений. Для биоаналогичного препарата не требуется повторно устанавливать сходство/подобие с РП при проведении исследований сопоставимости после внесения изменений. Однако следует оценить влияние изменений, вносимых в процесс производства, на качество, безопасность и эффективность препаратов¹¹. Необходимо подтвердить, что препараты, изготовленные до и после изменения процесса производства, являются сопоставимыми, то есть свойства препарата, полученного после внесения изменений, по основным показателям качества, безопасности и эффективности не отличаются от исходного. При подтверждении сопоставимости необходимо изучение

физико-химических и биологических свойств продуктов [29]. Наличие и применение МСО для МкАТ как СО, оптимизированных для биологических тестов, повышает обоснованность результатов оценки сопоставимости.

Важно, что наличие МСО позволяет проводить независимый анализ результатов оценки биологической активности биоаналогичных препаратов во всем мире [30]. В более широком смысле применение МСО будет способствовать внедрению единых стандартов качества для производства и регистрации безопасных и эффективных БтЛП.

Роль референтных лекарственных препаратов и международных стандартных образцов на разных этапах жизненного цикла моноклональных антител

Несмотря на очевидную значимость МСО при оценке активности и их успешное применение для обеспечения качества биологических лекарственных средств, внедрение в практику МСО для терапевтических МкАТ вызвало ряд вопросов, обусловленных недопониманием роли РП и МСО в жизненном цикле биоаналогичных МкАТ [21]. В ряде публикаций подчеркивается, что внедрение МСО не отменяет применение РП при доказательстве биоподобия и не приводит к изменению дозировок зарегистрированных препаратов в единицах массы [21, 25, 26].

На этапах разработки и производства оригинальных и биоаналогичных МкАТ при изучении их свойств и контроле качества используются СО, а для биоаналогичных препаратов необходимо также проведение сравнительных исследований для доказательства сходства/подобия РП с установленным профилем клинической безопасности и эффективности [26]. В процессе создания оригинальных препаратов МкАТ при разработке биологических тестов в качестве промежуточных СО используются партии продуктов, полученные на ранних этапах разработки. Для биоподобных МкАТ при разработке используются серии РП, а на последующих этапах при контроле качества продукта в качестве промежуточных СО уже применяются охарактеризованные партии биоаналогичного продукта. Впоследствии промежуточный СО заменяется первичным СО, который представляет собой хорошо охарактеризованную партию препарата, применяемую в клинических исследованиях, используемую для аттестации рабочих СО, необходимых при рутинном выпуске серий и тестировании

¹¹ ICH Q5E Comparability of Biotechnological/Biological Products; 2005.

стабильности. Производители присваивают единицы биологической активности первичным СО, чтобы обеспечить постоянство характеристик и прослеживаемость оценки критических показателей качества продуктов [31].

При оценке активности биоаналогичных МкАТ в качестве СО не применяется РП, поскольку значение активности РП не выражено в официально признанных единицах (МЕ), а каждый флакон РП содержит количество МкАТ с определенной биологической активностью, которое находится в пределах нормированного диапазона. Это исключает возможность использования РП в качестве СО [21].

Следует отметить, что МСО ВОЗ не является лекарственным средством и не предназначен для использования при оценке биоподобия, в маркировке продукта или в определении терапевтической дозировки для пациентов [28]. МСО производится в соответствии с определенными спецификациями согласно рекомендациям ВОЗ, имеет присвоенную биологическую активность в МЕ на ампулу (содержание указано как номинальное значение), используется при определении активности в МЕ и для аттестации СО производителей [25, 26]. Относительно соответствующих МСО регуляторными органами и производителями возможно отслеживание показателей биологической активности как между продуктами и сериями продуктов, так и во времени – в течение продолжительных временных периодов. Определение активности с использованием биологических методов является одним из критических аспектов при серийном выпуске препаратов МкАТ, и в соответствии с международными требованиями необходимо использование общедоступных СО для стандартизации биологических методов¹². Таким образом, МСО активности препаратов МкАТ необходимы для выполнения современных нормативных требований.

Известно, что биоподобие подтверждается результатами оценки сходства биоаналогичного препарата с РП, при этом МСО можно использовать для валидации биотестов, применяемых на разных этапах разработки и производства биоаналогичных МкАТ, включая те, которые используются при изучении биоподобия. Кроме того, при оценке биологической активности МкАТ в МЕ, МСО является первичным стандартом для стандартизации биотестов и аттестации вторичных СО, что позволяет сравнивать результаты оценки активности, полученные как в разных лабораториях, так и между продуктами одного

МНН во всем мире. Это, в свою очередь, будет способствовать повышению уверенности в том, что пациенты получают сопоставимые дозы препаратов МкАТ разных производителей. Таким образом, роль МСО заключается и в согласовании данных об эффективности терапевтических МкАТ [21, 26].

Кроме того, применение МСО важно в ситуациях, когда активность МкАТ опосредована несколькими механизмами действия. Это необходимо учитывать при разработке биотестов, обосновании спецификаций, установлении показаний к клиническому применению и оценке того, возможна ли экстраполяция данных об эффективности биоаналогичного препарата на другие показания к применению. Обычно МСО МкАТ присваивают единицы биологической активности, обусловленной разными механизмами. В связи с этим применение МСО позволяет облегчить оценку потенциального расхождения данных о биологической активности нескольких препаратов МкАТ, для которых она обусловлена одним из следующих механизмов действия: CDC, ADCC, связывающая и нейтрализующая активность. При отсутствии МСО эти сравнения невозможны, поскольку имеющиеся данные будут выражены либо в единицах массы, либо в единицах биологической активности производителя, которые зависят либо от уникальной специфической активности продукта, либо от СО производителя соответственно [21].

Таким образом, РП и МСО выполняют разные роли при проведении разработки, доказательстве сходства/подобия и оценке качества биоаналогичных МкАТ.

Особенности разработки международных стандартных образцов

МСО выпускаются в относительно небольших количествах (несколько тысяч ампул) и используются для аттестации вторичных СО, таких как СО Европейской или Американской фармакопеи, или рабочих (внутренних) СО производителей [26]. МСО не являются продуктами для медицинского применения, но для их разработки применяют партии продуктов, используемых в клинических исследованиях. Далее образцы-кандидаты в МСО проходят стадии изменения состава компонентов (при необходимости) и лиофилизации в соответствии с рекомендациями ВОЗ с целью получения стабильного продукта, который будет соответствовать назначению в течение длительного времени (для некоторых МСО в течение десятилетий). Следует

¹² Guidelines on evaluation of monoclonal antibodies as similar biotherapeutic products (SBPs), Annex 2, TRS No 1004. WHO; 2017.

отметить, что нет требований относительно того, чтобы кандидат в МСО был разработан на основе оригинального препарата. Как правило, в исследованиях по разработке МСО используют образцы от производителей как оригинальных, так и биоаналогичных препаратов¹³ [28].

Пригодность заявляемых кандидатов в МСО оценивается в международных многоцентровых исследованиях, участники которых для характеристики СО используют соответствующие биотесты, в которых подтверждается, что кандидат проявляет сопоставимое действие по сравнению с другими соответствующими препаратами, такими как внутренние СО производителей и партии зарегистрированных продуктов одного МНН [26]. Анализ данных в этих исследованиях основывается на установлении границ эквивалентности, и согласованные критерии применяются к результатам испытаний, полученным во всех лабораториях. Биологическая активность международного СО выражается в производных МЕ [28].

Необходимым условием при разработке МСО является подтверждение стабильности образца в течение длительного периода времени. МСО не имеют установленного срока годности, однако необходимо подтверждение их стабильности и оценка уровня снижения активности при хранении в условиях ускоренного старения. Ампулы с кандидатом в МСО хранят при повышенных температурах, биологическую активность оценивают по сравнению с образцом, хранящимся при температуре минус 70 °С. Любые прогнозируемые ежегодные изменения активности указываются в инструкции по применению СО [26, 32].

МСО ВОЗ содержат действующие вещества в незначительных количествах (мкг) и для поддержания показателей стабильности в течение длительного времени выпускаются в лиофилизированной форме в запаянных стеклянных ампулах [32].

Международные стандартные образцы для препаратов моноклональных антител

Целесообразность создания МСО активности препаратов МкАТ обусловлена необходимостью

их применения в следующих ситуациях: в качестве СО для оценки биологической активности; при валидации методик; для аттестации национальных, фармакопейных или внутренних СО; для обеспечения надзора за качеством препаратов в течение их жизненного цикла; для разработки новых методов оценки биологической активности¹⁴.

В настоящее время разработаны и утверждены МСО ВОЗ¹⁵, предназначенные для использования в биологических тестах при определении специфической активности препаратов МкАТ (табл. 3).

В отчетах о результатах международных исследований по разработке и изучению МСО этанерцепта, ритуксимаба, инфликсимаба, адалимумаба, бевацизумаба, трастузумаба¹⁶ и цетуксимаба¹⁷ отмечается, что применение в соответствующих биологических тестах препаратов-кандидатов в МСО, в отличие от внутренних СО производителей, способствовало гармонизации оценки биологической активности между лабораториями даже при использовании нескольких методик, основанных на разных принципах [25, 28, 32–34].

Международный стандартный образец активности этанерцепта

Этанерцепт представляет собой белок слияния, состоящий из двух белков, кодируемых разными генами — рецептора фактора некроза опухоли человека (TNFR2/p75) и Fc-рецептора IgG1 человека [35]. Этанерцепт действует как конкурентный ингибитор фактора некроза опухоли альфа (tumour necrosis factor alpha, TNF-α), предотвращая его связывание с рецепторами клеточной поверхности, тем самым способствуя снижению активности TNF-α. Этанерцепт перспективен при лечении аутоиммунных заболеваний и воспалительных процессов, связанных с повышенным уровнем TNF-α [36].

Истечение срока действия патента на РП этанерцепта (Энбрел®) и интенсивная разработка биоаналогичных препаратов предопределили потребность в МСО для определения их активности. В многоцентровом исследовании с участием 28 лабораторий из 15 стран изучались три препарата-кандидата этанерцепта в качестве

¹³ WHO international standards. NIBSC. https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/who_standards.aspx

¹⁴ Report of a WHO informal consultation on international standards for biotherapeutic products. TRS No 999. WHO; 2016.

¹⁵ https://www.nibsc.org/products/brm_product_catalogue/sub_category_listing.aspx?category=Biotherapeutics&subcategory=Monoclonal+Antibodies

¹⁶ Report on a Collaborative Study for Proposed Candidate 1st International Standard for the biological activities of Trastuzumab (WHO/BS/2020.2401). WHO; 2020.

¹⁷ Report on a collaborative study for Proposed Candidate 1st International Standard for the biological activities of Cetuximab (WHO/BS/2022.2429 Rev). WHO; 2022.

Таблица 3. Доступные международные стандартные образцы ВОЗ для препаратов моноклональных антител
Table 3. Available WHO international standards for mAbs

№	Международные стандарты <i>International standards</i>	Код <i>Code</i>	Год <i>Year</i>
1	Белок слияния рецептора TNF-α и Fc-рецептора 10000 МЕ/ампула <i>TNF-α receptor II Fc fusion protein</i> 10000 IU/ampoule	13/204	2016
2	Ритуксимаб 1000 МЕ/ампула для оценки комплементзависимой цитотоксической активности 1000 МЕ/ампула для оценки антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической активности 1000 МЕ/ампула для оценки клеточносвязывающей активности 1000 МЕ/ампула для оценки апоптотической активности <i>Rituximab</i> 1000 IU/ampoule to assess complement-dependent cytotoxic activity 1000 IU/ampoule to assess antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity 1000 IU/ampoule to assess cell-binding activity 1000 IU/ampoule to assess apoptotic activity	14/210	2017
3	Инфликсимаб 500 МЕ/ампула для оценки нейтрализующей активности TNF-α 500 МЕ/ампула для оценки активности связывания TNF-α <i>Infliximab</i> 500 IU/ampoule to assess tumour necrosis factor-alpha (TNF-α) neutralising activity 500 IU/ampoule to assess TNF-α binding activity	16/170	2019
4	Адалимумаб 500 МЕ/ампула для оценки нейтрализующей активности TNF-α 500 МЕ/ампула для оценки активности связывания TNF-α 500 МЕ/ампула для оценки активности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической активности 500 МЕ/ампула для оценки активности комплементзависимой цитотоксической активности <i>Adalimumab</i> 500 IU/ampoule to assess TNF-α neutralising activity 500 IU/ampoule to assess TNF-α binding activity 500 IU/ampoule to assess complement-dependent cytotoxic activity 500 IU/ampoule to assess antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity	17/236	2019
5	Бевацизумаб 1000 МЕ/ампула для оценки нейтрализующей активности фактора роста эндотелия сосудов 165 1000 МЕ/ампула для оценки активности связывания фактора роста эндотелия сосудов 165 <i>Bevacizumab</i> 1000 IU/ampoule to assess vascular endothelial growth factor 165 (VEGF 165) neutralising activity 1000 IU/ampoule to assess VEGF 165 binding activity	18/210	2020
6	Трастузумаб 1000 МЕ/ампула для оценки активности подавления пролиферации 1000 МЕ/ампула для оценки антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической активности 1000 МЕ/ампула для оценки активности связывания HER2 1000 МЕ/ампула для оценки активности связывания FcγRIIIa 1000 МЕ/ампула для оценки активности антителозависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза <i>Trastuzumab</i> 1000 IU/ampoule to assess inhibition of proliferation (IOP) activity 1000 IU/ampoule to assess antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity 1000 IU/ampoule to assess HER2-binding activity 1000 IU/ampoule to assess FcγRIIIa-binding activity 1000 IU/ampoule to assess antibody-dependent cell-mediated phagocytosis activity	19/108	2021
7	Цетуксимаб 1000 МЕ/ампула для оценки активности подавления пролиферации 1000 МЕ/ампула для оценки активности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксической активности 1000 МЕ/ампула для оценки активности связывания рецептора эпидермального фактора роста EGFR 1000 МЕ/ампула для оценки активности связывания FcγRIIIa(V158) 1000 МЕ/ампула для оценки активности связывания FcγRI <i>Cetuximab</i> 1000 IU/ampoule to assess IOP activity 1000 IU/ampoule to assess antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity 1000 IU/ampoule to assess epidermal growth factor receptor (EGFR) binding activity 1000 IU/ampoule to assess FcγRIIIa(V158) binding activity 1000 IU/ampoule to assess FcγRI binding activity	21/170	2022

Таблица составлена авторами по данным NIBSC¹⁸ / The table is prepared by the authors using NIBSC data¹⁸

¹⁸ https://www.nibsc.org/products/brm_product_catalogue/sub_category_listing.aspx?category=Biotherapeutics&subcategory=Monoclonal+Antibodies

первого МСО. В задачи исследования входило установление единиц измерения биологической активности МСО в биотестах *in vitro* и определение концентраций этанерцепта, необходимых для нейтрализации TNF- α (третий МСО TNF- α , NIBSC код: 12/154). Нейтрализующая активность этанерцепта по отношению к МСО TNF- α оценивалась в различных тестах *in vitro* (цитотоксичность, апоптоз и анализ репортерного гена). Результаты оценки активности и стабильности препаратов-кандидатов А и В показали их сопоставимость. В качестве первого МСО активности этанерцепта выбран кандидат В [32]. В 2016 г. утвержден первый МСО ВОЗ для этанерцепта (NIBSC код: 13/204) с присвоенным значением биологической активности *in vitro* 10000 МЕ на ампулу¹⁹.

Международный стандартный образец активности ритуксимаба

Ритуксимаб — химерное МкАТ, молекула которого содержит переменные фрагменты легких и тяжелых цепей Ig мыши. Ритуксимаб специфически взаимодействует с CD20, экспрессирующимся на пре-В-лимфоцитах и зрелых В-лимфоцитах при В-клеточных неходжкинских лимфомах, и применяется при лечении CD20⁺ В-клеточных лимфопролиферативных злокачественных новообразований, аутоиммунных заболеваний и реакции отторжения трансплантата²⁰. Ритуксимаб оказывает действие, связываясь с CD20⁺ на В-лимфоцитах непосредственно или путем взаимодействия Fc-рецептора с клетками-эффекторами, что приводит к лизису В-клеток за счет реализации механизмов CDC и ADCC [37, 38]. Ритуксимаб включен в перечень основных лекарственных средств ВОЗ²¹.

В многоцентровом международном исследовании с участием 16 лабораторий проводилась оценка трех лиофилизированных образцов (препараты-кандидаты А и В и РП Мабтера®) в качестве первого МСО активности ритуксимаба с использованием собственных валидированных биологических методик и внутренних СО. Основным тестом в исследовании являлся CDC, однако оценивались и другие виды биологической активности ритуксимаба: тест CDC выполнен в 16 лабораториях, тест ADCC — в 11, тест оценки активности связывания — в 5, тест индукции апоптоза — в 1 [21]. Результаты оценки

активности препаратов-кандидатов были сопоставимы несмотря на то, что участвующие лаборатории использовали разные методики. При этом наблюдалась высокая вариабельность результатов, полученных в отдельных лабораториях при применении внутренних СО, что, по-видимому, отражает различия между внутренними СО участников исследования и общее отсутствие гармонизации в подходах к оценке активности. Наличие указанных различий подчеркивает необходимость разработки общедоступного СО, применение которого будет способствовать стандартизации биологических методик, в том числе при аттестации СО производителей, а также обеспечит прослеживаемость результатов оценки активности, выражаемой в МЕ [21].

В 2017 г. утвержден первый МСО ВОЗ ритуксимаба (NIBSC код: 14/210) с присвоенным значением биологической активности на ампулу: 1000 МЕ активности CDC, 1000 МЕ активности ADCC, 1000 МЕ активности связывания и 1000 МЕ апоптотической активности²².

Международный стандартный образец активности инфликсимаба

Инфликсимаб — химерное МкАТ, обладающее высоким аффинитетом к TNF- α , играющим ключевую роль в развитии многих аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, болезнь Крона, язвенный колит и др.). Механизм действия препарата опосредован его связыванием с растворимым и мембранным TNF- α [39]. Инфликсимаб был первым МкАТ против TNF- α , одобренным для применения у человека (РП — Ремикейд®). Учитывая количество лекарственных препаратов инфликсимаба на фармацевтическом рынке, ВОЗ признала необходимость гармонизации подходов к оценке биологической активности данного МкАТ [28].

В международном исследовании с участием 26 лабораторий из 15 стран оценивалась пригодность в качестве МСО активности инфликсимаба двух лиофилизированных препаратов-кандидатов (А и В) с различным составом. Участники исследования определяли биологическую активность кандидатов, используя внутренние СО и валидированные методики *in vitro* (нейтрализация действия TNF- α на чувствительные клетки, ADCC, CDC, активность связывания с TNF- α), в качестве TNF- α применяли третий МСО TNF- α (NIBSC код:

¹⁹ <https://www.nibsc.org/documents/ifu/13-204.pdf>

²⁰ https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/mabthera-epar-scientific-discussion_en.pdf

²¹ The selection and use of essential medicines 2023. Executive Summary of the report of the 24th WHO Expert Committee on Selection and Use of Essential Medicines. WHO; 2023. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/371291/WHO-MHP-HPS-EML-2023.01-eng.pdf?sequence=1>

²² <https://www.nibsc.org/documents/ifu/14-210.pdf>

12/154). Учитывая, что кандидаты являлись образцами биоаналогичного препарата инфликсимаба, состав образца партии РП (Ремикейд®) был изменен аналогично кандидатам и включен в исследование в качестве препарата сравнения (NIBSC код: 16/160) для подтверждения отсутствия различий в характеристиках между субстанцией и лекарственным препаратом после изменения состава и лиофилизации [28]. По результатам исследования кандидат А утвержден в качестве первого МСО ВОЗ для определения биологической активности инфликсимаба (NIBSC код: 16/170) с присвоенным значением на ампулу 500 МЕ для нейтрализующей активности TNF-α и 500 МЕ для активности связывания TNF-α²³.

Международный стандартный образец активности адалимумаба

Адалимумаб — первое в мире полностью человеческое терапевтическое МкАТ IgG1 (РП — Хумира®), которое специфически связывается как с мембраносвязанной, так и с растворимой формами TNF-α, блокируя взаимодействие TNF-α с его рецепторами (TNFR1/p55 и TNFR2/p75), и модулирует активность сигнального каскада, запускаемого TNF-α. Считается, что адалимумаб может оказывать воздействие на различные звенья патогенеза системных иммуноопосредованных заболеваний: при ревматоидном артрите препарат нейтрализует действие растворимого TNF-α, а при воспалительных заболеваниях кишечника, таких как болезнь Крона и язвенный колит, взаимодействие адалимумаба с мембраносвязанной формой TNF-α может вызвать ряд биологических эффектов — изменение уровня молекул адгезии, подавление секреции цитокинов и индукция апоптоза.

Проявление активности адалимумаба может быть обусловлено и Fc-опосредованными механизмами, такими как ADCC и CDC [33, 40]. Следует отметить, что, несмотря на достижение клинического эффекта при применении препарата, имеются опасения по поводу нежелательной иммуногенности и снижения эффективности, которые отмечены для других ингибиторов TNF-α [41].

В многоцентровом международном исследовании с участием 26 лабораторий из 13 стран изучалась пригодность двух лиофилизированных препаратов-кандидатов (образцы А и В) в качестве МСО адалимумаба. Определение активности препаратов-кандидатов и внутренних СО проводилось с применением валидированных методик: теста по оценке нейтрализации

действия TNF-α, используемого при серийном выпуске препаратов, и биотестов для определения других видов активности, опосредованной действием МкАТ. Оценку нейтрализации действия TNF-α изучали с помощью трех методик [28, 32], в том числе по уровню подавления цитотоксического эффекта, индуцированного TNF-α, на клеточных линиях мышинных фибробластов (L929) и фибросаркомы (WEHI-164, WEHI-164 13VAR) [42, 43]. Для определения активности адалимумаба применяли анализ репортерного гена в тесте подавления TNF-стимулированной активации фактора транскрипции NF-κB, оцениваемой путем измерения активности люциферазы или секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы в клетках линии HEK-293, трансфицированной конструкциями репортерного гена. Ингибирование апоптоза, опосредованного TNF-α, оценивали путем изучения активности каспаз в клетках линии U937 [33, 44]. Для оценки Fc-эффекторной функции адалимумаба в исследование были включены тесты CDC и ADCC [33].

По результатам определения активности образца А и оценки стабильности (хранение при повышенных температурах в течение 15 мес.) его пригодность в качестве МСО ВОЗ была подтверждена для определения биологической активности адалимумаба. В 2019 г. утвержден первый МСО ВОЗ (NIBSC код: 17/236) с присвоенным значением 500 МЕ для каждого вида биологической активности (связывание, нейтрализация TNF-α, CDC и ADCC)²⁴.

Международный стандартный образец активности бевацизумаба

Бевацизумаб — гуманизированное МкАТ IgG1κ, Fab-фрагмент которого с высокой аффинностью связывается с растворимым фактором роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), блокируя взаимодействие VEGF с рецептором (VEGFR2) на эндотелиальных клетках и нарушая передачу сигналов, необходимую для индукции ангиогенеза [45, 46]. Препарат, нейтрализуя действие VEGF, снижает неоваскуляризацию опухоли и ингибирует ее рост, а также подавляет патологический ангиогенез и гиперпроницаемость сосудов [33]. Является первым антиангиогенным БтЛП (РП — Авастин®). В настоящее время несколько препаратов бевацизумаба одобрены для клинического применения, многие находятся на поздней стадии клинической разработки.

²³ <https://www.nibsc.org/documents/ifu/16-170.pdf>

²⁴ <https://www.nibsc.org/documents/ifu/17-236.pdf>

В рамках многоцентрового международного исследования оценена пригодность двух препаратов-кандидатов (А и В) в качестве первого МСО ВОЗ активности бевацизумаба. Для тестирования кандидатов участники исследования применяли собственные валидированные методики, оценивающие механизм действия МкАТ, такие как подавление VEGF-стимулированной пролиферации первичных эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и VEGF-индуцированный ответ клеточных линий, чувствительных к VEGF. Клеточная линия HUVEC является моделью для изучения функций VEGF, инициируемых связыванием с VEGFR2 на поверхности клеток, с последующей димеризацией и фосфорилированием рецепторов, активацией сигнальных путей, стимулирующих процесс пролиферации клеток [33, 47, 48]. Показано, что при использовании кандидата А отмечена более низкая вариабельность результатов оценки активности, что позволило заключить, что данный кандидат подходит для использования в качестве МСО для бевацизумаба с присвоенными единицами активности нейтрализации и связывания VEGF. При изучении стабильности кандидата А (в условиях ускоренного старения в течение 11 мес.) не выявлено потери активности, что указывает на то, что кандидат сохраняет достаточный уровень стабильности в течение длительного времени [33]. В 2020 г. кандидат А (NIBSC код: 18/210) утвержден в качестве первого МСО ВОЗ для определения биологической активности бевацизумаба *in vitro* с присвоенными значениями на ампулу: 1000 МЕ для нейтрализующей активности VEGF165 и 1000 МЕ для связывающей активности VEGF165²⁵ [34].

Международный стандартный образец активности трастузумаба

Трастузумаб — гуманизированное МкАТ IgG1κ, которое связывается с рецептором эпидермального фактора роста человека 2 типа (HER2) и предотвращает опосредованную рецептором последующую передачу сигналов, результатом чего является подавление роста

и пролиферации опухолевых клеток [49–51]. Противоопухолевое действие трастузумаба также обусловлено и другими механизмами [52], в том числе подавлением экспрессии HER2, а также эффекторными функциями, опосредованными Fc-рецептором, такими как ADCC, посредством взаимодействия с FcγR на миелоидных клетках, подавление ангиогенеза [52, 53]. Трастузумаб (РП — Herceptin®) применяется для лечения рака молочной железы и желудка с высоким уровнем экспрессии HER2, что значительно повышает уровень частоты ответа и выживаемости на ранней стадии заболеваний²⁶. Трастузумаб включен в перечень основных лекарственных средств ВОЗ²⁷. В настоящее время 5 биоаналогичных препаратов одобрены для медицинского применения, около 30 препаратов находятся в стадии разработки [27].

Биологическую активность трастузумаба при выпуске серий оценивают по его влиянию на пролиферативную активность соответствующих клеток, а тест ADCC и связывание трастузумаба с рецепторами HER2, FcγR и FcRn используются для расширенной характеристики продукта.

В международном совместном исследовании проводилось определение значения активности препарата-кандидата в МСО (NIBSC код: 19/108) с использованием различных методов²⁸ [49]. Образец кандидата подготовлен в соответствии со стандартными процедурами (изменение его состава и лиофилизация)²⁹. Активность препарата-кандидата была протестирована *in vitro* с применением валидированных методик, таких как: оценка подавления пролиферативной активности, ADCC, оценка антителозависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза, клеточного и неклеточного связывания с рецепторами HER2 и FcγRIIIa³⁰. Оценка стабильности кандидата проведена в условиях ускоренного старения при повышенных температурах. Результаты оценки активности и стабильности препарата-кандидата показали, что он подходит для использования в качестве МСО активности трастузумаба³¹. Первый МСО ВОЗ активности трастузумаба (NIBSC код: 19/108) утвержден со

²⁵ <https://www.nibsc.org/documents/ifu/18-210.pdf>

²⁶ https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/herceptin-h-c-278-x-0060-epar-assessment-report-extension_en.pdf/

²⁷ The selection and use of essential medicines 2023. Executive Summary of the report of the 24th WHO Expert Committee on Selection and Use of Essential Medicines. WHO; 2023. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/371291/WHO-MHP-HPS-EML-2023.01-eng.pdf?sequence=1>

²⁸ Report on a Collaborative Study for Proposed Candidate 1st International Standard for the biological activities of Trastuzumab (WHO/BS/2020.2401). WHO; 2020.

²⁹ https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/who_standards.aspx

³⁰ https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/herceptin-h-c-278-x-0060-epar-assessment-report-extension_en.pdf/

³¹ Report on a Collaborative Study for Proposed Candidate 1st International Standard for the biological activities of Trastuzumab (WHO/BS/2020.2401). WHO; 2020.

следующими присвоенными значениями биологической активности *in vitro* на ампулу: 1000 ME активности подавления пролиферации; 1000 ME активности ADCC; 1000 ME активности связывания HER2; 1000 ME активности связывания FcγRIIIa; 1000 ME активности ADCP³².

Международный стандартный образец активности цетуксимаба

Цетуксимаб — химерное МкАТ IgG1, которое связывается с внеклеточным доменом рецептора эпидермального фактора роста человека (epidermal growth factor receptor, EGFR). Цетуксимаб конкурирует с эндогенным эпидермальным фактором роста (EGF) и трансформирующим фактором роста (TGF-α), способствуя подавлению передачи сигнала EGFR и предотвращению пролиферации клеток [54]. Один из механизмов действия цетуксимаба реализуется за счет Fc-эффекторных функций посредством ADCC благодаря взаимодействию с FcγR на миелоидных клетках [55, 56]. Цетуксимаб является одним из первых биотерапевтических МкАТ (РП — Эрбитукс®), одобренных для медицинского применения (лечение колоректальных опухолей и плоскоклеточного рака головы и шеи с гиперэкспрессией EGFR) [57].

В международном многоцентровом исследовании с участием 22 лабораторий из 12 стран пригодность препарата-кандидата цетуксимаба для использования в качестве МСО ВОЗ оценивалась для различных видов биологической активности (подавление пролиферации клеток, связывание EGFR и анализ ADCC). В тестах оценки активности использовали различные линии клеток-мишеней, экспрессирующих EGFR, различные эффекторные клетки, а также применяли неклеточные методики³³. Препарат-кандидат в МСО был подготовлен в соответствии со стандартными процедурами³⁴ из серии препарата Эрбитукс®, произведенной для клинического применения. На основании результатов исследования препарат-кандидат цетуксимаба был признан подходящим для использования в качестве первого МСО ВОЗ для биологической активности цетуксимаба *in vitro* (NIBSC код: 21/170) и утвержден с присвоенным значением на ампулу: 1000 ME активности подавления пролиферации, 1000 ME активности ADCC, 1000 ME активности связывания EGFR, 1000 ME активности связывания FcγRIIIa(V158) и 1000 ME активности связывания FcγRI³⁵.

Заключение

Проведенный анализ результатов разработки международных стандартных образцов для оценки биологической активности ряда препаратов моноклональных антител позволяет заключить, что создание и утверждение первых международных стандартных образцов ВОЗ и их эффективное использование производителями во всем мире будет способствовать не только обеспечению и гарантии качества препаратов моноклональных антител, но и клиническому мониторингу эффективности их применения.

Международные стандартные образцы в роли общедоступных первичных стандартов необходимы в первую очередь для аттестации вторичных стандартных образцов (национальных, внутренних) и могут служить инструментом мониторинга их стабильности. В рамках гармонизации подходов к оценке специфической биологической активности между лабораториями применение международных стандартных образцов при согласовании уровня активности продуктов одного международного непатентованного наименования разных производителей будет способствовать повышению качества и безопасности биоаналогичных препаратов. Важен аспект использования международных стандартных образцов при контроле изменений активности как оригинальных, так и биоаналогичных препаратов при управлении их жизненным циклом.

Таким образом, международные стандартные образцы для определения биологической активности лекарственных препаратов на основе моноклональных антител являются важным дополнением к инструментам, доступным для обеспечения согласованности в оценке эффективности различных версий одного и того же продукта. Это является ключевым моментом при обсуждении взаимозаменяемости биотехнологических лекарственных средств. Создание международных стандартных образцов моноклональных антител может облегчить надзор за качеством препаратов, а также может быть полезным регуляторным органам для гармонизации подходов к оценке активности многочисленных лекарственных препаратов, присутствующих на фармацевтическом рынке.

³² <https://www.nibsc.org/documents/ifu/19-108.pdf>

³³ Report on a collaborative study for Proposed Candidate 1st International Standard for the biological activities of Cetuximab (WHO/BS/2022.2429 Rev). WHO; 2022.

³⁴ https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/who_standards.aspx

³⁵ <https://www.nibsc.org/documents/ifu/21-170.pdf>

Литература/References

1. Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sau-tou V. Physicochemical stability of monoclonal antibodies: a review. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):169–90.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.009>
2. Nupur N, Joshi S, Gulliarne D, Rathore AS. Analytical similarity assessment of biosimilars: global regulatory landscape, recent studies and major advancements in orthogonal platforms. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:832059.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.832059>
3. Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Алпатова НА, Медуницын НВ, Бондарев ВП, Миронов АН и др. Лекарственные препараты моноклональных антител нового поколения (проблемы и перспективы). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2015;(1):21–35.
Avdeeva Zhl, Soldatov AA, Alpatova NA, Medunitsyn NV, Bondarev VP, Mironov AN, et al. Preparations of next generation monoclonal antibodies (issues and prospects). *Biopreparation (Biopharmaceuticals).* 2015;(1):21–35 (In Russ.).
EDN: [UBEKGD](#)
4. Lee CC, Perchiacca JM, Tessier PM. Toward aggregation-resistant antibodies by design. *Trends Biotechnol.* 2013;31(11):612–20.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.07.002>
5. Alhazmi HA, Albratty M. Analytical techniques for the characterization and quantification of monoclonal antibodies. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023;16(2):291.
<https://doi.org/10.3390/ph16020291>
6. Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Мотузова ЕВ, Лысикова СЛ, Солдатов АА и др. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2017;17(1):13–26.
Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Motuzova EV, Lysikova SL, Soldatov AA et al. Assessment of biotechnological products' specific activity. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2017;17(1):13–26 (In Russ.).
EDN: [YHSSGL](#)
7. Mimura Y, Katoh T, Saldova R, O'Flaherty R, Izumi T, Mimura-Kimura Y, et al. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell.* 2018;9(1):47–62.
<https://doi.org/10.1007/s13238-017-0433-3>
8. Dash R, Singh SK, Chirmule N, Rathore AS. Assessment of functional characterization and comparability of biotherapeutics: a review. *AAPS J.* 2021;24(1):15.
<https://doi.org/10.1208/s12248-021-00671-0>
9. Láng JA, Balogh ZC, Nyitrai MF, Juhász C, Gilicze AKB, Iliás A, et al. *In vitro* functional characterization of biosimilar therapeutic antibodies. *Drug Discov Today Technol.* 2020;37:41–50.
<https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2020.11.010>
10. Wang X, An Z, Luo W, Xia N, Zhao Q. Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. *Protein Cell.* 2018;9(1):74–85.
<https://doi.org/10.1007/s13238-017-0447-x>
11. Wild D, ed. *The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques.* 4th ed. Elsevier Science; 2013.
12. Lebakken CS, Riddle SM, Singh U, Frazee WJ, Eliason HC, Gao Y, et al. Development and applications of a broad-coverage, TR-FRET-based kinase binding assay platform. *J Biomol Screen.* 2009;14(8):924–35.
<https://doi.org/10.1177/1087057109339207>
13. Noto A, Ngauv P, Trautmann L. Cell-based flow cytometry assay to measure cytotoxic activity. *J Vis Exp.* 2013;82:e51105.
<https://doi.org/10.3791/51105>
14. Schasfoort RBM. *Handbook of surface plasmon resonance.* 2nd ed. RSC Publishing; 2017.
<https://doi.org/10.1039/9781788010283>
15. Beyer B, Schuster M, Jungbauer A, Lingg N. Microheterogeneity of recombinant antibodies: analytics and functional impact. *Biotechnol J.* 2018;13(1).
<https://doi.org/10.1002/biot.201700476>
16. Rosales C. Fcγ receptor heterogeneity in leukocyte functional responses. *Front Immunol.* 2017;8:280.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00280>
17. Branstetter E, Duff RJ, Kuhns S, Padaki R. Fc glycan sialylation of biotherapeutic monoclonal antibodies has limited impact on antibody-dependent cellular cytotoxicity. *FEBS Open Bio.* 2021;11(11):2943–9.
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.13267>
18. Velasco-Velázquez MA, Salinas-Jazmín N, Hisaki-Itaya E, Cobos-Puc L, Xolalpa W, González G, et al. Extensive preclinical evaluation of an infliximab biosimilar candidate. *Eur J Pharm Sci.* 2017;102:35–45.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.01.038>
19. Eon-Duval A, Broly H, Gleixner R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnol Prog.* 2012;28(3):608–22.
<https://doi.org/10.1002/btpr.1548>

20. Ishii-Watabe A, Kuwabara T. Biosimilarity assessment of biosimilar therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2019;34(1):64–70.
<https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2018.11.004>
21. Prior S, Metcalfe C, Hufton SE, Wadhwa M, Schneider CK, Burns C. Maintaining standards for biosimilar monoclonal antibodies. *Nat Biotechnol.* 2021;39(3):276–280.
<https://doi.org/10.1038/s41587-021-00848-0>
22. Vezér B, Buzás Z, Sebeszta M, Zrubka Z. Authorized manufacturing changes for therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) in European Public Assessment Report (EPAR) documents. *Curr Med Res Opin.* 2016;32(5):829–34.
<https://doi.org/10.1185/03007995.2016.1145579>
23. Acha V, Mestre-Ferrandiz J. Translating European regulatory approval into healthcare uptake for biosimilars: the second translational gap. *Technol Anal Strateg Manag.* 2017;29(3):263–75.
<https://doi.org/10.1080/09537325.2017.1285396>
24. Alsamil AM, Giezen TJ, Egberts TC, Doevendans E, Leufkens HG, Gardarsdottir H. Nature and timing of post-approval manufacturing changes of tumour necrosis factor α inhibitor products: a 20-year follow-up study of originators and biosimilars. *Eur J Pharm Sci.* 2022;175:106227.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106227>
25. Prior S, Hufton SE, Fox B, Dougall T, Rigsby P, Bristow A. International standards for monoclonal antibodies to support pre- and post-marketing product consistency: evaluation of a candidate international standard for the bioactivities of rituximab. *MAbs.* 2018;10(1):129–42.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1386824>
26. Thorpe R, Wadhwa M. Intended use of reference products & WHO international standards/reference reagents in the development of similar biological products (biosimilars). *Biologicals.* 2011;39(5):262–5.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.06.005>
27. Udpa N, Million RP. Monoclonal antibody biosimilars. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(1):13–4.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2015.12>
28. Metcalfe C, Dougall T, Bird C, Rigsby P, Behr-Gross M-E, Wadhwa M. The first World Health Organization International Standard for infliximab products: a step towards maintaining harmonized biological activity. *MAbs.* 2019;11(1):13–25.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1532766>
29. Tebbey PW, Varga A, Naill M, Clewell J, Venema J. Consistency of quality attributes for the glycosylated monoclonal antibody Humira® (adalimumab). *MAbs.* 2015;7(5):805–11.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1073429>
30. Kang HN, Thorpe R, Knezevic I. The regulatory landscape of biosimilars: WHO efforts and progress made from 2009 to 2019. *Biologicals.* 2020;65:1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.02.005>
31. Lamanna WC, Holzmann J, Cohen HP, Guo X, Schweigler M, Stangler T, et al. Maintaining consistent quality and clinical performance of biopharmaceuticals. *Expert Opin Biol Ther.* 2018;18(4):369–79.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1421169>
32. Wadhwa M, Bird Ch, Dilger P, Rigsby P, Jia H, Behr-Gross ME. Establishment of the first WHO International Standard for etanercept, a TNF receptor II Fc fusion protein: Report of an international collaborative study. *J Immunol Methods.* 2017;447:14–22.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.03.007>
33. Wadhwa M, Bird C, Atkinson E, Cludts I, Rigsby P. The first WHO international standard for adalimumab: dual role in bioactivity and therapeutic drug monitoring. *Front Immunol.* 2021;12:636420.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636420>
34. Jia H, Harikumar P, Atkinson E, Rigsby P, Wadhwa M. The first WHO international standard for harmonizing the biological activity of bevacizumab. *Biomolecules.* 2021;11(11):1610.
<https://doi.org/10.3390/biom11111610>
35. Goffe B, Cather JC. Etanercept: an overview. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(2 Suppl):105–11.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.554>
36. Tracey D, Klareskog L, Sasso EN, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008;117(2):244–79.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.10.001>
37. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol.* 2007;44(16):3823–37.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.151>
38. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7359–68.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206939>
39. Salinas-Jazmín N, Medina-Rivero E, Velasco-Velázquez MA. Bioassays for the evaluation of target neutralization and complement-dependent cytotoxicity (CDC) of therapeutic antibodies. *Methods Mol Biol.* 2022;2313:281–94.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1450-1_17
40. Marušič M, Klemenčič A. Adalimumab – general considerations. *J Pharmacol Clin Toxicol.* 2018;6(2):1104–11.
41. Roda G, Jharap B, Neeraj N, Colombel JF. Loss of response to anti-TNFs: definition, epidemiolo-

- gy, and management. *Clin Transl Gastroenterol.* 2016;7(1):e135.
<https://doi.org/10.1038/ctg.2015.63>
42. Meager A, Leung H, Woolley J. Assays for tumour necrosis factor and related cytokines. *J Immunol Methods.* 1989;116(1):1–17.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90306-2)
 43. Khabar KS, Siddiqui S, Armstrong JA. WEHI-13VAR: a stable and sensitive variant of WEHI 164 clone 13 fibrosarcoma for tumor necrosis factor bioassay. *Immunol Lett.* 1995;46(1–2):107–10.
[https://doi.org/10.1016/0165-2478\(95\)00026-2](https://doi.org/10.1016/0165-2478(95)00026-2)
 44. Minafra L, Di Cara G, Albanese NN, Cancemi P. Proteomic differentiation pattern in the U937 cell line. *Leuk Res.* 2011;35(2):226–36.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.07.040>
 45. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(5):391–400.
<https://doi.org/10.1038/nrd1381>
 46. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development. *Cell.* 2019;176(6):1248–64.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>
 47. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody *in vitro*. *Angiogenesis.* 2004;7(4):335–45.
<https://doi.org/10.1007/s10456-004-8272-2>
 48. Ebbers HC, van Meer PJ, Moors EH, Mantel-Teeuwisse AK, Leufkens HG, Schellekens H. Measures of biosimilarity in monoclonal antibodies in oncology: the case of bevacizumab. *Drug Discov Today.* 2013;18(17–18):872–9.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.05.004>
 49. Jefferis R. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(7):356–62.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.04.007>
 50. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianféroni S. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem.* 2013;85(2):715–36.
<https://doi.org/10.1021/ac3032355>
 51. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61(12):4744–9.
 PMID: 11406546
 52. Collins DM, O'Donovan N, McGowan PM, O'Sullivan F, Duffy MJ, Crown J. Trastuzumab induces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in HER-2-non-amplified breast cancer cell lines. *Ann Oncol.* 2012;23(7):1788–95.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdr484>
 53. Menard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene.* 2003;22(42):6570–8.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206779>
 54. Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Tonini G. The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;68(2):93–106.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.07.006>
 55. Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Tamura T, Nishio K. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Sci.* 2007;98(8):1275–80.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00510.x>
 56. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianféroni S. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem.* 2013;85(2):715–36.
<https://doi.org/10.1021/ac3032355>
 57. Yazdi MH, Faramarzi MA, Nikfar S, Abdollahi M. A comprehensive review of clinical trials on EGFR inhibitors such as cetuximab and panitumumab as monotherapy and in combination for treatment of metastatic colorectal cancer. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2015;7(4):134–44.
 PMID: 26605007

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Л.А. Гайдерова** — концепция и дизайн исследования, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; **Н.А. Алпатова** — идея исследования, написание рукописи, формулировка выводов исследования; **С.Л. Лысикова** — обобщение материалов исследования, интерпретация результатов; **М.Л. Байкова** — сбор и систематизация данных литературы; **А.М. Гуськов** — сбор и систематизация данных литературы, оформление таблиц и рисунков; **Д.А. Зубков** — сбор и оформление данных литературы.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **L.A. Gayderova** conceptualised and designed the study, and approved the final version of the manuscript for publication. **N.A. Alpatova** devised the study idea, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **S.L. Lysikova** summarised the materials and interpreted the study results. **M.L. Baykova** collected and collated literature data. **A.M. Guskov** collected and collated literature data, and designed tables and figures. **D.A. Zubkov** collected literature data and formatted the reference list.

Об авторах / Authors

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>
gaiderova@expmed.ru

Алпатова Наталья Александровна, д-р биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6807-508X>
alpatova@expmed.ru

Лысикова Светлана Леонидовна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7864-8972>
lisikova@expmed.ru

Байкова Марина Леонидовна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9889-4038>
baikova@expmed.ru

Гуськов Александр Михайлович
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4523-5316>
guskov@expmed.ru

Зубков Дмитрий Анатольевич
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6970-1732>
zubkov@expmed.ru

Поступила 21.08.2023

После доработки 26.10.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Lidia A. Gayderova, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>
gaiderova@expmed.ru

Natalia A. Alpatova, Dr. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6807-508X>
alpatova@expmed.ru

Svetlana L. Lysikova, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7864-8972>
lisikova@expmed.ru

Marina L. Baykova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9889-4038>
baikova@expmed.ru

Alexander M. Guskov
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4523-5316>
guskov@expmed.ru

Dmitriy A. Zubkov
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6970-1732>
zubkov@expmed.ru

Received 21 August 2023

Revised 26 October 2023

Accepted 24 November 2023

УДК 615.371:616.9:578.823

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-499-512>

Обзорная статья | Review article



Результаты и перспективы вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции в Российской Федерации

А.С. Коровкин^{1,✉}, Г.М. Игнатьев²

¹ 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

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный пер., д. 5а, Москва, 105064, Российская Федерация

✉ Коровкин Алексей Сергеевич; korovkinas@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Ротавирусная инфекция и ее последствия остаются одной из главных причин смертности детей раннего возраста, предотвращаемой иммунизацией ротавирусными вакцинами. В Российской Федерации вакцинация против ротавирусной инфекции не включена в национальный календарь профилактических прививок, однако в ряде регионов страны реализуются региональные программы иммунизации детей.

Цель. Обзор данных литературы, посвященных эффективности и безопасности ротавирусных вакцин в условиях реальной клинической практики в Российской Федерации, а также оценка перспектив развития национальной программы иммунизации детей раннего возраста с использованием имеющихся ротавирусных вакцин и учетом перспективных разработок.

Обсуждение. Анализ данных локальных эпидемиологических исследований спектра возбудителей показал, что ротавирусы, особенно у детей до 3 лет, — наиболее частая причина острых кишечных инфекций. С момента регистрации (2012 г.) в Российской Федерации первой ротавирусной вакцины в системе здравоохранения накоплен опыт применения таких вакцин, вполне достаточный для оценки безопасности и эффективности иммунизации. Обзор данных по многолетнему мониторингу распространенности в России различных генотипов ротавирусов группы А подтвердил, что генотипы возбудителей, входящих в состав доступных ротавирусных вакцин, в целом соответствуют спектру выявляемых в нашей стране на протяжении многих лет генотипов возбудителей. Благоприятный профиль безопасности ротавирусных вакцин подтверждается местными наблюдательными исследованиями. Отмечается выраженная эффективность иммунизации, которая проявляется, при условии высокого охвата профилактическими прививками, в существенном снижении заболеваемости среди привитых детей по сравнению с непривитыми, а в некоторых регионах — вплоть до единичных обращений за медицинской помощью или госпитализаций по поводу острых кишечных инфекций.

Заключение. Представленные в обзоре данные подтверждают необходимость включения вакцинации против ротавирусной инфекции в Национальный календарь профилактических прививок Российской Федерации.

Ключевые слова: ротавирусная инфекция; ротавирусные вакцины; эпидемиология ротавирусной инфекции; молекулярная эпидемиология ротавирусной инфекции; эффективность ротавирусных вакцин; безопасность ротавирусных вакцин; вакцинация; наблюдательные исследования эффективности ротавирусных вакцин; национальный календарь профилактических прививок

Для цитирования: Коровкин А.С., Игнатьев Г.М. Результаты и перспективы вакцинопрофилактики ротавирусной инфекции в Российской Федерации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):499–512. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-499-512>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Г.М. Игнатьев — член редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» (с 2008 г.). А.С. Коровкин заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Results and prospects of rotavirus immunisation in the Russian Federation

Alexey S. Korovkin^{1,✉}, George M. Ignatyev²

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

² I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

✉ Alexey S. Korovkin; korovkinas@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. Rotavirus disease and its consequences remain a leading vaccine-preventable cause of mortality in young children. Russia has not yet included rotavirus immunisation in the national vaccination schedule, but paediatric rotavirus vaccines are provided under several regional immunisation programmes.

Aim. The authors aimed to review literature covering Russian clinical evidence of the safety and effectiveness of rotavirus vaccines and to analyse the prospects for the development of the national immunisation programme for young children using the available rotavirus vaccines and considering promising pipeline ones.

Discussion. Local epidemiological studies on a range of pathogens suggest that rotaviruses are the most common cause of acute intestinal infections, especially in children under 3 years of age. Since Russia's first rotavirus vaccine approval in 2012, the healthcare system has acquired sufficient experience with rotavirus vaccines to evaluate the safety and effectiveness of rotavirus immunisation. Long-term monitoring of the rotavirus A genotypes circulating in the country shows that currently available rotavirus vaccines cover the majority of identified rotavirus isolates. Local observational studies confirm the favourable safety profile of rotavirus vaccines and demonstrate notable effectiveness of vaccination. In the regions with high immunisation coverage, the overall morbidity has declined dramatically in vaccinated children compared to unvaccinated children; some of these regions have reported only individual hospital visits or admissions for acute intestinal infections.

Conclusion. This review demonstrates that rotavirus immunisation should be included in the Russian National Immunisation Schedule.

Keywords: rotavirus infection; rotavirus vaccines; rotavirus disease epidemiology; rotavirus disease molecular epidemiology; rotavirus vaccine effectiveness; rotavirus vaccine safety; vaccination; observational studies of rotavirus vaccine effectiveness; national immunisation schedule

For citation: Korovkin A.S., Ignatyev G.M. Results and prospects of rotavirus immunisation in the Russian Federation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):499–512. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-499-512>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. G.M. Ignatyev has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2008. A.S. Korovkin declares having no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Ротавирусная инфекция (РВИ) остается одной из ведущих причин детской смертности в мире (особенно в развивающихся странах) среди прочих причин, потенциально предотвращаемых вакцинацией [1]. Впервые вакцины для специфической иммунопрофилактики РВИ стали доступны в 2006 г. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) до начала массовой вакцинации от последствий РВИ по всему миру ежегодно погибали свыше 500 тыс. детей, а общее число госпитализаций превышало 200 млн¹ [2, 3]. По данным 2013 г. наивысшая доля смертности (около 49% от всех летальных исходов РВИ у детей) приходится на четыре государства: Республику Индия, Исламскую Республику Пакистан, Федеративную Республику Нигерия, Демократическую Республику Конго, а до 65% всех летальных исходов от последствий РВИ на десять стран: Республику Индия, Федеративную Республику Нигерия, Республику Пакистан, Демократическую Республику Конго, Республику Ангола, Федеративную Демократическую Республику Эфиопия, Переходное Исламское Государство Афганистан, Республику Чад, Республику Нигер и Республику Кения [3].

Цель работы – обзор данных литературы, посвященных эффективности и безопасности ротавирусных вакцин в условиях реальной клинической практики в Российской Федерации, а также оценка перспектив развития национальной программы иммунизации детей раннего возраста с использованием имеющихся

ротавирусных вакцин и учетом перспективных разработок.

Эпидемиологические особенности ротавирусной инфекции в Российской Федерации

Согласно данным Роспотребнадзора в нашей стране доля РВИ составляет до 49% от всех случаев острых кишечных инфекций (ОКИ) установленной этиологии, при этом наиболее высокие показатели заболеваемости (1063 случая на 100 тыс. населения)² регистрируют среди детей в возрасте 1–2 лет. Следовательно, именно в этом возрастном периоде происходит типичная встреча с возбудителем и манифестация инфекционного заболевания. Для сравнения, в развивающихся странах свыше 60% первых эпизодов РВИ отмечены у детей в возрасте до 1 года [4]. Актуальность РВИ (высокая частота встречаемости возбудителя среди детей раннего возраста, госпитализированных в разных регионах России с диагнозом «острая кишечная инфекция») подтверждена также рядом наблюдательных российских исследований, выполненных по схожей методике (табл. 1).

Исследовательская группа из Казани провела анализ 6733 медицинских карт пациентов, госпитализированных в ГАУЗ «Республиканская клиническая инфекционная больница имени профессора А.Ф. Агафонова» с диагнозом «Острая кишечная инфекция» за период с января 2018 по март 2019 г. Доля детей первых 3 лет жизни составила 49% (3300 из 6733), в том числе дети до 1 года – 14,8% (993 из 6733 детей). Возбудители ОКИ были идентифицированы

Таблица 1. Доля ротавирусов среди возбудителей острой кишечной инфекции у госпитализированных детей раннего возраста по регионам

Table 1. Percentage of rotaviruses in young children hospitalised with AII by region

Параметры <i>Parameters</i>	Казань (2018–2019 гг.) <i>Kazan (2018–2019)</i>	Санкт-Петербург (2009–2013 гг.) <i>Saint Petersburg (2009–2013)</i>	Москва (2015–2017 гг.) <i>Moscow (2015–2017)</i>
Число наблюдений <i>Number of observations</i>	6733	5535	8459
Доля этиологической расшифровки ОКИ, % <i>All aetiology identified, %</i>	41,9	58,6	28,6
Доля ротавирусов среди возбудителей ОКИ у детей раннего возраста, % <i>Percentage of rotaviruses in young children with AII, %</i>	49,9	56	32,5

Таблица составлена авторами по данным источников [5–7] / The table is prepared by the authors using data from references [5–7]

Примечание. ОКИ – острые кишечные инфекции. Ранний возраст – возрастная группа от 1 года до 3 лет. Методология обработки данных – ретроспективный анализ. Данные по Москве указаны для возрастного диапазона от 1 мес. до 18 лет.

Note. AII, acute intestinal infections. Young children are children of 1 to 3 years of age. Method: retrospective analysis. The data provided for Moscow include children from 1 month to 18 years.

¹ Rotavirus vaccines. WHO position paper – July 2021. Wkly Epidemiol Rec. 2021;96(28):301–19.

² О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2023.

в 41,9% (2819 из 6733) случаев, ротавирусные гастроэнтериты (РВГЭ) — у 32,4% (2180 из 6733) обследованных; у детей раннего возраста ротавирусы — в 49,9% случаев. У детей до 1 года этиология диареи принципиально не отличалась от таковой у детей 2–3 лет — на долю ротавирусов у пациентов 1-го года жизни пришлось 50,4% (500 из 993) наблюдений. Выявлена четко выраженная зимне-весенняя сезонность вирусной диареи, при этом максимальный подъем заболеваемости РВГЭ отмечен в апреле [5].

Сотрудники ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России (Санкт-Петербург) провели ретроспективный анализ историй болезни 5535 детей, госпитализированных в учреждение в 2009–2013 гг. с острой инфекционной диареей. Удалось установить этиологию возбудителя у 3241 (58,6%) ребенка, при этом доля случаев диареи вирусного генеза среди расшифрованных ОКИ составила 77,35%. Продemonстрировано, что вирусными диареями страдают преимущественно дети до 3 лет (45% в ретроспективном анализе медицинских карт). При этом ротавирус — первый по значимости патоген в возрастной группе детей до 6 лет: выявлен в 56% от всех этиологически расшифрованных эпизодов ОКИ [6].

Исследователями из ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России и ГБУЗ «Детской городской клинической больницы № 9 им. Г.Н. Сперанского Департамента здравоохранения города Москвы» (ДГКБ № 9) проведен ретроспективный анализ этиологической структуры и клинических проявлений ОКИ у 8459 детей, госпитализированных в инфекционное отделение № 3 ДГКБ № 9 за период 2015–2017 гг., на основе статистических отчетов и историй болезни 1339 детей в возрасте от 1 мес. до 18 лет. Этиология ОКИ установлена у 2417 (28,6%) из 8459 госпитализированных детей. В этиологической структуре вирусных диарей и всех ОКИ ротавирусы занимали первое место (61,92%). При анализе этиологии ОКИ в зависимости от возраста больных установлено, что вирусы (в основном ротавирусы) наиболее часто выявляли у детей от 1 до 3 лет (32,5%), а также от 3 до 7 лет (28,0%); частота выявления существенно снижалась у детей более старших возрастных групп [7].

Молекулярно-эпидемиологическая характеристика возбудителя

Другим важным вопросом эпидемиологии инфекционных заболеваний остается молекулярная эпидемиология ротавирусной инфекции

и географические особенности распространения РВИ. Генотипы ротавирусов группы А обозначаются при помощи биномиальной номенклатуры в зависимости от варианта генов, кодирующих следующие поверхностные капсидные белки: VP4 (Р-белок) и VP7 (структурный гликопротеин, или G-белок). Считается, что оба этих белка обладают антигенными свойствами и отвечают за индукцию иммунного ответа при естественной инфекции или вакцинации. На сегодняшний день описано свыше 42 различных комбинаций G- и Р-белков [8], среди которых наиболее часто встречаются G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] и G9P[8] [8–10]. При этом собрано достаточно данных для подтверждения неравномерного распределения генотипов ротавирусов в разных частях земного шара. Так, систематический обзор работ, посвященных распространенности генотипов изолятов ротавирусов группы А в разных регионах мира в период с 1996 по 2007 г., охвативший описание 110 тыс. проб из 100 стран, продемонстрировал, что пять наиболее распространенных вариантов G-белка относились к генотипам G1, G2, G3, G4 и G9, составляющим суммарно примерно 88% от всех выявленных штаммов [11]. При этом были выявлены географические и временные особенности распространения генотипов. Например, генотип G1 был наиболее распространенным, однако с 2000 г. частота его встречаемости существенно снизилась, в то время как для генотипов G3, G9 и G12 — выросла. Примечателен тот факт, что в регионах с низким уровнем смертности от РВИ наиболее часто выявляли штаммы с генотипами G1 и G9 и, напротив, в регионах с высоким уровнем смертности (Африка и др.) — с генотипом G8. Другими исследователями в целом в странах Африки отмечено большее разнообразие выявляемых генотипов ротавирусов [12, 13], что во многом объясняет значимо меньшую эффективность ротавирусных вакцин в предотвращении РВИ (в том числе тяжелых форм), госпитализации и смертности [14].

По данным Референс-центра по мониторингу возбудителей кишечных инфекций (РЦКИ) на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в 2022 г. на территории Российской Федерации наиболее часто выявляли генотипы ротавирусных изолятов G3P[8], G9P[8], G1P[8], G4P[8], G2P[4] и G12P[8]; при этом в результате многолетних наблюдений впервые продемонстрировано выраженное снижение частоты встречаемости генотипа G9P[8] и рост выявления ротавирусных изолятов, относящихся

к генотипу G3P[8]³. В 2005–2007 гг. по итогам изучения спектра возбудителей вирусных диарей у 3208 госпитализированных детей в восьми регионах России сделан вывод, что независимо от географического положения региона из года в год может существенно меняться соотношение выявляемых генотипов ротавирусов. При этом их спектр остается неизменным: так, у 43,6% детей в возрасте до 5 лет, госпитализированных по причине вирусной диареи, в фекалиях были выявлены ротавирусы группы А, преимущественно генотипов G1P[8], G2P[4], G3P[8] и G4P[8] [15].

Вакцины для профилактики ротавирусной инфекции

Отсутствие специфической терапии и чрезвычайная контагиозность и распространенность РВИ обуславливают необходимость включения ротавирусных вакцин в национальные программы иммунизации всех стран мира, независимо от уровня их экономического и социального развития⁴. Глобальный охват профилактическими прививками против РВИ достиг к 2020 г. 49% от всей когорты новорожденных, подлежащих иммунизации. При этом по состоянию на июнь 2023 г. 117 стран мира отчитались перед ВОЗ о включении ротавирусных вакцин в национальные программы иммунизации для всего детского населения, четыре государства – о субнациональном уровне внедрения ротавирусных вакцин, и три страны – о программе вакцинации против РВИ детей из групп риска⁵.

На сегодняшний день ВОЗ преквалифицированы четыре ротавирусные вакцины: RotaTaq® (Merck Sharp & Dohme Corp., США), Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Бельгия), Rotasiil® (Serum Institute of India, Индия), Rotavac® (Bharat Biotech International Ltd, Индия). В различных регионах мира существуют и другие ротавирусные вакцины (табл. 2). Главная общая особенность всех доступных в мире вакцин против РВИ – они представляют собой живые препараты на основе

аттенуированных или реассортантных штаммов ротавирусов группы А для орального введения. В нашей стране зарегистрированы и одобрены для медицинского применения только две вакцины для профилактики ротавирусной инфекции, пентавалентные, живые: РотаТек® (ООО «МСД Фармасьютикалс», Россия) и Рота-В-Эйд® (ООО «ФАРМ ЭЙД ЛТД», Россия) – во втором случае это российское торговое наименование препарата Rotasiil®. Оба препарата представляют собой пентавалентные вакцины на основе человеческих ротавирусов группы А и реассортантных штаммов бычьего ротавируса G6P[5], в которых оригинальные гены, кодирующие белок VP7, заменены на гены человеческих ротавирусов. Обе вакцины в России считаются взаимозаменяемыми.

В отношении оральных ротавирусных вакцин существуют опасения по поводу их безопасности, связанные с развитием после вакцинации такого специфического серьезного нежелательного явления (НЯ), как инвагинация кишечника (смешанный вариант кишечной непроходимости, обусловленный изоперистальтическим внедрением проксимального участка кишки в дистальный)⁶. Впервые инвагинация тонкого кишечника как НЯ после ротавирусной вакцинации были описаны в 1998 г. после регистрации в США вакцины RotaShield (Wyeth Laboratories, Inc., США)⁷ [19]. С позиции российских детских хирургов основная причина развития кишечных инвагинаций как нарушения координации кишечной моторики – изменение режима питания, введение прикорма, совершенно не соответствующей (по объему и содержанию) пищи возрасту ребенка до 1 года⁸. Тем не менее инвагинация кишечника остается НЯ особого интереса при изучении ротавирусных вакцин – сборе сведений об опыте применения в реальной клинической практике, фармаконадзоре и проведении регистрационных и пострегистрационных исследований IV фазы с активным наблюдением⁹.

³ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2023.

⁴ Meeting of the immunization Strategic Advisory Group of Experts, April 2009 – conclusions and recommendations. Wkly Epidemiol Rec. 2009;84(23):220–36.

⁵ International Vaccines Access Center (IVAC). Map of RV introduction status. <https://view-hub.org/map>

⁶ Городков СЮ, Морозов ДА, Поддубный ИВ, Розин ВМ. Инвагинация кишечника у детей. Клинические рекомендации. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2016.

⁷ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1999;48(43):1007.

⁸ Городков СЮ, Морозов ДА, Поддубный ИВ, Розин ВМ. Инвагинация кишечника у детей. Клинические рекомендации. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2016.

⁹ Rotavirus vaccines. WHO position paper – July 2021. Wkly Epidemiol Rec. 2021;96(28):301–19.

Таблица 2. Характеристика ротавирусных вакцин, представленных в мире

Table 2. Characteristics of rotavirus vaccines available worldwide

Торговое наименование <i>Trade name</i>	Производитель и страна происхождения <i>Manufacturer and country of origin</i>	Тип вакцины <i>Vaccine type</i>	Штаммовый состав <i>Strain composition</i>	Схема иммунизации <i>Immunisation schedule</i>
RotaTeq®	Merck Sharp & Dohme Corp. (США) <i>(USA)</i>	Живая ре-ассортантная <i>Live reassortant</i>	Реассортантные штаммы G1P[5], G2P[5], G3P[5], G4P[5], G6P[8] <i>Reassortant strains G1P[5], G2P[5], G3P[5], G4P[5], G6P[8]</i>	Перорально, трехкратно, 1-я доза — в возрасте 6–12 нед., интервал — 4–10 нед., курс вакцинации должен быть завершен к возрасту 32 нед. <i>Orally, three times, with the first dose at 6–12 weeks of age and further doses 4–10 weeks apart, to be completed by 32 weeks of age</i>
Rotarix®	GlaxoSmithKline Biologicals S.A. (Бельгия) <i>(Belgium)</i>	Живая аттенуированная <i>Live attenuated</i>	Аттенуированный человеческий штамм G1P[8] <i>Attenuated human strain G1P[8]</i>	Перорально, двукратно, 1-я доза — с возраста 6 нед., интервал — от 4 нед., курс вакцинации должен быть завершен к возрасту 24 нед. <i>Orally, two times, with the first dose at 6 weeks of age and further doses at least 4 weeks apart, to be completed by 24 weeks of age</i>
Rotasiil® (Рота-В-Эйд® в России) <i>(Rota-V-Aid® in Russia)</i>	Serum Institute of India (Индия) <i>(India)</i>	Живая ре-ассортантная <i>Live reassortant</i>	Реассортантные штаммы G1P[5], G2P[5], G3P[5], G4P[5], G9P[5] <i>Reassortant strains G1P[5], G2P[5], G3P[5], G4P[5], G9P[5]</i>	Перорально, трехкратно, 1-я доза — с возраста 6 нед., интервал — от 4 нед., курс вакцинации должен быть завершен к возрасту 32 нед. <i>Orally, three times, with the first dose at 6 weeks of age and further doses at least 4 weeks apart, to be completed until 32 weeks of age</i>
Rotavac®	Bharat Biotech International Ltd (Индия) <i>(India)</i>	Живая аттенуированная <i>Live attenuated</i>	Аттенуированный человеческий штамм G9P[11] <i>Attenuated human strain G9P[11]</i>	Перорально, трехкратно, 1-я доза — с 6 нед., интервал — 4 нед., рекомендовано одновременное введение с АКДС-вакциной <i>Orally, three times, with the first dose at 6 weeks of age and further doses 4 weeks apart (preferably, at the time of diphtheria–pertussis–tetanus immunisation)</i>
Rotavin-M1	Polyvac (Вьетнам) <i>(Vietnam)</i>	Живая аттенуированная <i>Live attenuated</i>	Аттенуированный человеческий штамм G1P[8] <i>Attenuated human strain G1P[8]</i>	Перорально, двукратно с возраста 6 нед., интервал 60 сут, курс вакцинации должен быть завершен к возрасту 24 нед. <i>Orally, two times, with the first dose at 6 weeks of age and further doses 60 days apart, to be completed by 24 weeks of age</i>
Ланьжоуская овечья ротавирусная вакцина <i>Lanzhou lamb rotavirus vaccine</i>	Lanzhou Institute of Biological Products Co. Ltd (Китай) <i>(China)</i>	Живая аттенуированная (джернеровская) <i>Live attenuated (Jenner type)</i>	Аттенуированный овечий штамм G10P[15] <i>Attenuated lamb strain G10P[15]</i>	Перорально трехкратно, с возраста 2 до 35 мес., предпочтительно вводить 3 дозы до возраста 1 год [18] <i>Orally, three times, from 2 to 35 months, preferably to be completed by 1 year of age [18]</i>

Таблица составлена авторами по данным источников [16, 17] / The table is prepared by the authors using references [16, 17]

Российские разработки инактивированных вакцин

В Российской Федерации разрабатывается ряд новых ротавирусных вакцин, не только отличающихся по штаммовому составу, но и имеющих принципиально иные конструктивные

решения, например инактивированные препараты. Так, экспериментальная вакцина, разработанная в ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, содержит

рекомбинантный белок FLiCVP6VP8 с иммуногенными эпитопами поверхностных белков ротавируса VP6, VP8 и белка FLiC-компонента флагеллы *Salmonella typhimurium*, соединенными гибкими мостиками. Препарат содержит также гидроксид алюминия в качестве адъюванта. Рекомбинантный белок получен при помощи технологии рекомбинантной ДНК с использованием культуры клеток *Escherichia coli* [20].

Специалистами ФБУН «РостовНИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора предприняты попытки получения конъюгированных вакцин для парентерального и энтерального введения, в результате получены конъюгаты цельновирионного препарата ротавируса человека со столбнячным анатоксином, а также с хитозаном [21, 22].

Исследовательской группой из ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России разработана технология бакуловирусной экспрессии белков различных инфекционных возбудителей с последующей сборкой полученных антигенов в вирусоподобные частицы, а также способ получения ротавирусных антигенов. Для включения в состав инактивированной вакцины на основе вирусоподобных частиц выбраны (по поверхностным белкам VP4, VP7, VP2 и VP6) шесть наиболее распространенных в России генотипов ротавирусов группы А – G1, G2, G4, G9, P4, P8, а также внутренние структурные вирусные белки VP2 и VP6. Полученный экспериментальный препарат содержит белки VP4 и VP7 шести генотипов, наиболее часто выявляемых на территории России, и может быть использован для создания перспективных вакцин для профилактики РВИ [23].

Эффективность и безопасность иммунизации детей против ротавирусной инфекции в Российской Федерации в реальной клинической практике

В нашей стране вакцинация против РВИ не включена в национальный календарь профилактических прививок, однако с 2014 г. входит в Приложение № 2 к приказу Минздрава России от 20.12.2021 г. № 1122н¹⁰. Начиная с 2012 г. (регистрация первой ротавирусной вакцины в Российской Федерации) ряд регионов применяет вакцину для иммунизации младенцев

в рамках реализации региональных календарей прививок или целевых программ вакцинации. По итогам 2022 г. наибольшие показатели охвата были достигнуты в Ямало-Ненецком автономном округе (65%), Республике Бурятия (39%), Сахалинской области (37%), Москве (34%)¹¹. Однако данные уровни охвата иммунизацией против РВИ недостаточны для оценки влияния на эпидемический процесс. При этом специалисты Роспотребнадзора всегда отмечали, что критерием адекватной вакцинации является охват не менее 80% целевой когорты населения при доле лиц с неполным курсом вакцинации не более 10%. Достоверные популяционные эффекты проявляются при охвате иммунизацией против РВИ не менее 60%¹².

Российскими авторами опубликованы результаты применения ротавирусных вакцин для иммунизации детей раннего возраста в рутинной клинической практике. Исследования проводили в следующих регионах: Свердловская область, Красноярский край, Московская область (Подольск), Ханты-Мансийский автономный округ – Югра (ХМАО – Югра), Тюмень, Краснодар и Хабаровск. Период проведения исследований охватывает 2014–2021 гг. (в основном 2014–2019 гг.). Более поздние опубликованные работы найти не удалось.

Тюмень [24]

В 2014 г. в ходе реализации региональной программы иммунопрофилактики РВИ в Тюмени были привиты 1 тыс. детей. При выполнении проспективной оценки безопасности зарегистрировано несколько эпизодов НЯ после иммунизации, соответствующих инструкции по медицинскому применению вакцины: в пяти случаях отмечено сочетание повышения температуры до 37,5 °С и однократного жидкого стула в течение 2 сут после введения 1-й дозы вакцины; в одном случае зарегистрирован эпизод водянистой диареи до 5 раз в сут, самостоятельно разрешившейся в течение 3 сут. Эффективность вакцинирования оценивали по частоте развития ОКИ, РВГЭ и числу госпитализаций. У вакцинированных детей в течение 6 мес. наблюдения не зарегистрировано эпизодов РВГЭ. Сравнительный анализ показателей заболеваемости РВГЭ и ОКИ у детей 1–2 лет жизни в детских поликлиниках показал нисходящий тренд в период сезонного

¹⁰ Приказ Минздрава России от 20.12.2021 № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок».

¹¹ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2023.

¹² О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2022.

роста числа инфекционных заболеваний в группе привитых детей. Так, показатель госпитализаций по поводу любых ОКИ были в 4 раза ниже в группе вакцинированных против РВИ по сравнению с непривитыми (84 и 21 соответственно). Среди госпитализированных по поводу РВИ детей 1–2 лет был выявлен всего лишь один ребенок, получивший ротавирусную вакцину, и 46 непривитых.

Свердловская область (Асбест, Верхний Тагил, Красноуральск, Невьянск) [25]

В 2015 г. привиты 772 ребенка в гг. Асбест, Верхний Тагил, Красноуральск, Невьянск. Проведено ретроспективное исследование со сбором сведений через анкетирование медицинских работников и анализ показателей заболеваемости по формам статистического учета инфекционной и паразитарной заболеваемости Роспотребнадзора. Результаты оценки безопасности применения вакцин у детей раннего возраста:

- 2,2% случаев — изменения в самочувствии и поведении после вакцинации, при этом частота таких проявлений уменьшалась с каждым последующим введением вакцины;
 - 1,9% — НЯ после введения 1-й дозы вакцины проявлялись чаще, а после 2 и 3-й доз реже (1,2 и 0,5% соответственно);
 - 6,7% — НЯ со стороны желудочно-кишечного тракта (вздутие живота, кратковременная диарея);
 - 4,2% — рвота, снижение аппетита, беспокойство и повышенная раздражительность.
- Частота развития НЯ:
- диарея и вздутие живота после вакцинации — 0,1 случая на 100 привитых детей;
 - рвота, снижение аппетита, беспокойство и повышенная раздражительность — 0,2 случая на 100 привитых.

Большинство привитых детей перенесли вакцинацию без развития НЯ после иммунизации любой из доз в схеме вакцинации. У привитых детей эпизодов ОКИ, в том числе ротавирусной этиологии, в течение 1 года после прививки не зарегистрировано.

В результате проведения программы вакцинопрофилактики в Свердловской области показатель заболеваемости РВИ среди детей в возрасте 1–2 лет снизился в 1,1–2,4 раза. Наиболее убедительные данные об эпидемиологической эффективности проведенной иммунизации детей 1-го года жизни против РВИ получены при оценке накопительного процента инфицирования (НПИ) в течение 1 года после вакцинации на территории Свердловской

области: Невьянск — НПИ снизился в 5,6 раза; Красноуральск — в 3,0 раза; Асбест — в 1,6 раза; Верхний Тагил — не зарегистрировано ни одного случая заболевания РВИ.

Красноярский край (Ачинск) [26]

С июля 2015 по июнь 2016 г. были привиты 1267 детей, что соответствовало 90% охвату всей когорты новорожденных в Ачинске за исследуемый период. В течение 7 сут после вакцинации частота НЯ составила 6,4% и распределилась следующим образом (в порядке уменьшения частоты встречаемости): назофарингит — 3,0%; повышение температуры выше 38 °С — 1,7%; беспокойство — 0,7%; диарея и инфекции верхних дыхательных путей — 0,3%; вялость — 0,2%; бронхоспазм — 0,1%. При введении только ротавирусной вакцины ни в одном из случаев наблюдения НЯ не отмечены. Авторы предполагают, что зарегистрированные после совместной иммунизации НЯ могли развиваться вследствие введения других вакцин, используемых в рамках национального календаря профилактических прививок. При оценке эффективности программы иммунизации выявлено, что число госпитализаций детей по поводу ОКИ любой этиологии снизилось в 2016 г. по сравнению с 2014 г. (довакцинальный период):

- в возрасте от 0 до 36 мес. — на 24,7% (277 и 395 госпитализированных соответственно);
- в том числе возрасте от 0 до 12 мес. — на 39,1% (50 и 81 госпитализированный соответственно).

При этом число госпитализаций среди детей, не подлежащих вакцинации, в возрасте от 12 до 36 мес. снизилось на 26,5%: с 175 (2014 г.) до 127 детей (2016 г.).

Московская область (Подольск) [27]

Исследование проводили в период с 2014 по 2018 г., общий охват вакцинацией составил 43%, всего было использовано 23 875 доз ротавирусной пентавалентной вакцины. Охват вакцинацией детей младшей возрастной группы превышал 60%. Во всех случаях вакцинации НЯ после иммунизации не зарегистрированы.

В 2013–2018 гг. с диагнозом «Инвагинация кишечника» были госпитализированы 29 детей в возрасте до 14 лет. Окончательный диагноз был подтвержден у 21 (72,4%) ребенка. Подозрения на инвагинацию кишечника у детей младшей возрастной группы возникли в 15 (51,7%) из 29 случаев. Госпитализированные в хирургический стационар 15 детей с подозрением на непроходимость кишечника были в возрасте 5–7 и 11–12 мес. Среди всех

госпитализированных детей в период реализации мероприятий по вакцинопрофилактике не было привитых ротавирусной вакциной. Полученные данные свидетельствуют о вероятности развития инвагинации кишечника у детей 1-го года жизни по причинам, не связанным с введением ротавирусной вакцины.

Эффективность программы иммунизации проявилась в снижении количества госпитализаций детей в возрасте до 14 лет с диагнозом ОКИ неуточненной этиологии с 71,6% (2014 г.) до 51,8% (2018 г.). Эффективность иммунизации оценили также по снижению числа госпитализаций детей: на 1-м году жизни — в 3,2 раза; на 2–3-м годах жизни — в 3,4; в возрасте 3–6 лет — в 2,2. Доля пациентов с диагнозом ОКИ в структуре госпитализированных также снижалась: среди детей 1-го года жизни — с 15,8 (2014 г.) до 12,5% (2018 г.); в возрасте 2–3 лет — с 43,8 до 36,3% соответственно. Отмечено небольшое увеличение доли пациентов 7–14 лет с диагнозом ОКИ неуточненной этиологии с 7,70 (2014 г.) до 11,2% (2018 г.), но на фоне сокращения общего числа госпитализированных. Выявлено снижение заболеваемости РВГЭ как в целевой группе, так и в других, не подлежащих вакцинации, то есть было подтверждено формирование популяционного эффекта вакцинации.

ХМАО – Югра (Пыть-Ях) [28]

Проведен ретроспективный анализ историй развития детей за 2017–2018 гг., всего в исследование были включены 583 ребенка.

В течение поствакцинального периода у одного ребенка отмечалась субфебрильная температура, поствакцинальных осложнений и НЯ не зафиксировано. Показано, что в результате проведенных противоэпидемических мероприятий шансы для детей 0–17 лет заболеть РВИ в 2017–2018 гг. были в 1,68 раза ниже по сравнению с 2015–2016 гг. Отношение шансов (ОШ) 0,59; 95% доверительный интервал (ДИ₉₅) 0,49–0,71 ($p < 0,001$). За 2017–2018 гг. также снизилась заболеваемость РВИ в группе детей до 1 года: ОШ 0,57; ДИ₉₅ 0,35–0,95 ($p = 0,037$). Снижение отмечено также среди 1–2-летних: ОШ 0,62; ДИ₉₅ 0,45–0,84 ($p = 0,002$).

За период 2016–2018 гг. в Пыть-Яхе заболеваемость всего населения ОКИ и РВИ снизилась на 53% (ОШ 0,47; ДИ₉₅ 0,41–0,53, $p < 0,001$) и 72% соответственно (ОШ 0,28; ДИ₉₅ 0,21–0,36, $p < 0,001$).

ХМАО – Югра (Ханты-Мансийск, Сургут, Нижневартовск, Нягань) [29]

В рамках исследования был выполнен ретроспективный анализ историй болезни детей

($n=110$), получавших лечение от РВИ в детском инфекционном отделении БУ «Окружная клиническая больница» (Ханты-Мансийск) в 2016 г. Используются также данные отчетов детских поликлиник о течении поствакцинального периода и заболеваемости детей, получивших вакцинацию против РВИ ($n=1300$): в Ханты-Мансийске ($n=700$), Сургуте, Нижневартовске и Нягани поровну ($n=200$). Доля вакцинированных от общего числа детей 1-го года жизни составила в Нижневартовске 4,9%, в Сургуте — 5,8%, в Нягани — 21,7%, в Ханты-Мансийске — 43,7%.

Анализ течения поствакцинального периода у детей, получивших ротавирусную вакцину, показал, что возникающие ожидаемые НЯ после иммунизации (повышение температуры, беспокойство, нарушение стула и др.) при совместном применении ротавирусной вакцины с другими из национального календаря профилактических прививок (АКДС, вакцины против полиомиелита, пневмококковой или гемофильной инфекции) были зарегистрированы у 11,9% детей, что сопоставимо с долей НЯ (11,4%) после иммунизации другими вакцинами из Календаря. В случае введения только ротавирусной вакцины НЯ после иммунизации развивались лишь в 1,5% случаев; поствакцинальных осложнений не зарегистрировано.

Эффективность вакцин оценивали по динамике показателя заболеваемости РВИ для детей. В городах Ханты-Мансийск, Нягань, Нижневартовск отмечено снижение заболеваемости РВИ, возможно, связанное с проведенной вакцинацией. Отсутствует снижение заболеваемости РВИ в Сургуте. Отчасти это можно объяснить большой долей детей среди населения и малым числом привитых детей. В Ханты-Мансийске был проведен анализ заболеваемости ОКИ (в том числе РВИ) у 214 привитых детей в течение 12 мес. после вакцинации, из них 9 (4,2%) имели случаи острой формы заболевания со следующими жалобами: жидкий стул — 9 (100%), рвота — 4 (44,4%), повышение температуры до 38,9 °C — 3 (33,3%), сыпь — 1 (11,1%) ребенок. Обследованы 6 (66,7%) детей, бактериологические анализы — отрицательные, в одном случае выделен антиген норовируса; из вакцинированных ни один ребенок не заболел среднетяжелым и тяжелым гастроэнтеритом, не было случаев госпитализации в связи с ОКИ, не зарегистрирован ни один случай РВИ. Результаты исследования продемонстрировали безопасность и хорошую переносимость ротавирусной вакцины, а также подтвердили ее профилактическую эффективность, проявившуюся в снижении числа среднетяжелых и тяжелых гастроэнтеритов и госпитализаций.

Краснодар [30]

Были проведены следующие исследовательские работы на основе данных из 2386 медицинских карт детей первых 2 лет жизни, иммунизированных против РВИ, за период 2013–2017 гг.: ретроспективный анализ; оценка заболеваемости ОКИ и РВИ среди вакцинированных и невакцинированных детей; корреляционный анализ первичной профилактики РВИ и уровня заболеваемости РВИ на основе данных статистического наблюдения за инфекционной и паразитарной заболеваемостью Роспотребнадзора. Отмечена крайне низкая частота развития НЯ после иммунизации. Всего зарегистрировано 19 (0,79%) случаев НЯ (слабой степени выраженности). В ходе исследования установлено, что показатель заболеваемости ОКИ среди детей до 2 лет составил 1,5 для привитых и 3,5 — для непривитых. При этом вакцинированные дети переносили ОКИ в легкой форме. Иммунизированные дети той же возрастной категории не только в 2,5 раза реже болели острыми гастроэнтеритами, но и в 4,5 раза реже были госпитализированы по поводу ОКИ (0,1 и 0,45% соответственно).

Хабаровск [31]

Ретроспективное описательное исследование было выполнено в 2020–2021 гг. и включало в себя анкетирование родителей и изучение историй развития ребенка (форма № 112/у) 46 детей раннего возраста (2017–2019 гг. рождения), наблюдающихся в КГБУЗ «Детская городская поликлиника № 1» Минздрава Хабаровского края и в детской коммерческой клинике. Дети были отобраны по случайному признаку, разделены на 2 группы поровну: в группу 1 вошли привитые против РВИ, в группу 2 (контроль) — невакцинированные. В состав группы 1 входили 6 детей, получивших 1 дозу вакцины, 2 — 2 дозы, 15 — необходимые 3 дозы вакцины, то есть законченный курс вакцинации прошли 65,2% детей. При этом только у 1 ребенка отмечалась поствакцинальная реакция в виде атопического марша (дерматит и расстройство со стороны желудочно-кишечного тракта). Абсолютное число эпизодов ОКИ неустановленной этиологии было в 2 раза меньше в группе 1 по сравнению с контрольной группой: 4 и 8 соответственно. При этом госпитализаций по поводу ОКИ в группе 1 не зарегистрировано, а в группе 2 госпитализирован 1 ребенок. Малое число наблюдений не позволяет провести статистическую обработку полученных результатов.

Обсуждение

Выполнен обзор научных публикаций для оценки распространенности возбудителя на территории Российской Федерации и его роли в структуре ОКИ у детей раннего возраста (возрастная группа от 1 года до 3 лет). Проведен сравнительный обзор вакцин, представленных в России и мире. На основе анализа источников литературы представлен ряд выводов по накопленному опыту применения ротавирусных вакцин в нашей стране.

Отсутствие единой методологии сбора данных для оценки безопасности и эффективности программ иммунопрофилактики РВИ в перечисленных регионах, а также невысокий зачастую охват иммунизацией привели к разнородности полученных результатов. На сегодняшний день не представляется возможным дать оценку эффективности ротавирусной вакцинации в масштабах всей страны из-за низкого охвата профилактическими прививками и отсутствия национальной программы иммунизации против РВИ. Исключением могут служить данные, полученные в Подольске (Московская область), где были достигнуты относительно высокий охват иммунизацией против РВИ (общий охват детей — 43%, младшей возрастной группы — более 60%) и, как следствие, выраженное снижение заболеваемости в целевой и других возрастных группах, не попадавших под действие региональной программы иммунизации, что свидетельствует о формировании популяционного эффекта вакцинации [27].

Ни в одном из выполненных исследований не было зарегистрировано инвагинаций кишечника у детей, привитых против РВИ. В целом все авторы отметили благоприятный профиль безопасности ротавирусных вакцин, а также удобство применения пероральной формы введения, благодаря которой не происходит повышения инъекционной нагрузки на ребенка [24–31].

В целом представленные результаты российских исследований однозначно свидетельствуют о высокой профилактической эффективности и безопасности применяемых в нашей стране ротавирусных вакцин. Их штаммовый состав в основном соответствует распространенным в России генотипам ротавирусов группы А, что подтверждено многолетним рутинным мониторингом РЦКИ на базе ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора¹³. Широкий

¹³ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2023.
О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2022.

штаммовый состав вакцин потенциально обеспечивает перекрытие большинства циркулирующих генотипов ротавирусов группы А, хотя в последние годы в вопросах выбора ротавирусных вакцин для реализации универсальной программы вакцинопрофилактики ВОЗ рекомендует не опираться на локальные результаты генотипирования ротавирусных изолятов, поскольку прошедшие преквалификацию ВОЗ ротавирусные вакцины способны обеспечить защиту и от гетерологичных вариантов¹⁴. На основании анализа эффективности ротавирусных вакцин в реальной клинической практике международное экспертное сообщество придерживается мнения, что вакцины, применяемые на сегодняшний день, обладают схожей эффективностью в предотвращении РВГЭ у детей, при этом профилактическая эффективность выше в странах с низким уровнем детской смертности от последствий РВИ, чем в странах с умеренным и высоким уровнем [32].

Достаточно высокие показатели профилактической эффективности ротавирусных вакцин в различных регионах Российской Федерации в условиях наблюдательных исследований, а также максимальный уровень заболеваемости у детей в период жизни с 1 до 2-х лет свидетельствуют, что эпидемиологические особенности РВИ в нашей стране в целом соответствуют таковым в индустриально развитых государствах северного полушария [2]. Во всех рассмотренных нами статьях авторы отмечают благоприятный профиль безопасности ротавирусных вакцин и отсутствие эпизодов кишечных инвагинаций, развившихся в поствакцинальный период. Описанные в работе исследователей из Подольска [27] эпизоды кишечных инвагинаций были зарегистрированы у 29 детей в возрасте до 14 лет (период наблюдения – 2013–2018 гг.) с окончательным диагнозом у 21 ребенка. В период до начала вакцинации и в период реализации прививочных мероприятий частота госпитализации детей с подозрением на кишечную инвагинацию была сопоставимой, при этом в период проведения прививочной кампании среди вакцинированных детей не было госпитализаций [27].

Изученные источники носят описательный характер с неоднородным представлением полученных результатов, как правило, без должной статистической обработки, что делает невозможным проведение в данном обзоре статистического анализа данных. Кроме того, практически все исследования ротавирусных вакцин в Российской Федерации были выполнены до 2019 г. и содержат материалы только по одному препарату из двух доступных на сегодняшний день в нашей стране. Указанные факторы – основные ограничения настоящей работы.

Официально опубликованные сведения о санитарно-эпидемиологическом благополучии населения в Российской Федерации¹⁵, а также данные независимых исследований распространенности РВИ в структуре ОКИ у детей раннего возраста в различных регионах страны подтверждают большую эпидемиологическую значимость и высокий уровень заболеваемости РВИ у детей раннего возраста, а следовательно, необходимость включения в национальный календарь профилактических прививок Российской Федерации против РВИ.

Согласно Распоряжению¹⁶ Правительства Российской Федерации включение ротавирусной вакцины в национальный календарь профилактических прививок с внесением изменений в Федеральный закон «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней»¹⁷ было запланировано на 2022 г., однако затем перенесено¹⁸ на 2025 г.

Заключение

Ротавирусы группы А – одни из наиболее распространенных инфекционных возбудителей, поражающих детей раннего возраста во всем мире, и Российская Федерация не является исключением. Результаты многолетнего рутинного наблюдения, проводимого Референс-центром по мониторингу возбудителей кишечных инфекций (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), и локальных исследований в разных регионах России подтверждают ведущую этиологическую роль ротавирусов среди возбудителей острых кишечных инфекций у детей. Со времени регистрации и введения

¹⁴ Rotavirus vaccines. WHO position paper – July 2021. Wkly Epidemiol Rec. 2021;96(28):301–19.

¹⁵ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2023.

¹⁶ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 29.03.2021 № 774-р «О плане мероприятий по реализации Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 года» (с изменениями на 15 февраля 2023 года).

¹⁷ Федеральный закон от 17.09.1998 № 157-ФЗ «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней» (с изменениями на 2 июля 2021 года).

¹⁸ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 15.02.2023 № 343-р «О внесении изменений в распоряжение Правительства Российской Федерации от 29.03.2021 № 774-р» [О плане мероприятий по реализации Стратегии развития иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 года].

в практику первой ротавирусной вакцины в Российской Федерации в 2012 г. накоплен значительный опыт применения, подтверждающий благоприятный профиль безопасности и клиническую (иммунологическую) эффективность вакцинации в предотвращении развития ротавирусных гастроэнтеритов.

Для целей реализации национальной программы иммунизации детей раннего возраста могут применяться зарегистрированные в России, а также перспективные вакцины, нахо-

дящиеся на разных стадиях разработки, — после подтверждения их безопасности и эффективности в профилактике ротавирусных гастроэнтеритов в рамках рандомизированных контролируемых клинических исследований и прохождения процедуры государственной регистрации.

Необходимость включения вакцинации против ротавирусной инфекции в национальный календарь профилактических прививок Российской Федерации подтверждается данными проведенного анализа.

Литература/References

1. Sadiq A, Bostan N, Yinda KC, Naseem S, Sattar S. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Rev Med Virol.* 2018;28(6):e2003. <https://doi.org/10.1002/rmv.2003>
2. GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(11):1211–28. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30362-1)
3. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000–2013. *Clin Infect Dis.* 2016;62(Suppl 2):S96–105. <https://doi.org/10.1093/cid/civ1013>
4. Баранов АА, Намазова-Баранова ЛС, Таточенко ВК, Вишнева ЕА, Федосеев МВ, Селимзянова ЛР и др. Ротавирусная инфекция у детей — нерешенная проблема. Обзор рекомендаций по вакцинопрофилактике. *Педиатрическая фармакология.* 2017;14(4):248–57. Baranov AA, Namazova-Baranova LS, Tatochenko VK, Vishneva EA, Fedoseenko MV, Selimzianova LR, et al. Rotavirus infection in children is an unsolved problem. Review of guidelines for vaccinal prevention. *Pediatric Pharmacology.* 2017;14(4):248–57 (In Russ.). <https://doi.org/10.15690/pf.v14i4.1756>
5. Халиуллина СВ, Анохин ВА, Мухамедиева ЗТ, Курбанова ГМ. Этиологическая структура острых кишечных инфекций у пациентов, госпитализированных в инфекционный стационар. *Практическая медицина.* 2019;17(8):109–13. Khaliullina SV, Anokhin VA, Mukhamerdieva ZT, Kurbanova GM. Etiological structure of acute intestinal infections in patients hospitalized to an infectious hospital. *Practical Medicine.* 2019;17(8):109–13 (In Russ.). <https://doi.org/10.32000/2072-1757-2019-8-109-113>
6. Лукьянова АМ, Бехтерева МК, Птичникова НН. Клинико-эпидемиологическая характеристика вирусных диарей у детей. *Журнал инфектологии.* 2014;6(1):60–6. Lukjanova AM, Bekhtereva MK, Ptichnikova NN. Clinical and epidemiological characteristic viral diarrhea in children. *Journal Infectology.* 2014;6(1):60–6 (In Russ.). EDN: [RYRKFB](https://doi.org/10.32000/2072-1757-2019-8-109-113)
7. Молочкова ОВ, Ковалев ОБ, Россина АЛ, Шамшева ОВ, Корсунский АА, Кашченко ОА. и др. Клинико-этиологическая характеристика ОКИ у госпитализированных детей города Москвы в 2015–2017 гг. *Детские инфекции.* 2018;17(3):27–33. Molochkova OV, Kovalev OB, Rossina AL, Shamshева OV, Korsunsky AA, Kashchenko OA, et al. Clinico-etiological characteristics of acute intestinal infections in hospitalized children of Moscow in 2015–2017. *Children Infections.* 2018;17(3):27–33 (In Russ.). <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2018-17-3-27-33>
8. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17083. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
9. Sadiq A, Bostan N, Khan J, Aziz A. Effect of rotavirus genetic diversity on vaccine impact. *Rev Med Virol.* 2022;32(1):e2259. <https://doi.org/10.1002/rmv.2259>
10. Jain S, Vashist J, Changotra H. Rotaviruses: is their surveillance needed? *Vaccine.* 2014;32(27):3367–78. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.037>
11. Bányai K, László B, Duque J, Steele AD, Nelson EAS, Gentsch JR, Parashar UD. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine.* 2012;30(Suppl 1):A122–30. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.111>
12. Seheri M, Namarude L, Peenze I, Netshifhefhe L, Nyaga MM, Ngobeni HG, et al. Update of rotavirus strains circulating in Africa from 2007 through 2011. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(Suppl 1):S76–84. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000000053>
13. Seheri LM, Magagula NB, Peenze I, Rakau K, Ndadza A, Mwenda JM, et al. Rotavirus strain diversity in Eastern and Southern African countries before and after vaccine introduction. *Vaccine.* 2018;36(47):7222–30. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.068>
14. Varghese T, Kang G, Steele AD. Understanding rotavirus vaccine efficacy and effectiveness in countries with high child mortality. *Vaccines (Basel).* 2022;10(3):346. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030346>
15. Podkolzin AT, Fenske EB, Abramychева NY, Shipulin GA, Sagalova OI, Mazepa VN, et al. Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of di-

- arrhea in children and adults in Russia, 2005–2007. *J Infect Dis.* 2009;200(Suppl 1):S228–33.
<https://doi.org/10.1086/605054>
16. Skansberg A, Sauer M, Tan M, Santosham M, Jennings MC. Product review of the rotavirus vaccines ROTASII, ROTAVAC, and Rotavin-M1. *Hum Vaccin Immunother.* 2021;17(4):1223–34.
<https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1804245>
17. Burke RM, Tate JE, Kirkwood CD, Steele AD, Parashar UD. Current and new rotavirus vaccines. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(5):435–44.
<https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000572>
18. Li J, Zhang Y, Yang Y, Liang Z, Tian Y, Liu B, et al. Effectiveness of Lanzhou lamb rotavirus vaccine in preventing gastroenteritis among children younger than 5 years of age. *Vaccine.* 2019;37(27):3611–6.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.03.069>
19. Rosillon D, Buyse H, Friedland LR, Ng SP, Velázquez FR, Breuer T. Risk of intussusception after rotavirus vaccination: meta-analysis of postlicensure studies. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(7):763–8.
<https://doi.org/10.1097/inf.0000000000000715>
20. Духовлинов ИВ, Богомолова ЕГ, Федорова ЕА, Симбирцев АС. Исследование протективной активности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8. *Медицинская иммунология.* 2016;18(5):417–24.
Dukhovlinov IV, Bogomolova EG, Fedorova EA, Simbirtsev AS. Protective activity study of a candidate vaccine against rotavirus infection based on recombinant protein FliCVP6VP8. *Medical Immunology (Russia).* 2016;18(5):417–24 (In Russ.).
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-417-424>
21. Яговкин ЭА, Решетов АА, Колпакова ЕП, Ковришко МВ, Ванжа ВС, Троценко АА. Изучение возможности применения конъюгационных технологий при разработке ротавирусной инактивированной вакцины. *Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на Юге России. Ермольевские чтения.* Ростов-на-Дону: ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии», ООО «Мини Тайп»; 2021. С. 154–8.
Yagovkin EA, Reshetov AA, Kolpakova EP, Kovrizhko MV, Vanzha VS, Trotsenko AA. Study of the possibility of using conjugation technologies in the development of a rotavirus inactivated vaccine. *Topical issues of epidemiological surveillance of infectious and parasitic diseases in the South of Russia. Yermolyeva Readings.* Rostov-on-Don: Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology; Mini Type LLC; 2021:154–8 (In Russ.).
EDN: [YNTIDR](#)
22. Колпаков СА, Колпакова ЕП. Способ инактивации культурального ротавируса человека. Патент Российской Федерации № 2743300 C1; 2021.
Kolpakov SA, Kolpakova EP. Method of human culture rotavirus inactivation. Patent of the Russian Federation No. 2743300; 2021 (In Russ.).
EDN: [VLTMHM](#)
23. Черепушкин СА, Цибезов ВВ, Южаков АГ, Латышев ОЕ, Алексеев КП, Алтаева ЭГ и др. Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса А (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) человека. *Вопросы вирусологии.* 2021;66(1):55–64.
Cherepushkin SA, Tsibezov VV, Yuzhakov AG, Latshev OE, Alekseev KP, Altayeva EG, et al. Synthesis and characterization of human rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) virus-like particles. *Problems of Virology.* 2021;66(1):55–64 (In Russ.).
<https://doi.org/10.36233/0507-4088-27>
24. Рычкова ОА, Казакевич НВ, Дубинина ОВ, Шарухов ГВ, Курбатская МА, Иванова ГН и др. Профилактика ротавирусной инфекции: путь расширения региональной программы вакцинации Тюменской области. *Фарматека.* 2016;(11):106–11.
Rychkova OA, Kazakevich NV, Dubinina OV, Sharukho GV, Kurbatskaya MA, Ivanova GN, et al. Prevention of rotavirus infection: the way of expansion of the regional vaccination program in Tyumen region. *Pharmateka.* 2016;(11):106–11 (In Russ.).
EDN: [WIUJTL](#)
25. Смирнова СС, Голубкова АА, Колтунов СВ. Опыт вакцинации против ротавирусного гастроэнтерита в Свердловской области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2018;17(3):68–73.
Smirnova SS, Golubkova AA, Koltunov SV. Experience of vaccination against rotavirus gastroenteritis in the Sverdlovsk Region. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2018;17(3):68–73 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-3-68-73>
26. Южакова АГ, Мартынова ГП. Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции: социальная значимость и эффективность. *Журнал инфектологии.* 2017;9(2):65–71.
Yuzhakova AG, Martynova GP. Vaccine prevention of rotavirus infection: social significance and effectiveness. *Journal Infectology.* 2017;9(2):65–71 (In Russ.).
<https://doi.org/10.22625/2072-6732-2017-9-2-65-71>
27. Феклисова ЛВ, Шаповалова РФ. Результаты массовой иммунизации против ротавирусной инфекции детей первого года жизни на отдельной территории Московской области. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2019;18(4):75–81.
Feklisova LV, Shapovalova RF. The results of the mass immunization program against rotavirus infection of children of the first year of life in a separate territory of the Moscow region. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2019;18(4):75–81 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-75-81>
28. Гирина АА, Петровский ФИ, Сосыкина НВ, Заплатников АЛ. Оценка заболеваемости ротавирусной инфекцией и эффективности вакцинопрофилактики в Ханты-Мансийском автономном округе Югра в 2014–2018 годах. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2020;19(2):95–101.
Girina AA, Petrovskiy FI, Sosykina NV, Zaplatnikov AL. Evaluation of the incidence of rotavirus infection and the effectiveness of vaccination in the Khanty-Mansi Autonomous Ugra District in 2014–2018. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2020;19(2):95–101 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-95-101>

29. Гирина АА, Курганская АЮ. Клинико-эпидемиологическая характеристика и возможности профилактики ротавирусной инфекции у детей в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре. *Инфекционные болезни*. 2018;16(1):87–92. Girina AA, Kurganskaya AYU. A clinico-epidemiological characteristic and possibilities of preventing rotavirus infection in children of the Khanty-Mansi Autonomous Area–Yugra. *Infectious Diseases*. 2018;16(1):87–92 (In Russ.). <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2018-1-87-92>
30. Сутовская ДВ, Бурлуцкая АВ, Дубова ЛВ, Тюникова ЕИ, Куликова ВВ. Иммунопрофилактика ротавирусной инфекции в Краснодаре. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2018;25(5):152–5. Sutovskaya DV, Burlutskaya AV, Dubova LV, Tunikova EI, Kulikova VV. The immunoprophylaxis of rotavirus infections in Krasnodar. *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2018;25(5):152–5 (In Russ.). <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2018-25-5-152-155>
31. Копачевская КА, Чернышева НВ, Потапова КЭ. Приверженность и эффективность вакцинации детей раннего возраста против ротавирусной инфекции в Хабаровске. *Universum: медицина и фармакология*. 2022;(6):12–8. Kopachevskaya KA, Chernysheva NV, Potapova KE. Commitment and effectiveness of vaccination of young children against rotavirus infection in Khabarovsk. *Universum: Medicine and Pharmacology*. 2022;(6):12–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.32743/UniMed.2022.89.6.13709>
32. Burnett E, Parashar UD, Tate JE. Real-world effectiveness of rotavirus vaccines, 2006–19: a literature review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2020;8(9):e1195–202. [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(20\)30262-x](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(20)30262-x)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.С. Коровкин** – разработка концепции исследования и дизайна статьи, анализ и обобщение данных литературы, написание и редактирование текста рукописи; **Г.М. Игнатьев** – критический пересмотр текста рукописи; утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.S. Korovkin** conceptualised and designed the study, analysed and summarised literature data, drafted and edited the manuscript. **G.M. Ignatyev** critically revised the manuscript and approved the final version for publication.

Об авторах / Authors

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3241-1053>

korovkinas@expmed.ru

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

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

marburgman@mail.ru

Alexey S. Korovkin, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3241-1053>

korovkinas@expmed.ru

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

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

marburgman@mail.ru

Поступила 28.06.2023

После доработки 09.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Received 28 June 2023

Revised 9 November 2023

Accepted 24 November 2023

УДК 615.37:604:615.07

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-513-529>

Обзорная статья | Review article



Современные нормативные требования к проведению клинических исследований вакцин против вирусных инфекций

А.А. Солдатов✉, Д.В. Горенков, Ж.И. Авдеева, В.А. Меркулов

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

✉ Солдатов Александр Алексеевич; Soldatov@expmed.ru

Резюме

Актуальность. С учетом разработки в последнее время множества вакцин на основе новых технологических платформ особо большое значение приобретает обновление нормативных требований к вакцинным препаратам. Актуальной представляется разработка гармонизированных подходов в рамках национальных руководств и нормативных документов Евразийского экономического союза (ЕАЭС), регламентирующих проведение клинических исследований вирусных вакцин.

Цель. Анализ нормативных национальных и международных требований, регламентирующих проведение клинических исследований эффективности и безопасности вакцин для профилактики вирусных инфекционных заболеваний.

Обсуждение. Проведен анализ разработанных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и ведущими регуляторными органами руководств, касающихся различных аспектов проведения клинических исследований вирусных вакцин. В руководствах особое внимание уделено вопросам иммуногенности вакцин. Существенной проблемой для оценки эффективности вакцин является отсутствие обоснованных иммунных коррелятов защиты для большинства инфекций. Допускается проведение связующих исследований иммуногенности с целью расширения показаний на другие популяции вакцинируемых (например, по возрасту). Для регистрационной оценки безопасности минимальный объем выборки должен включать не менее 3000 вакцинированных. При проведении исследований безопасности для некоторых вакцин необходимо оценивать риск усиления инфекционного заболевания, связанного с введением вакцины, и развития вакциноиндуцированных заболеваний.

Заключение. Требования ВОЗ и ведущих мировых регуляторных органов к проведению клинических исследований вирусных вакцин в целом являются сходными и могут рассматриваться как взаимодополняющие при разработке новых, гармонизированных в соответствии с международными подходами национальных руководств или руководств ЕАЭС по клиническим исследованиям.

Ключевые слова: вакцины; вирусные вакцины; клинические исследования; разработка вакцин; нормативное регулирование; иммунный коррелят защиты; иммуногенность; безопасность; нежелательные явления; связующие исследования

Для цитирования: Солдатов А.А., Горенков Д.В., Авдеева Ж.И., Меркулов В.А. Современные нормативные требования к проведению клинических исследований вакцин против вирусных инфекций. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):513–529. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-513-529>

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.А. Меркулов — главный редактор (с 2021 г.), Ж.И. Авдеева — член редакционной коллегии (с 2016 г.) журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

© А.А. Солдатов, Д.В. Горенков, Ж.И. Авдеева, В.А. Меркулов, 2023

Current regulatory requirements for clinical trials of viral vaccines

Aleksandr A. Soldatov ✉, Dmitry V. Gorenkov, Zhanna I. Avdeeva, Vadim A. Merkulov

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

✉ Aleksandr A. Soldatov; Soldatov@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. In recent years, the development of various vaccines based on novel platforms has underscored the significance of updating regulatory requirements for vaccines. Consequently, clinical trials of viral vaccines need harmonised approaches within national guidelines and the Eurasian Economic Union (EAEU) regulatory framework.

Aim. This study aimed to analyse national and international requirements for clinical trials of the efficacy and safety of preventive viral vaccines.

Discussion. This article presents an analysis of the guidelines issued by the WHO and leading regulatory authorities on different aspects of clinical trials of viral vaccines. These guidelines place particular emphasis on the immunogenicity of vaccines. The lack of well-established immune correlates of protection for most infections presents a significant problem for assessing the effectiveness of vaccines. Immunobridging studies may be conducted to expand vaccine indications to different populations (such as a new age group). The size of the pre-clinical safety database should include data on at least 3,000 vaccinated study participants. For some vaccines, safety studies must assess the risk of disease onset or enhancement due to vaccination.

Conclusions. The clinical trial requirements for viral vaccines have been substantially aligned by the WHO and major international regulatory authorities, thereby facilitating the development of harmonised national or EAEU guidelines.

Keywords:

vaccines; viral vaccines; clinical studies; clinical trials; vaccine development; regulatory control; immune correlate of protection; immunogenicity; safety; adverse events; bridging studies

For citation:

Soldatov A.A., Gorenkov D.V., Avdeeva Zh.I., Merkulov V.A. Current regulatory requirements for clinical trials of viral vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):513–529. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-513-529>

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 reporting No. 121022000147-4).

Disclosure. V.A. Merkulov has been the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. Zh.I. Avdeeva has been a member of the Editorial Board of the journal since 2016. The other authors declare having no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Для обоснования эффективности и безопасности при регистрации новой вакцины или для утверждения нового показания для уже зарегистрированной вакцины необходимо проведение клинических исследований (КИ). К вакцинам предъявляются особые требования к оценке безопасности, которые необходимо учитывать на этапе КИ. Проведение КИ лекарственных средств регламентируется как национальными, так и международными требованиями¹.

В силу того что существующие в настоящее время вакцины относятся к различным типам (живые, аттенуированные, белковые и др.), создание единого руководства для оценки качества, безопасности и эффективности вакцин усложнено.

С учетом разработки в последнее время множества вакцин на основе новых технологических платформ особо важное значение приобретает обновление нормативных требований к вакцинным препаратам. Актуальным представляется создание и совершенствование

¹ Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004. WHO; 2017. Guideline on clinical evaluation of vaccines (EMA/CHMP/VWP/164653/05 Rev. 1). EMA; 2023.

регуляторной базы для оценки качества, эффективности и безопасности вакцин в рамках национальных руководств и нормативных документов Евразийского экономического союза (ЕАЭС).

Цель работы — анализ нормативных национальных и международных требований, регламентирующих проведение клинических исследований эффективности и безопасности вакцин для профилактики вирусных инфекционных заболеваний.

Общие требования для проведения клинических исследований вакцин

Первые рекомендации, регламентирующие проведение КИ, были разработаны Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) в 1998 г. и Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2002 г. (табл. 1). ВОЗ является основной международной организацией, разрабатывающей рекомендации для проведения оценки вакцин. Во многом это обусловлено тем, что ВОЗ работает в тесном контакте с Организацией Объединенных Наций (ООН), фондами ООН (например, ЮНИСЕФ — Детский фонд ООН) и другими учреждениями, обеспечивающими закупку вакцин для использования в очагах эпидемий, в первую очередь в экономически неблагополучных странах. Начиная с 2010 г. ВОЗ получила полномочия для проведения процедуры предварительной квалификации (преквалификации) вакцин разных производителей². Целью процедуры является обеспечение качества, безопасности и эффективности вакцин, предоставляемых через ООН национальным органам здравоохранения в разных странах для вакцинации целевых групп населения.

Руководящие принципы и рекомендации ВОЗ, согласованные экспертами различных стран для использования производителями и национальными регуляторными органами, публикуются в сериях технических отчетов ВОЗ (WHO Technical Report Series, TRS). TRS разрабатываются экспертами в области биологической стандартизации для достижения согласованности в отношении производства, контроля качества

и нормативного контроля биологических лекарственных средств, включая вакцины.

Рекомендации, подготовленные ВОЗ для оценки качества, безопасности и эффективности вакцин, послужили основой для разработки нормативных документов для регистрации вакцин национальными и международными регуляторными органами. В частности, Парламентом Европейского союза (ЕС) был одобрен документ, согласно которому Комитет по лекарственным средствам для медицинского применения ЕМА (Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP) может проводить научную оценку и давать заключения (в сотрудничестве с ВОЗ) в отношении лекарств и вакцин, предназначенных исключительно для использования за пределами ЕС³.

Среди документов, касающихся общих вопросов клинической оценки эффективности и безопасности вакцин, следует выделить рекомендации ВОЗ 2017 г. и ЕМА 2023 г.⁴ В Руководстве по клиническому исследованию вакцин ВОЗ⁵ проведено обобщение имеющегося опыта по КИ вакцинных препаратов. В настоящее время данное руководство является наиболее полным и объективным документом, регламентирующим клинические исследования вакцин. В документе основное внимание уделено вопросам иммуногенности вакцин, включая выбор препарата сравнения, конечных точек и критериев приемлемости. Также в руководстве освещены проблемы разработки и обоснования коррелята защиты, представлены особенности проведения исследований безопасности вакцин⁶. Руководство ЕМА по клиническому исследованию вакцин⁷ составлено с учетом появления вакцин против инфекционных заболеваний, вакцинопрофилактика которых ранее не была доступна.

В Российской Федерации отсутствует нормативно-правовой документ, который, подобно вышеуказанным руководствам ВОЗ и ЕМА, отдельно бы регламентировал порядок проведения КИ вакцинных препаратов. На уровне ЕАЭС приняты «Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»⁸, в которых некоторые главы посвящены оценке, в том числе клинической,

² Guidelines for independent lot release of vaccines by regulatory authorities, Annex 2, TRS No. 978. WHO; 2010.

³ Regulation (EC) No. 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency.

⁴ Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004. WHO; 2017.

Guideline on clinical evaluation of vaccines (EMA/CHMP/VWP/164653/05 Rev. 1). EMA; 2023.

⁵ Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004. WHO; 2017.

⁶ Там же.

⁷ Guideline on clinical evaluation of vaccines (EMA/CHMP/VWP/164653/05 Rev. 1). EMA; 2023.

⁸ «Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии № 89 от 03.11.2016).

Таблица 1. Нормативные документы, регламентирующие общий порядок проведения клинических исследований вакцин для профилактики инфекционных заболеваний**Table 1.** Guidelines regulating the general procedure of clinical trials of preventive viral vaccines

Наименование документа <i>Document title</i>	Регуляторный орган <i>Regulatory authority</i>	Год утверждения <i>Year of approval</i>	Источник <i>Reference</i>
ICH Topic E9. Statistical principles for clinical trials (CPMP/ICH/363/96)	EMA, ICH	1998	Сноска ⁹ <i>Footnote⁹</i>
The importance of pharmacovigilance: safety monitoring of medicinal products	ВОЗ <i>WHO</i>	2002	Сноска ¹⁰ <i>Footnote¹⁰</i>
Toxicity grading scale for healthy adult and adolescent volunteers enrolled in preventive vaccine clinical trials. Guidance for industry	FDA	2007	Сноска ¹¹ <i>Footnote¹¹</i>
Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines (EMA/CHMP/VWP/141697/2009)	EMA	2010	Сноска ¹² <i>Footnote¹²</i>
General principles for the development of vaccines to protect against global infectious diseases. Guidance for industry	FDA	2011	Сноска ¹³ <i>Footnote¹³</i>
Expert consultation on the use of placebos in vaccine trials. Meeting report	ВОЗ <i>WHO</i>	2013	Сноска ¹⁴ <i>Footnote¹⁴</i>
Guidelines on procedures and data requirements for changes to approved vaccines, Annex 4, TRS No. 993	ВОЗ <i>WHO</i>	2015	Сноска ¹⁵ <i>Footnote¹⁵</i>
Guideline for good clinical practice E6(R2) (EMA/CHMP/ICH/135/1995)	EMA, ICH	2016	Сноска ¹⁶ <i>Footnote¹⁶</i>
Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004	ВОЗ <i>WHO</i>	2017	Сноска ¹⁷ <i>Footnote¹⁷</i>
Guidelines on the quality, safety and efficacy of plasmid DNA vaccines, Annex 2, TRS No. 1028	ВОЗ <i>WHO</i>	2021	Сноска ¹⁸ <i>Footnote¹⁸</i>
Guideline on clinical evaluation of vaccines (EMA/CHMP/VWP/164653/05 Rev. 1)	EMA	2023	Сноска ¹⁹ <i>Footnote¹⁹</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. EMA — Европейское агентство по лекарственным средствам; ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения; FDA — Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств; ICH — Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения.

Note. EMA, European Medicines Agency; WHO, World Health Organisation; FDA, Food and Drug Administration; ICH, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use.

отдельных вакцин, а также вакцинных адъювантов: «Адъюванты вакцин для лечения и профилактики заболеваний человека» (глава 16), «Указания по проведению доклинических и клинических исследований вакцин для профилактики гриппа» (глава 29)²⁰, «Указания по разработке вакцин против оспы (осповакцин)» (глава 30)²¹ (положения, содержащиеся в главах 29 и 30, вступят в силу в феврале 2024 г.).

Учитывая то, что в одном документе сложно представить все аспекты разработки и исследования разных типов вакцин, ВОЗ были подготовлены отдельные руководства для оценки качества, безопасности и эффективности вакцин, предназначенных для профилактики определенных заболеваний (табл. 2). Кроме того, ВОЗ предоставляет международные стандартные образцы для оценки биологических препаратов,

⁹ https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-e-9-statistical-principles-clinical-trials-step-5_en.pdf

¹⁰ <https://www.who.int/publications/i/item/10665-42493>

¹¹ <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/toxicity-grading-scale-healthy-adult-and-adolescent-volunteers-enrolled-preventive-vaccine-clinical>

¹² https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-live-recombinant-viral-vectored-vaccines_en.pdf

¹³ <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/general-principles-development-vaccines-protect-against-global-infectious-diseases>

¹⁴ <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506250>

¹⁵ <https://www.who.int/publications/m/item/procedures-and-data-requirements-changes-to-approved-vaccines-annex-4-trs-no-993>

¹⁶ <https://www.ema.europa.eu/en/ich-e6-r2-good-clinical-practice-scientific-guideline>

¹⁷ <https://www.who.int/publications/m/item/clinical-evaluation-of-vaccines-annex-9-trs-no-1004>

¹⁸ <https://www.who.int/publications/m/item/plasmid-dna-vaccines-annex-2-trs-no-1028>

¹⁹ https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-evaluation-vaccines-revision-1_en.pdf

²⁰ Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 77 от 04.07.2023 «О внесении изменений в Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

²¹ Там же.

Таблица 2. Нормативные документы, регламентирующие проведение клинических исследований отдельных вирусных вакцин для профилактики инфекционных заболеваний

Table 2. Guidelines regulating the clinical trials of particular preventive viral vaccines

Наименование документа <i>Document title</i>	Регуляторный орган <i>Regulatory authority</i>	Год утверждения <i>Year of approval</i>	Источник <i>Reference</i>
Note for guidance on the development of vaccinia virus based vaccines against smallpox (CPMP/1100/02)	EMA	2002	Сноска ²² <i>Footnote²²</i>
Clinical data needed to support the licensure of pandemic influenza vaccines. Guidance for industry	FDA	2007	Сноска ²³ <i>Footnote²³</i>
Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs, Annex 2, TRS No. 941	ВОЗ <i>WHO</i>	2007	Сноска ²⁴ <i>Footnote²⁴</i>
Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral), Annex 3, TRS No. 941	ВОЗ <i>WHO</i>	2007	Сноска ²⁵ <i>Footnote²⁵</i>
Recommendations for Japanese encephalitis vaccine (inactivated) for human use, Annex 1, TRS No. 963	ВОЗ <i>WHO</i>	2011	Сноска ²⁶ <i>Footnote²⁶</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant hepatitis B vaccines, Annex 4, TRS No. 978	ВОЗ <i>WHO</i>	2013	Сноска ²⁷ <i>Footnote²⁷</i>
Guidelines on the quality, safety and efficacy of dengue tetravalent vaccines (live, attenuated), Annex 2, TRS No. 979	ВОЗ <i>WHO</i>	2013	Сноска ²⁸ <i>Footnote²⁸</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of influenza vaccines (human, live attenuated) for intranasal administration, Annex 4, TRS No. 977	ВОЗ <i>WHO</i>	2013	Сноска ²⁹ <i>Footnote²⁹</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines, Annex 5, TRS No. 978	ВОЗ <i>WHO</i>	2013	Сноска ³⁰ <i>Footnote³⁰</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of Japanese encephalitis vaccines (live, attenuated) for human use, Annex 7, TRS No. 980	ВОЗ <i>WHO</i>	2014	Сноска ³¹ <i>Footnote³¹</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (oral, live, attenuated), Annex 2, TRS No. 980	ВОЗ <i>WHO</i>	2014	Сноска ³² <i>Footnote³²</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (inactivated), Annex 3, TRS No. 993	ВОЗ <i>WHO</i>	2015	Сноска ³³ <i>Footnote³³</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant human papillomavirus virus-like particle vaccines, Annex 4, TRS No. 999	ВОЗ <i>WHO</i>	2016	Сноска ³⁴ <i>Footnote³⁴</i>
Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module (EMA/CHMP/VWP/457259/2014)	EMA	2016	Сноска ³⁵ <i>Footnote³⁵</i>
Evaluation of influenza vaccine effectiveness. A guide to the design and interpretation of observational studies	ВОЗ <i>WHO</i>	2017	Сноска ³⁶ <i>Footnote³⁶</i>
Guidelines on the quality, safety and efficacy of Ebola vaccines, Annex 2, TRS No. 1011	ВОЗ <i>WHO</i>	2018	Сноска ³⁷ <i>Footnote³⁷</i>

²² https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-development-vaccinia-virus-based-vaccines-against-smallpox_en.pdf

²³ <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clinical-data-needed-support-licensure-pandemic-influenza-vaccines>

²⁴ <https://www.who.int/publications/m/item/inactivated-rabies-vaccine-for-human-use-annex-2-trs-no-941>

²⁵ <https://www.who.int/publications/m/item/oral-live-attenuated-rotavirus-vaccines-annex-3-trs-no-941>

²⁶ <https://www.who.int/publications/m/item/japanese-encephalitis-vaccine-inactivated-annex-1-trs-no-963>

²⁷ <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-hep-b-A4-trs-978>

²⁸ https://www.who.int/publications/m/item/TRS_979_annex-2-dengue

²⁹ <https://www.who.int/publications/m/item/influenza-attenuated-intranasal-administration-annex-4-trs-no-977>

³⁰ <https://www.who.int/publications/m/item/yellow-fever-vaccines-live-attenuated-annex-5-trs-no-978>

³¹ <https://www.who.int/publications/m/item/japanese-encephalitis-vaccines-live-attenuated-annex-7-trs-no-980>

³² <https://www.who.int/publications/m/item/oral-live-attenuated-poliomyelitis-vaccine-annex-2-trs-no-980>

³³ <https://www.who.int/publications/m/item/poliomyelitis-vaccines-inactivated-annex-3-trs-no-993>

³⁴ <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-hpv-like-particle-vaccines-annex-4-trs-no-999>

³⁵ <https://www.ema.europa.eu/en/influenza-vaccines-non-clinical-clinical-module-scientific-guideline>

³⁶ <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241512121>

³⁷ <https://www.who.int/publications/m/item/annex-2-trs1011-ebola>

Продолжение таблицы 2

Table 2 (continued)

Наименование документа <i>Document title</i>	Регуляторный орган <i>Regulatory authority</i>	Год утверждения <i>Year of approval</i>	Источник <i>Reference</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant hepatitis E vaccines, Annex 2, TRS No. 1016	ВОЗ <i>WHO</i>	2019	Сноска ³⁸ <i>Footnote³⁸</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (inactivated), Annex 3, TRS No. 1024	ВОЗ <i>WHO</i>	2020	Сноска ³⁹ <i>Footnote³⁹</i>
Guidelines on the quality, safety and efficacy of respiratory syncytial virus vaccines, Annex 2, TRS No. 1024	ВОЗ <i>WHO</i>	2020	Сноска ⁴⁰ <i>Footnote⁴⁰</i>
Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines (inactivated), Annex 3, TRS No. 1030	ВОЗ <i>WHO</i>	2021	Сноска ⁴¹ <i>Footnote⁴¹</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. ЕМА — Европейское агентство по лекарственным средствам; ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения; FDA — Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств.

Note. EMA, European Medicines Agency; WHO, World Health Organisation; FDA, Food and Drug Administration.

которые служат эталонными источниками для определения биологической активности, выраженной в согласованных международных единицах.

Оценка иммуногенности вакцин

В Руководстве по клиническому исследованию вакцин ВОЗ⁴² указано, что изучение иммуногенности проводится на всех этапах разработки вакцины до получения регистрации; дополнительные исследования могут проводиться и в пострегистрационном периоде. Оценка иммуногенности основана на сборе биообразцов в соответствующие промежутки времени (до и после вакцинации) и определении наиболее значимых для вакцины параметров иммунитета. Как правило, для вакцин, содержащих новые антигены, которые ранее не использовались в вакцинах для человека, необходим тщательный анализ иммунного ответа на вакцинацию.

Согласно рекомендациям Руководства ВОЗ⁴³ программа КИ должна включать определение уровня (по количественным показателям) иммунного ответа, включая характеристику функциональных свойств антител (например, уровень нейтрализующих антител). В отдельных случаях в исследование иммуногенности может быть включена характеристика Т-клеточного иммунного ответа с оценкой индукции иммунной памяти (примирование), определение специфичности и перекрестной реактивности иммунного ответа и оценка изменений авидно-

сти антител после введения двух или более доз вакцины. При выполнении исследования также проводится характеристика инфекционного агента (например, описание подтипов вируса) и антигенного состава вакцины (например, индуцируют ли вакцинные антигены кросс-реактивный ответ на невакцинные штаммы).

При исследовании иммуногенности оценку гуморального иммунного ответа проводят с использованием образцов сыворотки крови, однако для некоторых видов вакцин наиболее информативным может быть применение других биологических жидкостей организма (например, биообразцы носовых смывов или цервикальной слизи), что связано с механизмами инфицирования и/или репликации возбудителя инфекционного процесса. Это особенно важно в случаях, если известно или предполагается, что системный иммунный ответ на вакцину не коррелирует с защитной эффективностью (например, интраназальная вакцинация против гриппа). Тем не менее согласно рекомендациям Руководства ВОЗ⁴⁴ установлено, что сыворотка крови является основной биологической жидкостью для оценки уровня вакцинального иммунного ответа при принятии решения о регистрации препарата.

Сроки взятия образцов сыворотки крови для оценки уровня специфических антител определяются с учетом информации о пиковом иммунном ответе после первой иммунизации или, если применимо, последующих иммунизаций. В случае новых антигенов, которые

³⁸ <https://www.who.int/publications/m/item/recombinant-hepatitis-e-vaccines-annex-2-trs-1016>

³⁹ <https://www.who.int/publications/m/item/poliomyelitis-vaccines-annex-3-trs-no-1024>

⁴⁰ <https://www.who.int/publications/m/item/respiratory-syncytial-virus-vaccines-annex-2-trs-no-1024>

⁴¹ <https://www.who.int/publications/m/item/ev71-recommendations>

⁴² Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004. WHO; 2017.

⁴³ Там же.

⁴⁴ Там же.

ранее не использовались в составе вакцинного препарата, время забора сыворотки крови может быть основано на данных доклинических исследований и затем скорректировано после получения результатов КИ иммуногенности вакцины. Необходимым является определение уровня специфических антител до вакцинации, особенно если предполагается, что в целевой группе может быть прослойка лиц со специфическими антителами в результате естественного контакта с возбудителем и/или ранее проведенной вакцинации. Оценка уровня специфических антител до вакцинации важна для определения уровня и фактора сероконверсии после вакцинации (среднее геометрическое титров (СГТ) антител; среднее геометрическое концентраций (СГК) антител). Гуморальный иммунный ответ на вакцинацию оценивается по появлению специфических антител против вакцинных антигенов или, при их наличии, по кратному увеличению соответствующих значений СГТ⁴⁵.

Программа исследования иммуногенности вакцины зависит в первую очередь от установления иммунного коррелята защиты. Если корреляционная связь между уровнем специфических и вируснейтрализующих антител выявлена, то в дальнейших исследованиях может быть допустима оценка только уровня вирусспецифических IgG. Даже в этом случае характеристика вируснейтрализующего иммунного ответа важна для определенных возрастных или других целевых групп, в отношении которых известно или предполагается, что способность специфических антител связываться с вирусом отличается от их вируснейтрализующей активности. Если отсутствует обоснованный иммунный коррелят защиты, то, если это возможно, необходима оценка уровня нейтрализующих антител⁴⁶.

Определение уровня клеточно-опосредованного иммунного ответа проводится для отдельных инфекционных заболеваний; для остальных инфекций этот показатель может служить подтверждением выводов, основанных на данных о гуморальном иммунном ответе (например, при оценке пользы от добавления в состав вакцины адъюванта или при оценке степени перекрестного иммунитета, индуцированного вакциной).

На развитие вакцинального иммунного ответа влияет много факторов, в том числе

и социально-экономические особенности региона, в котором проводятся КИ. Далеко не всегда исследования, проведенные в одном регионе, могут предсказать эффективность вакцины на других территориях. Так, результаты КИ показали, что при вакцинации ротавирусной вакциной выявлены различные уровни вирусспецифических IgA в сыворотке крови у людей из стран с разным уровнем экономического развития (развитых, менее развитых или развивающихся). Кроме того, оценка протективности ограничена серотипами, циркулирующими в странах, где проводились исследования⁴⁷. В связи с вышесказанным при планировании исследований ротавирусной вакцины (до или после регистрации) следует учитывать возможные последствия влияния следующих факторов: преобладающие циркулирующие серотипы ротавируса, иммунизация другими оральными вакцинами, иммунодефициты, наличие грудного вскармливания и материнских антител, факторы недоедания и дефицита витаминов, сопутствующие инфекции (кишечные инфекции, малярия, паразитарные инфекции, ВИЧ, гепатит)⁴⁸.

Иммунный коррелят защиты

Иммунный коррелят защиты — это количественное значение иммунологического показателя, статистически коррелирующее с уровнем защиты от инфекции, индуцированной вакциной [1]. В настоящее время все установленные корреляты защиты основаны на параметрах гуморального иммунного ответа (количественные значения вируснейтрализующих или специфических IgG антител). Некоторые примеры хорошо зарекомендовавших себя иммунных коррелятов защиты включают антитела к дифтерийному и столбнячному анатоксинам, полиовирусам, вирусу гепатита В и капсулярному полисахариду *Haemophilus influenzae* типа b. В большинстве случаев установленный иммунный коррелят защиты статистически связан с профилактикой клинической формы заболевания, но для некоторых патогенов коррелят защиты ассоциирован с предотвращением инфицирования (например, гепатит А и гепатит В).

В руководстве ВОЗ⁴⁹ установлены рекомендации по определению и обоснованию иммунных коррелятов защиты. Для обоснования иммунных коррелятов защиты рекомендуется

⁴⁵ Там же.

⁴⁶ Там же.

⁴⁷ Wood D, WHO Informal Consultative Group. WHO informal consultation on quality, safety and efficacy specifications for live attenuated rotavirus vaccines Mexico City, Mexico, 8–9 February 2005. Vaccine. 2005;23(48–49):5478–87.

⁴⁸ Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral), Annex 3, TRS No. 941. WHO; 2007.

⁴⁹ Там же.

использовать результаты серологического мониторинга и заболеваемости в целевых группах населения, данные по применению антител, полученных от людей с установленным специфическим иммунным ответом, для пассивной защиты и данные оценки эффективности, полученные в контролируемых КИ или в реальных условиях применения.

Следует отметить, что иммунный коррелят защиты, обоснованный в одном клиническом исследовании вакцины для определенной популяции, не обязательно может быть применим к другим разрабатываемым вакцинам, предназначенным для предотвращения того же инфекционного заболевания. Кроме того, данный коррелят защиты может быть неприменим в других группах населения и при иной эпидемической обстановке. Иммунные корреляты защиты могут различаться между популяциями разных этнических групп, в которых субъекты могли в естественных условиях встречаться с разными подтипами одного возбудителя.

Клинические исследования эффективности вакцин против вирусных инфекций

Согласно рекомендациям руководств ВОЗ и ЕМА⁵⁰ программа клинической разработки новых вакцин-кандидатов начинается с изучения их безопасности; при этом также оценивается иммунный ответ на каждый антиген, находящийся в составе вакцины. В первом исследовании целесообразно включение в выборку здоровых серонегативных добровольцев. Затем на основе результатов КИ фазы I проводятся исследования фазы II с целью оценки безопасности и иммуногенности. Желательно, чтобы эти исследования были проведены в целевой популяции. Исследования I и II фаз обычно предназначены для получения достаточных данных по безопасности и иммуногенности при обосновании выбора одного или нескольких составов вакцин-кандидатов, которые будут оцениваться в основных клинических исследованиях — для выбора количества антигенных компонентов и, в случаях, где это применимо, адъюванта.

Основные исследования (КИ фазы III) проводятся с целью получения клинических данных, достаточных для регистрации вакцины. Первичной конечной точкой таких КИ является

оценка протективной эффективности вакцины либо напрямую, либо исходя из полученных данных иммуногенности⁵¹. В исключительных случаях для регистрации может быть достаточно данных КИ фазы II. Обычно в основных исследованиях используются серии вакцин, полученные по технологии для коммерческого выпуска препарата.

Разработка конкретной программы КИ во многом зависит от заболевания, против которого направлена создаваемая вакцина. Так, в случае антирабической вакцины⁵² первичные исследования иммуногенности проводятся с участием здоровых, ранее не вакцинированных добровольцев, не контактировавших с вирусным антигеном. После подтверждения иммуногенности в этой популяции проводятся дальнейшие КИ иммуногенности в целевых популяциях с оценкой эффективности. Иммуногенность и безопасность оцениваются как в доконтактном, так и в постконтактном периодах. При проведении КИ должны быть охарактеризованы различные схемы вакцинации и способы введения, начало, степень и продолжительность защиты, а также необходимость и сроки ревакцинации. Исследование доконтактной протективной эффективности вакцины проводится в эндемичных районах. Выборка должна включать пожилых людей, как вакцинированных, так и не вакцинированных. Постконтактная протективность оценивается после получения данных об иммуногенности только в районах и группах населения с высоким риском⁵³.

В исследованиях протективной эффективности вакцины нет необходимости, если установлено, что клинические иммунологические данные можно использовать для прогнозирования защиты от болезни. В этом случае, если имеется установленный иммунный коррелят защиты в отношении конкретного заболевания (например, антитела против поверхностного антигена гепатита В), достаточно провести КИ, которое продемонстрирует, что вакцина-кандидат вызывает удовлетворяющий показатель коррелята защиты иммунный ответ.

При разработке новой вакцины-кандидата для профилактики инфекционного заболевания исследование эффективности проводится, в том числе, при следующих условиях: если отсутствует обоснованный иммунный коррелят защиты,

⁵⁰ Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004. WHO; 2017.

Guideline on clinical evaluation of vaccines (EMA/CHMP/VWP/164653/05 Rev. 1). EMA; 2023.

⁵¹ Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004. WHO; 2017.

⁵² Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs, Annex 2, TRS No 941. WHO; 2007.

⁵³ Там же.

если отсутствует зарегистрированная вакцина против конкретного инфекционного заболевания с документально подтвержденной эффективностью, что не позволяет провести связующие исследования (bridging studies) с новой вакциной-кандидатом⁵⁴.

Протективную эффективность вакцины против конкретного инфекционного заболевания обычно определяют в ходе рандомизированных КИ, в которых сравнивают заболеваемость у участников в группе после вакцинации с заболеваемостью в контрольной группе, которая не была вакцинирована. Реже протективность вакцины может быть определена в исследовании, в котором сравнивается заболеваемость после вакцинации между следующими группами: основной группой, получившей новую кандидатную вакцину, и контрольной группой, получившей зарегистрированную вакцину, предназначенную для профилактики того же инфекционного заболевания⁵⁵.

Если для обоснования эффективности и безопасности новой вакцины используются сравнительные исследования с уже зарегистрированной вакциной, то необходимо обосновать выбор вакцины сравнения. В качестве препарата сравнения необходимо использовать вакцину того же типа, вводимую тем же путем, что и изучаемый препарат. Например, субъединичная вакцина для профилактики гриппа должна сравниваться с зарегистрированной субъединичной вакциной, расщепленная вакцина — с расщепленной. Наиболее предпочтительно использование препаратов сравнения, в отношении которых получены данные, обосновывающие их эффективность в реальных условиях применения (обычно в пострегистрационных наблюдательных исследованиях)⁵⁶.

Особое внимание при проведении КИ эффективности и безопасности необходимо уделить критериям включения добровольцев. Обычно в исследование не могут быть включены лица с предполагаемой аллергической реакцией на вакцину и принимающие иммуносупрессивную терапию. Дополнительные критерии исключения должны основываться на клиническом опыте применения конкретной вакцины. Например, в исследовании рекомбинантной вакцины против лихорадки Эбола было выявлено развитие артрита при введении вакцины,

в связи с чем лица с артритом (в том числе в анамнезе) были исключены из участия в начальных фазах исследования данной вакцины до тех пор, пока не определена частота, продолжительность и тяжесть данного нежелательного явления (НЯ)⁵⁷.

Простейшая схема КИ предполагает рандомизацию равного количества субъектов в группу вакцины-кандидата и контрольную группу (1:1). В исследованиях, в которых есть контрольная группа невакцинированных, но при этом имеются клинические данные, подтверждающие вероятную эффективность вакцины-кандидата, по этическим принципам может быть уместно (с учетом статистических данных и оценки воздействия на общий размер основной выборки) использовать несбалансированную рандомизацию (например, 2:1 или 3:1), чтобы большинство субъектов получили вакцину-кандидат⁵⁸.

Особенности программ клинических исследований некоторых вакцин против вирусных инфекций

Следует отметить, что проведение исследования эффективности вакцины затруднено в некоторых случаях: если новая кандидатная вакцина предназначена для предотвращения инфекционного заболевания, которое в настоящее время не встречается (например, натуральная оспа); если заболевание возникает в виде непредсказуемых и кратковременных вспышек, когда недостаточно времени для проведения должным образом спланированных исследований по надежной оценке эффективности вакцины (например, некоторые вирусные геморрагические лихорадки). Кроме того, проведение КИ затруднительно в случаях, когда инфекционное заболевание встречается редко и его распространение территориально ограничено, а также в результате широкого применения эффективных вакцин среди населения.

Так, исследование протективной эффективности противооспенной вакцины невозможно ввиду того, что вирус натуральной оспы в настоящее время не циркулирует в популяции⁵⁹. Имеются исследовательские данные о том, что после первичной вакцинации против натуральной оспы образование небольшого очага повреждения (оспины или язвы) диаметром 1–8 мм связано с максимальными уровнями нейтрализующих

⁵⁴ Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004. WHO; 2017.

⁵⁵ Там же.

⁵⁶ Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module (EMA/CHMP/VWP/457259/2014). EMA; 2016.

⁵⁷ Guidelines on the quality, safety and efficacy of Ebola vaccines, Annex 2, TRS No 1011. WHO; 2018.

⁵⁸ Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004. WHO; 2017.

⁵⁹ Note for guidance on the development of vaccinia virus-based vaccines against smallpox (CPMP/1100/02). EMA; 2002.

антител. Основываясь на описанных наблюдениях, можно полагать, что данные по потенциальной протективной эффективности новой противооспенной вакцины можно получить исходя из доли вакцинированных, у которых образовались оспины необходимого размера в месте введения вакцины⁶⁰.

При проведении исследований эффективности при наличии иммунного коррелята защиты основной конечной точкой обычно является процент субъектов с уровнем антител равным или превышающим установленный коррелят защиты (серопротекция). При отсутствии иммунного коррелята защиты первичная конечная точка обычно основывается на оценке гуморального иммунного ответа. При этом либо устанавливается пороговое значение показателя (первичная конечная точка может соответствовать процентной доле субъектов, у которых уровни антител достигают порогового значения или превышают его), либо в качестве первичной конечной точки может быть использована частота сероконверсии.

В случае если КИ проводится с целью обоснования вакцинации в другой возрастной группе или другой дозе, обычно проводятся связующие исследования иммуногенности. Дизайн такого исследования может включать прямое сравнение между группами. Возможны ситуации, когда единственной возможностью проведения связующих исследований является проведение сравнительных исследований с вакциной, зарегистрированной, в свою очередь, тоже на основе связующих исследований, что снижает достоверность демонстрации не меньшей эффективности; это необходимо учитывать при разработке дизайна таких исследований. Подобные соображения справедливы и в случае, когда зарегистрированная вакцина с установленной протективностью была заменена вакциной, содержащей большее количество антигенов на основе сравнения иммунного ответа на общие антигены, а последняя затем используется в качестве референтной в связующих исследованиях⁶¹.

Для ряда вакцин по этическим или иным причинам невозможно проведение плацебо-контролируемых исследований с участием невакцинированных добровольцев в контрольной группе. В частности, доступность и широкое распространение эффективных вакцин в районах,

эндемичных по японскому энцефалиту (ЯЭ), делает неэтичным проведение исследований протективной эффективности, в которых сравнивают группу, получившую новую вакцину против ЯЭ, с невакцинированной группой. Кроме того, использование доступных вакцин против ЯЭ снизило частоту клинических инфекций до такой степени, что исследование с достаточной статистической мощностью для оценки относительной протективности новой вакцины по сравнению с зарегистрированной вакциной против ЯЭ потребует неосуществимо больших размеров выборки⁶². В идеале программа клинической разработки должна оценивать безопасность и иммуногенность новой вакцины в когортах населения, проживающего в неэндемичных, эндемичных и гиперэндемичных районах, с включением субъектов без ранее существовавшего иммунитета и субъектов с различной степенью предсуществующего иммунитета (естественного или вакцинального) к ЯЭ. В эндемичных и гиперэндемичных районах значительная часть жителей могла быть вакцинирована против ЯЭ в прошлом. Поэтому целесообразно оценить способность новой вакцины бустировать специфический иммунитет у людей, ранее вакцинированных другими типами вакцин против ЯЭ. Дизайн и место проведения КИ должны учитывать наличие перекрестного иммунитета между флавивирусами, что может влиять на уровни антител к вирусу ЯЭ до и после вакцинации⁶³.

При проведении исследований эффективности вакцин необходимо учитывать иммунный статус исследуемой популяции. Например, при проведении КИ вакцины для профилактики ЯЭ рекомендуется на первом этапе в исследование включить серонегативных добровольцев (с уровнем титров, установленным в тесте нейтрализации уменьшения бляшек (plaque reduction neutralization test, PRNT), $PRNT_{50} < 1:10$)⁶⁴. В этой популяции наиболее подходящим первичным параметром для оценки иммунного ответа будет доля субъектов с уровнем поствакцинальных титров $PRNT_{50} \geq 1:10$ (сероконверсия). Другими обязательными параметрами оценки иммунного ответа будут следующие: увеличение титров антител после последовательных доз вакцины, значение среднего геометрического титров антител и обратная кумулятивная кривая распределения титров. Важно учитывать вариабельность иммунного ответа между субъектами.

⁶⁰ Note for guidance on the development of vaccinia virus-based vaccines against smallpox (CPMP/1100/02). EMA; 2002.

⁶¹ Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004. WHO; 2017.

⁶² Recommendations for Japanese encephalitis vaccine (inactivated) for human use, Annex 1, TRS No 963. WHO; 2011.

⁶³ Там же.

⁶⁴ Там же.

В эндемичных районах важно получить данные о безопасности и иммуногенности новой вакцины против ЯЭ у изначально серопозитивных лиц. В данной когорте первичная оценка иммунного ответа на вакцинацию обычно основывается на значительном повышении (по крайней мере, четырехкратном) титра антител после одной или нескольких вакцинаций. После завершения первичного курса вакцинации важно запланировать оценку продолжительности антительного ответа. Как правило, участники КИ должны наблюдаться от 2 до 5 лет после завершения курса первичной вакцинации⁶⁵.

Отдельным важным аспектом проведения КИ вакцинных препаратов является участие беременных женщин. Иммунизация женщин во время беременности может предотвратить развитие инфекции у матери, а в некоторых случаях и у ребенка в течение ограниченного постнатального периода за счет плацентарного переноса материнских антител (например, в случае применения вакцин против гриппа, коклюша и столбняка). В других случаях иммунизация женщин во время беременности позволяет предотвратить развитие заболевания у ребенка, а не матери (например, вакцина против респираторно-синцитиального вируса). Также иммунизация во время беременности может предотвратить инфицирование матери и таким образом защитить плод от последствий инфицирования внутриутробно [2, 3].

Перед проведением исследований с участием беременных женщин необходимо получить данные по безопасности и иммуногенности в процессе КИ, проведенных с участием небеременных женщин детородного возраста⁶⁶. Планируемые дозы в КИ должны основываться на данных, полученных в популяции небеременных, но может потребоваться корректировка дозы или режима введения в случае, если результаты исследования свидетельствуют о влиянии беременности на иммунный ответ. Исследования должны включать измерение уровней антител в образцах пуповинной крови, взятых при родах. Количество полученных образцов должно быть достаточным для оценки индивидуальной изменчивости. Дополнительные исследования могут включать сбор пуповинной крови в период между вакцинацией матери и родами. Должно быть показано, что уровни антител в пуповинной крови у детей,

рожденных от вакцинированных матерей, получивших окончательную обоснованную дозу вакцины, должны быть выше, чем у детей, рожденных от невакцинированных матерей.

При проведении КИ вакцин на основе вирусов с высокой мутагенностью необходимо продемонстрировать эффективность в отношении близкородственных вакцинным «диких» штаммов. Так, для вакцин против гриппа рекомендуется включение данной оценки в качестве вторичной конечной точки эффективности⁶⁷. Если исследования проводятся в сезон, когда рекомендуемые вакцинные штаммы не соответствуют преобладающим циркулирующим штаммам, это может повлиять на оценку эффективности вакцины, основанную на рекомендованной первичной конечной точке. В таком случае определение эффективности вакцины в отношении случаев гриппа, вызванных совпадающими штаммами, будет играть значительную роль при оценке общей потенциальной пользы вакцины (при условии, что случаев болезни, вызванных близкородственными штаммами, будет достаточно для проведения указанной оценки). При определении других вторичных конечных точек должны быть включены следующие: случаи смертельных исходов, госпитализаций, появления гриппоподобных симптомов, все случаи грипп-ассоциированной пневмонии и среднего отита (у детей)⁶⁸.

Использование показателя иммуногенности для оценки эффективности вакцин против вирусных инфекций

При проведении клинических исследований вакцин в тех случаях, когда имеется обоснованный иммунный коррелят защиты, он может быть использован в качестве суррогатного маркера эффективности.

Согласно данным проведенных исследований вакцины против полиомиелита титр сывороточных нейтрализующих антител 1:4–1:8 считается маркером защиты от полиовируса⁶⁹. Поэтому для живых оральных вакцин против полиомиелита сероконверсия для серонегативных добровольцев определяется при титре антител выше порогового, а для серопозитивных — при повышении титра в четыре раза [4]. В популяциях с высокими титрами антител сероконверсия

⁶⁵ Там же.

⁶⁶ WHO consultation on influenza vaccines for pregnant and lactating women: clinical data requirements for product labelling. Geneva, Switzerland, 15–16 July 2014. Meeting report. WHO; 2014.

⁶⁷ Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module (EMA/CHMP/VWP/457259/2014). EMA; 2016.

⁶⁸ Там же.

⁶⁹ Plotkin SA, Vidor E. Poliovirus vaccine-inactivated. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. Vaccines. 5th ed. London: Elsevier; 2008.

оценивается как изменение от уровня ниже самого высокого исследованного разведения (<8192) до уровня выше самого высокого исследованного разведения (>8192)⁷⁰. В то же время для инактивированных полиомиелитных вакцин маркером клинической защиты от полиомиелита считается титр сывороточных нейтрализующих антител $\geq 1:8$ [5]. Соответственно для серонегативных лиц сероконверсия определяется при повышении титра антител $\geq 1:8$, а для серопозитивных — как более чем четырехкратное повышение титров антител после вакцинации. Важно отметить, что метод оценки уровня сывороточных нейтрализующих антител должен быть стандартизован в соответствии с требованиями руководства ВОЗ⁷¹. Следует подчеркнуть, что снижение антительного ответа с течением времени не должно интерпретироваться как указание для введения бустерной дозы, поскольку имеющиеся данные свидетельствуют о том, что сформировавшейся иммунологической памяти может быть достаточно для защиты от полиомиелита [6].

Для ряда вакцин, которые широко и длительно применяются в практике здравоохранения, рекомендуется проведение сравнительных исследований с уже зарегистрированной вакциной. В частности, это относится к исследованиям вакцин против гепатита В. Известно, что защитная эффективность вакцин против гепатита В напрямую связана с индукцией анти-HBs-антител — уровень концентрации анти-HBs-антител более 10 мМЕ обычно считается маркером защиты от гепатита В⁷². При проведении КИ необходимо установить процент серонегативных лиц, у которых этот уровень антител достигается примерно через 4 недели после введения вакцины. В плане КИ должна быть обоснована граница не меньшей эффективности для сравнения процентной доли субъектов с концентрацией анти-HBs-антител более 10 мМЕ⁷³. При этом иммунный коррелят защиты вакцины для профилактики гепатита В не установлен.

Для вакцин против желтой лихорадки на основе вируса штамма 17D рекомендуется проведение исследований с целью оценки безопасности и иммуногенности вакцины-кандидата

в сравнении как минимум с одной зарегистрированной вакциной⁷⁴. Определение иммуногенности должно основываться на оценке уровня нейтрализующих антител, которые считаются основой иммунной защиты, хотя точный механизм формирования иммунитета неизвестен [7, 8]. Сероконверсию определяют либо как четырехкратное повышение уровня нейтрализующих антител, либо как индукцию формирования нейтрализующих антител у ранее серонегативных субъектов. Эти два критерия желательно рассматривать отдельно при сравнении новой вакцины и зарегистрированной вакцины, используемой в качестве контроля⁷⁵.

В случае вакцин против гепатита Е (ВГЕ) иммунный коррелят защиты не определен. Для вакцин против ВГЕ рекомендуется проведение связующих исследований вакцины-кандидата в сравнении зарегистрированной вакциной, эффективность которой доказана⁷⁶. Однако такой подход возможен только в том случае, если обе вакцины содержат один и тот же антиген. Кроме того, демонстрация эффективности первой зарегистрированной вакцины была ограничена генотипами 1 и 4 ВГЕ, и неизвестно, может ли защитный иммунный ответ различаться в зависимости от генотипа. При этом исходный уровень серопозитивности в популяции, в которой была продемонстрирована эффективность, оценивался в 47% (на основе данных менее чем одной десятой от общего числа участников рандомизированного исследования) [9]. Нельзя предполагать, что данная оценка эффективности вакцины будет применима к популяциям с другими уровнями серопозитивности до вакцинации⁷⁷.

В отношении вакцины для профилактики энтеровируса на основе инактивированного вируса штамма EV71 иммунный коррелят защиты или суррогатный маркер защиты пока не определены. Хотя результаты КИ иммуногенности предполагают, что титр нейтрализующих антител от 1:16 до 1:32 может быть связан с формированием иммунной защиты, дальнейший анализ показал, что для защиты могут потребоваться значительно более высокие уровни нейтрализующих антител [10]⁷⁸.

⁷⁰ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (oral, live, attenuated), Annex 2, TRS No 980. WHO; 2014.

⁷¹ Manual for the virological investigation of polio. Geneva: WHO; 1997.

⁷² Hepatitis B vaccines: WHO position paper. Weekly Epidemiological Record. 2009;84(40):405–20.

⁷³ Guideline on the choice of the non-inferiority margin (EMA/CPMP/EWP/2158/99). EMA; 2005.

⁷⁴ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines, Annex 5, TRS No 978. WHO; 2013.

⁷⁵ Там же.

⁷⁶ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant Hepatitis E vaccines, Annex 2, TRS No 1016. WHO; 2019.

⁷⁷ Там же.

⁷⁸ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines (inactivated), Annex 3, TRS No 1030. WHO; 2021.

Для отдельных видов вакцин с неустановленными иммунными коррелятами защиты, но в отношении которых в силу этических, географических или других причин невозможно проведение традиционного контролируемого исследования эффективности, допускается проведение исследований с использованием показателей иммуногенности. В частности, при проведении исследований вакцин для профилактики бешенства включение контрольной группы с введением плацебо неэтично. Поэтому в данной ситуации основным критерием эффективности является сравнение значений иммуногенности при иммунизации новой вакциной с известными данными об иммуногенности⁷⁹. Ранее полученные результаты долгосрочных КИ показали, что вакцины, отвечающие минимальным требованиям ВОЗ по эффективности в 2,5 МЕ на дозу, обеспечивают адекватную иммуногенность и защиту. Концентрация антител не менее 0,5 МЕ/мл на 14, 28 или 30 сут после первичной вакцинации обычно считается адекватной. В руководстве ВОЗ по антирабическим вакцинам рекомендуется использовать концентрацию нейтрализующих антител в качестве предиктора клинической эффективности⁸⁰. Тем не менее важным является получение информации о протективности вакцин при их фактическом применении. Первоначальные исследования иммуногенности проводят на ранее не вакцинированных серонегативных здоровых взрослых добровольцах. После подтверждения иммуногенности в этой группе, необходимо провести дальнейшие исследования, чтобы продемонстрировать иммуногенность в целевых группах населения в соответствии с предполагаемым использованием⁸¹.

Исследования безопасности вакцин против вирусных инфекций

Все клинические исследования, проводимые до или после регистрации вакцин, должны включать исследования безопасности. Оценка безопасности может быть основной, вспомогательной или вторичной целью КИ. В случае если оценка безопасности является основной целью КИ, обычно первичный анализ основывается на конкретной конечной точке безопасности (например, частота определенного НЯ или ча-

стота НЯ, которые могут быть частью представляющего интерес клинического синдрома)⁸².

Если оценка безопасности является вторичной целью исследования, то такие КИ обычно не имеют достаточной статистической мощности для обоснованного анализа таких конечных точек, как частота всех или конкретных НЯ. Описательные сравнительные статистические данные обычно используются для выявления любых различий в частоте НЯ между группами кандидатной и референтной вакцин. Если проводится статистический анализ частоты НЯ, то он должен быть описан в протоколе КИ. Вероятность того, что НЯ, более частые в исследуемой группе, по сравнению с зарегистрированной вакциной, могут иметь причинно-следственную связь с кандидатной вакциной, следует принимать во внимание при принятии решения о необходимости дальнейших КИ до или после регистрации для изучения и количественной оценки потенциальных рисков⁸³.

Для оценки степени тяжести НЯ необходимо собрать достаточные данные для каждого ожидаемого проявления и симптома НЯ. При этом следует использовать стандартные шкалы оценок (в том числе шкалы, привязанные к возрасту). При этом могут быть использованы критерии, представленные в соответствующем руководстве FDA⁸⁴. Одни и те же шкалы оценки должны применяться на протяжении всей программы КИ⁸⁵.

Общий размер выборки участников для включения в предрегистрационные КИ с целью оценки безопасности должен согласовываться с регуляторным органом. Невозможно заранее определить минимальное количество вакцинированных субъектов (обычно ограниченное числом лиц, получивших все дозы вакцины в соответствии со схемой вакцинации в определенной возрастной группе), которое можно прогнозировать во всех исследованиях разработки вакцин. Важным фактором является достаточный размер общей выборки для точной оценки частоты НЯ. Например, включение 3000 субъектов в исследование обеспечивает 95% вероятность наблюдения одного случая НЯ, возникающего в среднем у 1 из 1000 субъектов. Включение в исследование менее 3000 субъектов может

⁷⁹ Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs, Annex 2, TRS No 941. WHO; 2007.

⁸⁰ Там же.

⁸¹ Там же.

⁸² Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004. WHO; 2017.

⁸³ Там же.

⁸⁴ Toxicity grading scale for healthy adult and adolescent volunteers enrolled in preventive vaccine clinical trials. Guidance for Industry. FDA; 2007.

⁸⁵ Там же.

быть приемлемым, если новая вакцина-кандидат содержит только антигенные компоненты, которые уже зарегистрированы в других вакцинах и для которых имеется значительный опыт рутинного применения.

В руководстве ЕМА по доклинической и клинической оценке вакцин против гриппа⁸⁶ указано, что в каждой изучаемой возрастной группе необходимо предусмотреть соответствующую стратификацию. Например, если все исследования ограничиваются только группой детей, то общий размер выборки участников для включения в предрегистрационные КИ с целью оценки безопасности должен составлять по крайней мере 3000 субъектов, при этом каждая детская возрастная группа (дети грудного возраста и младенцы, дети в возрасте 2–8 и 9–11 лет, подростки 12–14 и 15–17 лет) должна включать не менее 300 субъектов при условии отсутствия непредвиденных нежелательных реакций в детских возрастных группах. Если в исследование включены как взрослые, так и дети, то общий размер выборки должен составлять 3000 взрослых плюс по 300 субъектов из каждой детской возрастной группы: младенцы, дети и подростки (всего около 900 детей) при условии отсутствия непредвиденных серьезных нежелательных реакций в детских возрастных группах⁸⁷.

Для изучения отдельных типов вакцин (например, новых вакцин или новых адъювантов) или конкретных условий их применения (например, в случае уязвимой популяции с высоким риском возникновения определенных НЯ) может потребоваться включение в исследование безопасности более 3000 субъектов. Если существует риск возникновения определенного НЯ, а имеющиеся данные по безопасности не позволяют провести четкую оценку риска, то может потребоваться проведение дополнительных исследований безопасности для более точной оценки риска.

Ожидаемые признаки и симптомы НЯ обычно регистрируются ежедневно в течение как минимум 4–7 сут после каждой дозы введенной вакцины. Более длительные периоды (например, 10–14 сут) могут использоваться при оценке безопасности определенных вакцин, например на основе репликативно-компетентных вирусов. Спонтанные сообщения о НЯ обычно собираются за весь период между введениями вакцины, а также примерно в течение 4 нед.

после введения последней дозы. Сообщения о серьезных НЯ и любых ожидаемых НЯ, представляющих особый интерес, должны собираться у всех субъектов исследования в течение не менее 6 мес. после введения последней дозы. Для вакцин, содержащих новые адъюванты, рекомендуется последующее наблюдение в течение как минимум 12 мес. после последнего введения для сбора данных о любых аутоиммунных заболеваниях или других иммуноопосредованных НЯ⁸⁸.

Для оценки безопасности некоторых вакцин существуют особые требования по расширенному фармаконадзору. Это касается вакцин против гриппа, для которых необходима ежегодная замена штамма в вакцинах в связи с тем, что вирус гриппа обладает высокой мутагенной активностью⁸⁹. В руководстве ЕМА по оценке безопасности вакцин против гриппа представлены требования к ежегодному расширенному надзору за безопасностью, применяемому с целью быстрого обнаружения любого увеличения (местной или системной) реактогенности вакцин против гриппа, а также иного непредвиденного нежелательного иммунного ответа, которые могут возникнуть вследствие значительных изменений в их производственном процессе. В руководстве изложены общие принципы для улучшения непрерывного мониторинга в отношении вакцин против гриппа, которые позволят в короткие сроки обнаруживать, оценивать и реагировать на новые сигналы по безопасности, которые могут появиться во время прививочных кампаний. Учитывая особенности эпидемиологии гриппа, ВОЗ было подготовлено руководство, регламентирующее проведение наблюдательных исследований в оценке программ вакцинации против гриппа в пострегистрационном периоде⁹⁰.

При оценке безопасности вакцин важным представляется учет особых случаев побочных реакций. Так, при исследовании безопасности реассортантной ротавирусной вакцины в пострегистрационный период в ЕС была выявлена связь вакцинации с развитием инвагинации кишечника — редким серьезным побочным эффектом после введения вакцины младенцам [11]. В связи с этим рекомендуется проведение наблюдений за возможностью развития инвагинации в течение 30 сут после введения каждой дозы вакцины. Однако даже очень крупные

⁸⁶ Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module (EMA/CHMP/VWP/457259/2014). EMA; 2016.

⁸⁷ Там же.

⁸⁸ Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, Annex 9, TRS No. 1004. WHO; 2017.

⁸⁹ Interim guidance on enhanced safety surveillance for seasonal influenza vaccines in the EU (EMA/PRAC/222346/2014). EMA; 2014.

⁹⁰ Evaluation of influenza vaccine effectiveness: a guide to the design and interpretation of observational studies. WHO; 2017.

предварительные исследования (например, с участием 70000 младенцев) не могут исключить связь вакцинации с инвагинацией. Если пострегистрационные исследования, проводимые в настоящее время, выявят возрастной риск вакциноассоциированной инвагинации кишечника, могут потребоваться отдельные указания по введению первой дозы вакцины в зависимости от возраста ребенка [12]. В связи с этим в программы КИ новых ротавирусных вакцин должна быть включена оценка фоновой частоты инвагинаций. Однако получить точные данные о фоновой заболеваемости в данных исследованиях может оказаться невозможным. Поэтому расчет выборки для оценки безопасности должен учитывать степень риска вакциноассоциированной инвагинации, которую возможно оценить в исследовании. При должном обосновании размер выборки для предрегистрационных КИ новых ротавирусных вакцин может быть менее 70000 субъектов⁹¹.

Для некоторых вакцин существует риск возникновения побочных реакций, ассоциированных с иммунизацией. Так, в случае иммунизации новой вакциной для профилактики желтой лихорадки необходимо в течение нескольких лет осуществлять мониторинг безопасности, в первую очередь для выявления ассоциированных с вакциной неврологических заболеваний или заболеваний внутренних органов [13]⁹².

Для ряда противовирусных вакцин существует вероятность того, что вырабатываемые в ответ на вакцинацию специфические антитела могут усиливать инфицирование клеток организма вирусом дикого типа и приводить к повышенному риску развития тяжелой формы заболевания после вакцинации [14, 15]. Чтобы оценить данный риск, определения общего количества поствакцинальных антител может быть недостаточно и необходимо проведение специальных дополнительных исследований. Известно, что при применении вакцины против лихорадки Денге существует риск развития тяжелой формы (включая геморрагические проявления и системный шок) при естественном инфицировании. Поэтому мониторинг и обследование всех субъектов, у которых развиваются симптомы, потенциально указывающие на развитие лихорадки Денге, во время предрегистрационных

исследований в эндемичных регионах должны обеспечить предварительную оценку этого риска. Если риск не выявлен, необходимо обеспечить адекватное наблюдение за субъектами исследования вместе с дальнейшей оценкой риска в пострегистрационном периоде. Общий размер выборки участников для включения в предрегистрационные КИ вакцин для профилактики лихорадки Денге должен быть достаточным для выявления возможных непредвиденных побочных реакций и, желательно, НЯ, встречающихся с частотой более 1:1000⁹³.

Ранее проведенные исследования вакцин против респираторно-синцитиального вируса (РСВ) показали, что у младенцев, которые ранее не были инфицированы РСВ, имеется риск развития вакцинно-ассоциированного усиления респираторного заболевания. Поэтому особенно важно, чтобы в предрегистрационные КИ безопасности было включено большое количество младенцев, ранее не встречавшихся с РСВ. Рекомендуются, чтобы продолжительность последующего наблюдения за РСВ-инфекцией во всех исследованиях, включающих субъектов, ранее не контактировавших с РСВ, была достаточной, чтобы максимизировать вероятность того, что субъекты встретятся с вирусом дикого типа. Продолжительность такого наблюдения должна определяться на основе данных об инфицировании РСВ с учетом возраста в регионе, в котором проводится исследование. Оценка риска в любом КИ, в котором участвуют серонегативные субъекты, должна быть завершена до начала иного КИ, в котором примут участие РСВ-серонегативные добровольцы⁹⁴.

Для некоторых вирусных вакцин необходимо проведение отдельных исследований по оценке вероятности инфицирования вакцинированными окружающими. В частности, при исследовании вакцин для профилактики ротавирусной инфекции должно проводиться определение количества и продолжительности выделения вакцинного вируса (если применимо, с учетом серотипа) вакцинируемыми. Необходимо оценить возможность передачи вакцинных штаммов невакцинированным людям во время КИ безопасности и эффективности. Если вакцинный вирус выделяется в количествах, достаточных для того, чтобы сделать возможной такую

⁹¹ Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral), Annex 3, TRS No. 941. WHO; 2007.

⁹² Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines, Annex 5, TRS No 978. WHO; 2013.

Guidelines for national authorities on quality assurance for biological products. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-second report. Geneva: WHO; 1992.

⁹³ Guidelines on the quality, safety and efficacy of dengue tetravalent vaccines (live, attenuated), Annex 2, TRS No 979. WHO; 2013.

⁹⁴ Guidelines on the quality, safety and efficacy of respiratory syncytial virus vaccines, Annex 2, TRS No 1024. WHO; 2020.

передачу, и/или если зафиксирована передача вакцинного вируса, то необходимы исследования вероятности реверсии вакцинного вируса к дикому типу и вероятности его реассортации с ротавирусами дикого типа⁹⁵.

Заключение

Проведенный анализ, касающийся разных сторон проведения клинических исследований вакцин на основе регламентирующих документов ВОЗ и ведущих мировых регуляторных органов, показал, что подходы к клиническим исследованиям в целом являются сходными и могут рассматриваться как взаимодополняющие, что имеет важное значение при разработке новых гармонизированных национальных или региональных руководств.

В руководствах по клиническим исследованиям вакцин особое внимание уделено вопросам их иммуногенности. При наличии иммунного коррелята защиты или хорошо охарактеризованного уровня иммуногенности допускается проведение сравнительных исследований иммуногенности новой вакцины с аналогичной, уже

зарегистрированной вакциной. Всесторонняя оценка иммуногенности вакцин позволяет проведение связующих исследований с целью расширения показаний на другие популяции вакцинируемых (например, по возрасту). Существенной проблемой для оценки эффективности является отсутствие обоснованных иммунных коррелятов защиты для большинства инфекций.

Для оценки безопасности в клинических исследованиях минимальный объем выборки должен включать не менее 3000 субъектов. При проведении исследований безопасности для некоторых вакцин необходимо оценивать риск усиления инфекционного заболевания, связанного с введением вакцины, и развития вакциноиндуцированных заболеваний.

Представленный в статье анализ нормативных документов по клиническим исследованиям безопасности, иммуногенности и эффективности вакцин может использоваться в ходе подготовки гармонизированных рекомендаций по отдельным группам вакцин в рамках Евразийского экономического союза.

Литература/References

- Plotkin SA, Gilbert PB. Nomenclature for immune correlates of protection after vaccination. *Clin Infect Dis*. 2012;54(11):1615–7. <https://doi.org/10.1093/cid/cis238>
- Arora M, Lakshmi R. Vaccines – safety in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2021;76:23–40. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2021.02.002>
- Sebghati M, Khalil A. Uptake of vaccination in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2021;76:53–65. <https://doi.org/10.1016%2Fj.bpobgyn.2021.03.007>
- Cohen-Abbo A, Culley BS, Reed GW, Sannella EC, Mace RL, Robertson SE, Wright PF. Seroresponse to trivalent oral poliovirus vaccine as a function of dosage interval. *Pediatr Infect Dis J*. 1995;14(2):100–6. <https://doi.org/10.1097/00006454-199502000-00004>
- Nathanson N. David Bodian's contribution to the development of poliovirus vaccine. *Am J Epidemiol*. 2005;161(3):207–12. <https://doi.org/10.1093/aje/kwi033>
- Salk J, Salk D. Control of influenza and poliomyelitis with killed virus vaccines. *Science*. 1977;195(4281):834–47. <https://doi.org/10.1126/science.320661>
- Mason RA, Tauraso NM, Spertzel RO, Ginn RK. Yellow fever vaccine: direct challenge of monkeys given graded doses of 17D vaccine. *Appl Microbiol*. 1973;25(4):539–44. <https://doi.org/10.1128/am.25.4.539-544.1973>
- Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med*. 2008;205(13):3119–31. <https://doi.org/10.1084/jem.20082292>
- Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9744):895–902. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)61030-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)61030-6)
- Zhang H, An D, Liu W, Mao Q, Jin J, Xu L, et al. Analysis of cross-reactive neutralizing antibodies in human HFMD serum with an EV71 pseudovirus-based assay. *PLoS One*. 2014;9(6):e100545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100545>
- Дармостукова МА, Снегирева ИИ, Вельц НЮ, Казаков АС, Аляутдин РН. Международный мониторинг безопасности вакцин. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2019;7(1):6–14. Darmostukova MA, Snegireva II, Velts NYu, Kazakov AS, Alyautdin RN. Vaccine safety international monitoring. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2019;7(1):6–14 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2019-7-1-6-14>
- Simonsen L, Viboud C, Elixhauser A, Taylor RJ, Kapikian AZ. More on RotaShield and intussusception: the role of age at the time of vaccination. *J Infect Dis*. 2005;192(Suppl 1):S36–43. <https://doi.org/10.1086/431512>
- Gershman MD, Staples JE, Bentsi-Enchill AD, Breugelmans JG, Brito GS, Camacho LA, et al. Viscerotropic

⁹⁵ Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral), Annex 3, TRS No. 941. WHO; 2007.

- disease: case definition and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine*. 2012;30(33):5038–58.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.067>
14. Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, Duehr J, Frere JJ, Brown JA, et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. *Science*. 2017;356(6334):175–180.
<https://doi.org/10.1126/science.aal4365>
15. Shukla R, Ramasamy V, Shanmugam RK, Ahuja R, Khanna N. Antibody-dependent enhancement: a challenge for developing a safe dengue vaccine. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:572681.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572681>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Солдатов** — дизайн аналитического исследования, анализ данных литературы, написание текста рукописи; **Д.В. Горенков** — критический пересмотр содержания и доработка текста рукописи; **Ж.И. Авдеева** — 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. **A.A. Soldatov** designed the analytical research, analysed literature data, and drafted the manuscript. **D.V. Gorenkov** critically revised and finalised the manuscript. **Zh.I. Avdeeva** 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

Солдатов Александр Алексеевич, д-р мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

Soldatov@expmed.ru

Горенков Дмитрий Витальевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>

Gorenkov@expmed.ru

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9377-1378>

Avdeeva@expmed.ru

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

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

Merkulov@expmed.ru

Aleksandr A. Soldatov, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

Soldatov@expmed.ru

Dmitry V. Gorenkov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>

Gorenkov@expmed.ru

Zhanna I. Avdeeva, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9377-1378>

Avdeeva@expmed.ru

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

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

Merkulov@expmed.ru

Поступила 30.06.2023

После доработки 17.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Received 30 June 2023

Revised 17 November 2023

Accepted 24 November 2023

УДК 578.74:615.322

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-530-543>

Научная статья | Scientific article



Оценка гуморального иммунного ответа экспериментальных животных на введение рекомбинантного эктодомена поверхностного S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 с ИСКОМ-адъювантом

В.А. Евсеенко , А.В. Зайковская, А.С. Гудымо, О.С. Таранов, С.Е. Олькин, А.Р. Иматдинов, Е.Ю. Прудникова, Н.В. Данильченко, И.С. Шульгина, М.Н. Косенко, Е.И. Даниленко, С.А. Пьянков, А.Б. Рыжиков

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, АБК, к. 12а, Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

✉ Евсеенко Василий Александрович; evseenko_va@vector.nsc.ru

Резюме

Актуальность. Использование рекомбинантных антигенов в вакцинах ограничено низкой иммуногенностью таких препаратов. Однако вакцина от COVID-19 (Nuvaxovid), содержащая не только рекомбинантный антиген гликопротеина Spike вируса SARS-CoV-2, но и вирусоподобный иммуностимулирующий комплекс ИСКОМ-адъювант, индуцирует выработку протективного вируснейтрализующего ответа. Исследование разработанного в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора ИСКОМ-адъюванта «Матрикс-В», играющего ключевую роль в формировании вируснейтрализующего иммунного ответа, позволит широко использовать рекомбинантные антигены в комплексе с адъювантом для разработки и производства новых отечественных вакцин.

Цель. Оценка гуморального иммунного ответа на внутримышечное введение животным комплекса рекомбинантного антигена RBD поверхностного Spike-гликопротеина SARS-CoV-2 (штамм «Ухань») и полученных вирусоподобных ИСКОМ с сапонином *Quilajia saponaria*.

Материалы и методы. ИСКОМ-адъювант «Матрикс-В» получали по разработанной в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора технологии с применением метода тангенциальной фильтрации в системе Sartorius VivaFlow. Оценивали концентрацию сапонинов и детергента в препарате методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Получен рекомбинантный антиген RBD SARS-CoV-2, проведено электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры комплекса «ИСКОМ – антиген». Комплексами «ИСКОМ – антиген» внутримышечно двукратно (через 14 сут) иммунизировали 25 (5 групп) мышей линии Balb/c и 15 (3 группы) разнополых аутбредных морских свинок. Образцы сыворотки крови исследовали в реакции нейтрализации и методом ИФА с антигенами 8 штаммов вируса SARS-CoV-2 (Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Результаты обрабатывались статистически в программе Statistica 10.

Результаты. Двукратное введение антигена RBD SARS-CoV-2 морским свинкам (по 1 мкг) и мышам (по 7 мкг) не приводило в реакции нейтрализации к достоверному формированию вируснейтрализующего ответа. В реакции нейтрализации со штаммом «Ухань» средние геометрические значения титров антител сыворотки крови животных, двукратно иммунизированных комплексом RBD SARS-CoV-2 (мыши – по 7 мкг, морские свинки – по 1 мкг) + Матрикс-В (по 25 мкг), были в пределах 1:83–1:178 и 1:174–1:587 соответственно.

© В.А. Евсеенко, А.В. Зайковская, А.С. Гудымо, О.С. Таранов, С.Е. Олькин, А.Р. Иматдинов, Е.Ю. Прудникова, Н.В. Данильченко, И.С. Шульгина, М.Н. Косенко, Е.И. Даниленко, С.А. Пьянков, А.Б. Рыжиков, 2023

В группах животных, однократно иммунизированных комплексом (1 мкг и 7 мкг антигена + Матрикс-В) антитела определялись в реакции нейтрализации (и/или ИФА) только в единичных случаях. В опытах ИФА наиболее интенсивный ответ (на антиген штамма Delta) получен после двукратной иммунизации комплексом Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг). Ответ на двукратное введение антигена Ecto-S-Wuhan (1 мкг) без ИСКОМ-адьюванта ($p=0,95$) не отличался от отрицательного контроля (значение титра менее 1:100). Двукратное введение мышам антигена RBD SARS-CoV-2 (по 7 мкг) приводило к формированию антител (значения титров 1:248–1:1477).

Выводы. Комплекс рекомбинантного антигена RBD SARS-CoV-2 и адьюванта «Матрикс-В» при двукратном внутримышечном введении индуцирует выработку вируснейтрализующих антител. Предложенный подход перспективен для разработки иммунобиологических препаратов профилактики и терапии широкого спектра инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы; ИСКОМ-адьювант; сапонин; вакцина от COVID-19; иммунизация; SARS-CoV-2; рекомбинантный антиген; гликопротеин Spike; рекомбинантный эктодомен

Для цитирования: Евсеенко В.А., Зайковская А.В., Гудымо А.С., Таранов О.С., Олькин С.Е., Иматдинов А.Р., Прудникова Е.Ю., Данильченко Н.В., Шульгина И.С., Косенко М.Н., Даниленко Е.И., Пьянков С.А., Рыжиков А.Б. Оценка гуморального иммунного ответа экспериментальных животных на введение рекомбинантного эктодомена поверхностного S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 с ИСКОМ-адьювантом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):530–543. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-530-543>

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на проведение прикладных научных исследований (ГЗ 28/21).

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

Evaluation of humoral immune responses of experimental animals to the recombinant SARS-CoV-2 spike ectodomain with the ISCOM adjuvant

Vasily A. Evseenko✉, Anna V. Zaykovskaya, Andrei S. Gudymo, Oleg S. Taranov, Sergei E. Olkin, Almaz R. Imatdinov, Elena Yu. Prudnikova, Natalia V. Danilchenko, Irina S. Shulgina, Maksim N. Kosenko, Elena I. Danilenko, Stepan A. Pyankov, Aleksandr B. Ryzhikov

State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", 12/A ABK, Koltsovo, Novosibirsk Region 630559, Russian Federation

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

Abstract

Scientific relevance. The use of recombinant antigens in vaccine production is limited because vaccines based on such antigens tend to have low immunogenicity. However, a COVID-19 vaccine that combines recombinant SARS-CoV-2 spike glycoprotein as its antigen and virus-like immune-stimulating complexes (ISCOMs) as its adjuvant (Nuvaxovid) induces a protective virus-neutralising response. The State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" (hereinafter, Vector) has developed the ISCOM adjuvant Matrix-V, which plays a key role in inducing virus-neutralising antibodies. Studying Matrix-V will provide for the wide use of recombinant antigens combined with this adjuvant in the development and production of novel Russian vaccines.

Aim. This study aimed to evaluate the humoral immune responses of experimental animals to intramuscular injections of a complex combining the recombinant Wuhan-type SARS-CoV-2 spike RBD antigen and the virus-like ISCOM adjuvant containing *Quillaja saponaria* saponins.

Materials and methods. The Matrix-V ISCOM adjuvant was produced using Vector's proprietary technology, which involves cross-flow filtration through Sartorius VivaFlow cassettes. To determine the saponin and residual detergent concentrations in Matrix-V, the authors conducted high-performance liquid chromatography. Having produced the recombinant SARS-CoV-2 RBD antigen, the authors used electron microscopy to analyse the ultrastructure of the ISCOM-antigen complex. In the study of the ISCOM-antigen complex, 25 female Balb/c mice (5 groups) and 15 male and female outbred guinea pigs (3 groups) received two intramuscular injections with a 14-day interval. Serum tests relied on virus neutralisation (VN) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods and used antigens of 8 SARS-CoV-2 variants (State Collection of Viruses and Rickettsia, Vector). The authors used Statistica 10 to analyse the results.

Results. Two injections of the SARS-CoV-2 RBD antigen (mice: 7 µg, guinea pigs: 1 µg) alone did not induce statistically significant virus-neutralising antibody responses, as shown by the VN results. Two injections of the SARS-CoV-2 RBD antigen (mice: 7 µg, guinea pigs: 1 µg) adjuvanted with Matrix-V (25 µg) resulted in geometric mean antibody titres of 1:83–1:178 (mice) and 1:174–1:587 (guinea pigs) in the VN tests with the Wuhan variant. One injection of the antigen (1 µg or 7 µg) with Matrix-V (25 µg) induced antibodies only in individual cases, as demonstrated by the VN and/or ELISA results. The most intensive immune response was observed in ELISA tests with the Delta variant after two injections of the Ecto-S-Wuhan (1 µg) and Matrix-V (25 µg) complex. Immune responses did not differ between the group that received two injections of the Ecto-S-Wuhan antigen (1 µg) without the ISCOM adjuvant and the negative control group (titres below 1:100; $p=0.95$). Two injections of the SARS-CoV-2 RBD antigen (7 µg) without the ISCOM adjuvant induced antibodies in mice (titres between 1:248 and 1:1477).

Conclusions. Two intramuscular injections of the complex containing the recombinant SARS-CoV-2 RBD antigen and the Matrix-V ISCOM adjuvant induce virus-neutralising antibodies. The approach proposed by the authors has the potential for use in the development of immunobiological medicinal products to prevent and treat a wide range of infectious diseases.

Keywords: virus-like immune-stimulating complex; ISCOM adjuvant; saponin; COVID-19 vaccine; immunisation; SARS-CoV-2; recombinant antigen; spike glycoprotein; recombinant ectodomain

For citation: Evseenko V.A., Zaykovskaya A.V., Gudymo A.S., Taranov O.S., Olkin S.E., Imatdinov A.R., Prudnikova E.Yu., Danilchenko N.V., Shulgina I.S., Kosenko M.N., Danilenko E.I., Pyankov S.A., Ryzhikov A.B. Evaluation of humoral immune responses of experimental animals to the recombinant SARS-CoV-2 spike ectodomain with the ISCOM adjuvant. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):530–543. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-530-543>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded applied research project No. ГЗ 28/21 of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

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

Введение

Использование новых генно-инженерных подходов, базирующихся на рекомбинантных белках, доказало свою эффективность при создании новых вакцин в борьбе как с пандемическими, так и с давно укоренившимися в человеческой популяции инфекциями. Ранее был получен иммуностимулирующий комплекс ИСКОМ-адъювант на основе сапонинов *Quillaja saponaria*, который индуцировал существенное усиление иммунного ответа на введение инактивированных антигенов вируса гриппа [1]. Препараты с аналогичными адъювантами широко применяются или находятся на финальных стадиях клинических исследований. Вакцина «NuvaXovid» (Novavax, США), состоящая из рекомбинантного Spike-белка (S-белок, спайк-белок) вируса SARS-CoV-2 и вирусоподобного ИСКОМ-адъюванта Matrix-M (Novavax, США),

показала высокую эффективность в отношении COVID-19 и широко применяется в мире [2]. Заслуживает внимания первая вакцина для профилактики малярии Mosquirix (GSK, Великобритания), одобренная ВОЗ в 2021 г., и противомаларийная вакцина R21/Matrix-M (University of Oxford, Великобритания), разрешенная к применению в Гане, Нигерии в 2023 г. Большие надежды возлагаются ВОЗ на противотуберкулезную вакцину M72 (адъювант AS01E, GSK, Великобритания). На завершающем этапе 3-й фазы клинических испытаний находится противогриппозная рекомбинантная квадριвалентная вакцина qNIV (Novavax, США). В России разработана и прошла клинические испытания I–II фаз противокоронавирусная вакцина «Бетувакс» («Бетувакс», Россия), которая представляет собой вирусоподобную сферическую частицу из природного материала, несущую на себе

фрагменты антигена коронавируса — фрагмента RBD-домена Spike-гликопротеина (S-гликопротеин, спайк-гликопротеин) вируса SARS-CoV-2 [3].

При использовании адъювантов вместе с рекомбинантными белками появляется ряд неоспоримых преимуществ. Отсутствует необходимость работы с вирусными или бактериальными патогенами, необходимы только антигены-мишени — нуклеотидные последовательности геномов для воссоздания антигена. Возникает возможность проектирования химерных белков, содержащих антигенно-значимые участки, характерные для различных серовариантов патогена. Отработаны универсальные технологии получения и очистки рекомбинантных белков, которые позволяют получать препараты с высокой фармакоэкономической эффективностью.

Цель работы — оценка гуморального иммунного ответа на внутримышечное введение животным комплекса рекомбинантного антигена RBD поверхностного Spike-гликопротеина SARS-CoV-2 (штамм «Ухань») и полученных вирусоподобных ИСКОМ с сапонами *Quillaja saponaria*.

Материалы и методы

Материалы

Культуральная среда DMEM/F12 + GlutaMAX (Gibco, США), фетальная бычья сыворотка (Gibco, США), амфотерицин В (Gibco, США). Набор биосенсоров: Anti-Penta-HIS (HIS1K) (Sartorius, Германия), Penta-His (Qiagen, Германия), VivaFlow

200 (Sartorius, Германия). Сорбенты: Profinity IMAC (Bio-Rad, США), Nuvia HP-Q (Bio-Rad, США). ПАВ лаурилсаркозинат натрия (Sodium Lauroyl Sarcosinate, Amerco кат. № 0719-500G, США). Холестерин (Cholesterol, PanReac AppliChem кат. № A0807, США), лецитин (Lecithin, PanReac AppliChem кат. № A0893, США), сапонины *Q. saponaria* (PanReac AppliChem, США), бета-пропиолактон (BPL) (Acros Organics, Бельгия).

Вирусы. Использованные в данной работе штаммы коронавируса SARS-CoV-2 (из эпидемических проб) из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора представлены в *таблице 1*.

Методы

Получение и очистка рекомбинантного эктодомена поверхностного S-гликопротеина SARS-CoV-2. Рекомбинантный S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2 (штамм «Ухань») — Ecto-S-Wuhan, получали с использованием оригинальной поликлональной клеточной линии-продуцента HEK293_SBW4G_FdT4 [Spike_2019-nCoV-FdT4-8xHis], несущего химерный ген, кодирующий эктодомен S-гликопротеина, а также бета-пропеллерный тримерный домен фибритина бактериофага T4 с С-концевой 8-гистидиновой меткой (His8-tag) под контролем промотора CAG. В качестве репортера экспрессии использовался eGFP. Клетки HEK293_SBW4G_FdT4 культивировали в среде DMEM/F12 + Glutamax, с добавле-

Таблица 1. Штаммы коронавируса SARS-CoV-2, использованные в работе (таблица составлена авторами по данным источника [4])

Table 1. SARS-CoV-2 variants used in this study (adapted by the authors from [4])

Название штамма <i>Variant name</i>	Собственное название штамма <i>Variant proper name</i>	Обозначение штамма согласно ВОЗ <i>WHO Variant of Concern label</i>	Генетическая линия <i>Genetic lineage</i>
hCoV-19/Australia/VIC01/2020	Ухань <i>Wuhan</i>	–	B
hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020	Альфа <i>Alpha</i>	Альфа <i>Alpha</i>	B.1.1.7
hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021	Бета <i>Beta</i>	Бета <i>Beta</i>	B.1.351
hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021	Гамма <i>Gamma</i>	Гамма <i>Gamma</i>	P.1
hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021	Дельта <i>Delta</i>	Дельта <i>Delta</i>	B.1.617.2
hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021	Омикрон <i>Omicron</i>	Омикрон 1 <i>Omicron 1</i>	BA.1
hCoV-19/Russia/Amursk-1603/2022	Омикрон BA.2 <i>Omicron BA.2</i>	Омикрон 2 <i>Omicron 2</i>	BA.2
hCov-19/Russia/Moscow-49415/2022	Омикрон BA.5.2 <i>Omicron BA.5.2</i>	Омикрон 5.2 <i>Omicron 5.2</i>	BA.5.2

нием 5% инактивированной при 56 °C FBS, пенициллина и амфотерицина В. Культуру клеток инкубировали в культуральных матрасах 75 см² (Nunc, США) в условиях CO₂-инкубатора при 37 °C с 5% содержанием CO₂. Пассировали клетки с интервалом 3–4 сут в разведении 1:4 [5]. Для концентрирования и перевода продукта в рабочий буферный раствор I (10 мМ имидазол, 50 мМ TRIS-HCl, 250 мМ NaCl, pH 8) применяли тангенциальную фильтрацию на кассете VivaFlow 200 с полиэтилсульфоновой мембраной с размером пор 30 000 MWCO при давлении 0,25 МПа. Впоследствии рекомбинантный эктодомен S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 очищали при помощи аффинной хроматографии на хроматографической системе ActaPure (GE Healthcare Life Sciences, США) с использованием сорбента Profinity IMAC (Bio-Rad, США). Объем сорбента рассчитывали из соотношения: 1 мл сорбента на 1 л продукта. После нанесения концентрата продукта в рабочий буфер I сорбент промывали 10 объемами рабочего буфера I, далее 10 объемами промывочного буфера (30 мМ имидазол, 50 мМ TRIS-HCl, 250 мМ NaCl, pH 8).

Элюцию целевого белка проводили элюирующим буфером (300 мМ имидазол, 50 мМ TRIS-HCl, 250 мМ NaCl, pH 8). Для дальнейшей очистки методом ионообменной хроматографии полученный элюат посредством диализа переводили в рабочий буфер II (50 мМ TRIS-HCl, pH 7,8, pH 6,43). Финальную очистку проводили на анионообменном сорбенте Nuvia HP-Q. Изoeлектрическую точку рекомбинантного эктодомена S-гликопротеина рассчитывали по аминокислотной последовательности при помощи инструмента Vitalonic¹. Элюцию целевого белка проводили ступенчатым градиентом концентрации NaCl: от 0 до 0,5 М с шагом 40 мМ; от 0,5 до 1 М с шагом 100 мМ. Выход целевого белка регистрировали при концентрации соли 120–160 мМ.

Концентрацию белка определяли с применением программного обеспечения хроматографа UNICORN 7.5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция): с использованием коэффициента экстинкции (33 350 М⁻¹см⁻¹), рассчитанного по аминокислотной последовательности с помощью онлайн инструмента Novo Pro². Концентрация белка варьировалась в пределах от 10 до 150 мкг/мл в зависимости от объема среды, наносимой на колонку. Чистоту белка оценивали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в модификации Лэммли [6]. Анализ

электрофореграммы проводили с помощью программного обеспечения GelAnalyzer 19.1³.

Получение и очистка антигенов штаммов вируса SARS-CoV-2

Пулы штаммов (табл. 1) нарабатывали на культуре клеток Vero E6, трижды заморозили и разморозили, затем центрифугировали при 4 тыс. об/мин в течение 10 мин, отфильтровывали через фильтрующие насадки (0,22 Merck, США), сконцентрировали при помощи центрифужных концентраторов Amicon Ultra-15, 50 кДа (Merck, США) согласно инструкции производителя. По объему вирусные суспензии были сконцентрированы в 20 раз. Полученную концентрированную фракцию инактивировали при помощи BPL. Конечная концентрация BPL в растворе составила 0,1%. Путем инфицирования культуры клеток Vero E6 проверяли остаточную инфекционность инактивированных фракций: она отсутствовала во всех образцах [4]. Антигены очищали методом ультрацентрифугирования (105 000 g) вирусных частиц этих штаммов, концентрированных из культуральной жидкости с зараженного монослоя чувствительной клеточной культуры Vero E6, предварительно фильтрованной шприц-насадкой 0,8 мкм (Sartorius, Германия). Очистку проводили на градиенте плотности сахарозы [6].

Получение ИСКОМ-адъюванта «Матрикс-В»

Использовали промышленно масштабируемую технологию получения ИСКОМ, разработанную в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, с применением лаурилсаркозината натрия, холестерина, лецитина, сапонинов *Q. saponaria*. Аппаратная основа технологии – система тангенциальной фильтрации-концентрирования с модулем Sartorius VivaFlow, 100 кДа. Была получена и исследована серия ИСКОМ-адъюванта «Матрикс-В» с концентрацией активного компонента сапонинов *Q. saponaria* 47,9 мг/мл, по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), и остаточного детергента – 0,63 мг/мл. При этом однократная доза ИСКОМ-адъюванта для одного животного составляла 25 мкг. Содержание детергента было ниже предела детекции ВЭЖХ (менее 10 нг/мл), в гемолитической реакции титр составил менее 1:2. Контроль размеров вирусоподобных частиц проводили с помощью метода динамического рассеяния света (dynamic light scattering, DLS).

¹ <http://vitalonic.narod.ru/biochem/index.html>

² <https://www.novoprolabs.com/tools/protein-extinction-coefficient-calculation>

³ <http://www.gelanalyzer.com/index.html>

Определение размера частиц

Размер вирусоподобных частиц ИСКОМ «Матрикс-В» определяли с помощью анализатора размера частиц Photocor Compact-Z (ООО «Фотокор», Россия). Материал для анализа готовили согласно инструкции к прибору. Переводили частицы в фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,4 с помощью жидкостной хроматографии на колонке GE XK-16 с носителем Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich, США) на хроматографе ActaPure. Использовали одноразовые квадратные кюветы BRAND кат. № 759035 (Sigma-Aldrich, США). Перед измерением фильтровали препарат и ФСБ через фильтрующую шприц-насадку 0,22 мкм, подготавливали последовательные 10-кратные разведения ИСКОМ «Матрикс-В» в ФСБ. Для определения частиц брали такое разведение, при котором счетчик прибора фиксировал значение в диапазоне 100–300 тыс. cps (counts per second, отсчетов в секунду). Параметр Fitting range устанавливали в диапазоне 120–140, число интервалов – 200.

Электронная микроскопия

Изображения получены методом негативного контрастирования уранилацетатом (1%) с анализом на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, США).

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Содержание сапонинов *Q. saponaria* и детергента в ИСКОМ-адъюванте определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором SPD M20A и колонкой Kromasil 300-5-C4 (Kromasil, Швеция). Объем анализируемой пробы – 50 мкл. Состав подвижной фазы А: 95% воды деионизованной, 5% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты. Состав подвижной фазы В: 5% воды деионизованной, 95% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты. Линейный градиент: увеличение содержания подвижной фазы В с 20 до 65% за время от 0 до 30 мин с последующим поддержанием плато (65% от уровня фазы В) до 35 мин. Скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин, определение – при длине волны 215 нм [4, 7].

В качестве образца сравнения использовали сапонин – сухой препарат Saponin from Quillaja Bark pure (PanReac, США), и лаурилсаркозинат натрия – Sodium Lauroyl Sarcosinate (Amerco, США) [4].

Иммунизация животных

Исследования выполнялись на самках мышей линии Balb/c и на разнополых аутбредных

морских свинок, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Животные до начала эксперимента находились на карантине в течение 14 сут; на протяжении всего периода исследования получали стандартный рацион питания. Экспериментальную работу с животными по забору крови проводили с использованием легкого анестетика (смесь Золетил®100+Ксила), вводимого внутримышечно. Кровь отбиралась индивидуально у каждого животного [8]. Проводимые манипуляции по иммунизации не были сопряжены с болевыми ощущениями.

Все эксперименты проводились с одобрения Биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, протокол БЭК № 3 от 07.06.2023.

Эксперименты на морских свинках. Для оценки иммуногенности препаратов Ecto-S-Wuhan и комплекса Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В 15 морских свинок весом 250–300 г были разделены на 3 группы (по 5 голов в каждой). Условия иммунизации животных во всех группах: двукратно, интервал между 1 и 2-й иммунизациями составил 14 сут; внутримышечно в две задние лапы; общий объем препарата – 500 мкл (по 250 мкл в каждое место иммунизации) [8]:

1-я группа – комплекс Ecto-S-Wuhan (однократная доза 1 мкг) + Матрикс-В (однократная доза 25 мкг);

2-я группа – комплекс Ecto-S-Wuhan (однократная доза 1 мкг);

3-я группа (контроль) – физиологический раствор.

Препараты готовили путем разведения исходных концентрированных компонентов в ФСБ (pH 7,4), смешивания и инкубации в течение 2 ч перед применением при комнатной температуре. Забор крови для анализа проводился до начала эксперимента, а также на 14-е сутки после 1 и 2-й иммунизациями, из крови отделяли сыворотку и хранили при –20 °С до проведения серологических исследований.

Эксперименты на мышах линии Balb/c. Эксперимент на мышах проводился позднее, с учетом данных, полученных на морских свинках. Для оценки иммуногенности препаратов Ecto-S-Wuhan и комплекса Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В были созданы 5 групп (по 5 голов в каждой) мышей весом 18–20 г. Интервал между 1 и 2-й иммунизациями – 14 сут. Иммунизация животных во всех группах: двукратно, внутримышечно в две задние лапы; общий объем препарата – 100 мкл (по 50 мкл в каждое место иммунизации):

- 1-я группа — комплекс Ecto-S-Wuhan (однократная доза 1 мкг) + Матрикс-В (однократная доза 25 мкг);
- 2-я группа — комплекс Ecto-S-Wuhan (однократная доза 7 мкг) + Матрикс В (однократная доза 25 мкг);
- 3-я группа — рекомбинантный S-белок вируса SARS-CoV-2 — Ecto-S-Wuhan (однократная доза 7 мкг);
- 4-я группа — адъювант «Матрикс-В»;
- 5-я группа (контроль) — физиологический раствор.

Препараты готовили путем разведения исходных концентрированных компонентов в ФСБ (рН 7,4), смешивания и инкубации в течение 2 ч перед применением при комнатной температуре. Забор крови для анализа проводился до начала эксперимента, а также на 14-е сутки после 1 и 2-й иммунизациями. Сыворотки крови хранились при -20°C до проведения серологических исследований.

Иммуноферментный анализ

Уровень гуморального ответа определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) как титр IgG к антигенам штаммов SARS-CoV-2 в образцах сыворотки крови. Антигены разводили до концентрации 2 мкг/мл раствором 0,1 М Na_2CO_3 и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета для ИФА (Nunc, США). После 18–20 ч инкубации при температуре от 17 до 27°C содержимое лунок аспирировали, блокировали на 2 ч поверхность лунок раствором стабилизатора (200 мкл, 1% сахароза + 0,1% казеин). Содержимое лунок снова аспирировали и высушенный при температуре от 17 до 27°C в течение 18–20 ч планшет упаковывали в цефленовый пакет с осушителем (силикагель) с последующим хранением при температуре от 4 до 8°C . Во все лунки вносили по 100 мкл разводящего буферного раствора (РБР-С), содержащего 0,1% казеина и 0,1% бычьего сывороточного альбумина. В верхний ряд лунок добавляли еще по 80 мкл РБР-С. Затем в верхний ряд вносили исследуемые образцы сыворотки крови (по 20 мкл), разведенные (1:10) в растворе для предварительного разведения сывороток. Также на каждом планшете титровали заведомо отрицательный контроль. Переноса в нижние лунки последовательно по 100 мкл раствора, титровали сыворотки крови с 1:100 до 1:12 800. Лунки закрывали клейкой пленкой и инкубировали в термошейкере при 37°C и скорости вращения 700 об/мин в течение 60 мин.

Не связавшиеся антитела сыворотки пятикратно отмывали из лунок при помощи 400 мкл промычного раствора ФСБ с добавлением Твин-20 (ФСБ-Т). Вносили по 100 мкл рабочего раствора пероксидазного конъюгата антител (Merck Life Science, США) против Fc-фрагмента антител мыши и морской свинки в разведении 1:5000 (согласно инструкции производителя) в растворе 0,1% казеина и 0,1% бычьего сывороточного альбумина для разведения конъюгата (РБР-К), закрывали клейкой пленкой и инкубировали в термошейкере при 37°C и 700 об/мин в течение 30 мин. Не связавшийся конъюгат пятикратно отмывали из лунок 400 мкл ФСБ-Т. Вносили в лунки по 100 мкл рабочего раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в цитрат-фосфатном растворе с перекисью водорода и выдерживали 15 мин при 37°C . Останавливали реакцию развития окраски внесением в ТМБ по 50 мкл 1М серной кислоты (стоп-реагент). Регистрировали оптическую плотность раствора в лунках на планшетном сканере MultiScan (MultiScan Technologies LLC, США) при длине волны 450 нм. Титр IgG к антигенам штаммов SARS-CoV-2 рассчитывали как среднее значение максимальных разведений от повторов одного образца, титр каждого повтора оценивали по двукратному превышению оптической плотности заведомо отрицательного образца в этом же разведении [9].

Реакция нейтрализации

Культуру клеток Vero E6 выращивали в 96-луночном культуральном планшете. Исследуемые сыворотки прогревали при 56°C в течение 30 мин, затем готовили последовательные двукратные разведения начиная с 1:10. Для разведения сывороток использовали среду DMEM с глутамином и добавлением антибиотиков. Готовили рабочую концентрацию вируса с титром 2×10^4 ЦПД₅₀/0,1 мл. Данная концентрация была выбрана с учетом того, что в лунку культурального планшета должно быть внесено 100 ЦПД₅₀ вируса, предварительно инкубированного с соответствующим разведением исследуемой сыворотки крови. Готовили смесь разведений сыворотки и рабочего разведения вируса в равных объемах. Смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем добавляли в лунки 96-луночного планшета с монослоем культуры клеток Vero E6 и инкубировали в течение 4 сут при 37°C , 5% CO_2 . Любое специфическое повреждение клеточной культуры в лунке считали цитопатическим эффектом.

⁴ ЦПД₅₀ — доза вируса, вызывающая цитопатический эффект в 50% лунок с зараженной культурой клеток.

Результат учитывали визуально по наличию такого эффекта после окрашивания раствором генцианвиолета.

При постановке реакции нейтрализации (РН) были предусмотрены следующие контроли: контроль клеток (КК) — лунки, не инфицированные вирусом; отрицательный контроль (К-) — образец сыворотки мышей в разведении 1/10; контроль вируса (КВ) — лунки, инфицированные раствором с рабочим разведением вируса (разведен в 2 раза); контроль рабочей концентрации вируса (КВ/10, КВ/100) — два приготовленных последовательных 10-кратных разведения рабочей концентрации вируса. Титром сыворотки считали обратное значение ее последнего разведения, в котором не регистрировали признаков цитопатического эффекта.

Значения контрольных показателей учитывали следующим образом: КК — клеточный монослой в контрольных лунках должен быть сохранен полностью; К-, КВ и КВ/10 — полная дегенерация монослоя клеток; КВ/100 — половина инфицированных лунок имеет признаки цитопатического эффекта [4].

Статистическая обработка данных

Результаты экспериментов обрабатывались статистически с помощью программы Statistica 10. Для данных реакции торможения гемагглютинации и ИФА определялось среднее геометрическое значение. Доверительный интервал для средних геометрических рассчитывали следующим образом. Полученные значения титров ИФА логарифмировали по основанию 2, после чего определяли среднее арифметическое значение логарифмов и 95% доверительный интервал ($ДИ_{95}$) при $p=0,95$ для них. Максимальное значение ДИ рассчитывали путем добавления к среднему значению ДИ, а минимальное значение ДИ — путем вычитания из среднего ДИ. После этого проводили потенцирование среднего арифметического значения, максимальной и минимальной величины $ДИ_{95}$ путем возведения в степень 2 значений среднего арифметического $ДИ_{95max}$ и $ДИ_{95min}$ [8].

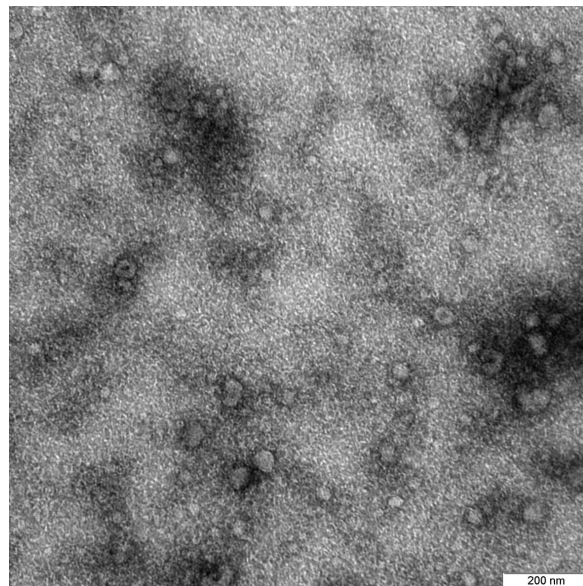
Результаты

Анализ размера частиц показал, что полученный препарат ИСКОМ «Матрикс-В» состоит из частиц, средний размер которых составляет $40,69 \pm 14,84$ нм. Ультраструктура комплекса Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг), использованного для иммунизации экспериментальных животных, представлена на рисунке 1.

После внутримышечного введения препарата Ecto-S-Wuhan и комплекса Ecto-S-

Wuhan+Матрикс-В животные не проявляли внешних признаков угнетения. Результаты ИФА образцов сыворотки крови морских свинок представлены на рисунке 2. Сыворотки крови животных всех экспериментальных групп, взятые на 14-е сутки после однократной иммунизации, достоверно ($p=0,95$) не отличались от отрицательного контроля, среднегеометрические титры (СГТ) антител были менее 1:100. Наиболее интенсивный ответ (на антиген штамма Delta) получен после двукратной иммунизации комплексом Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг). Статистически значимые различия титров ($p=0,95$) наблюдались в реакциях с антигенами штаммов Wuhan, Gamma и Omicron BA.2. Ответ на двукратное введение антигена Ecto-S-Wuhan (1 мкг) без ИСКОМ-адъюванта ($p=0,95$) не отличался от отрицательного контроля, значение титра менее 1:100.

Результаты реакции вирус-нейтрализации с образцами сывороток крови морских свинок представлены на рисунке 3. Обратные нейтрализующие титры сывороток крови после двукратного введения комплекса Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг) против штаммов Wuhan и Delta составили 1:320 и 1:184 соответственно, при этом различия оказались не достоверны ($p=0,95$). Нейтрализующая активность против



Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by the authors

Рис. 1. Фотография частиц иммуностимулирующего комплекса, полученного с использованием сапонинов *Quillaja saponaria*. 100-кратный концентрат комплекса Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг). Просвечивающий электронный микроскоп JEM-1400 (JEOL, США).

Fig. 1. Particles of the immune-stimulating complex obtained using *Quillaja saponaria* saponins. 100-fold concentrate of the Ecto-S-Wuhan (1 μ g) and Matrix-V (25 μ g) complex. Transmission electron microscopy (JEM-1400; JEOL, USA).

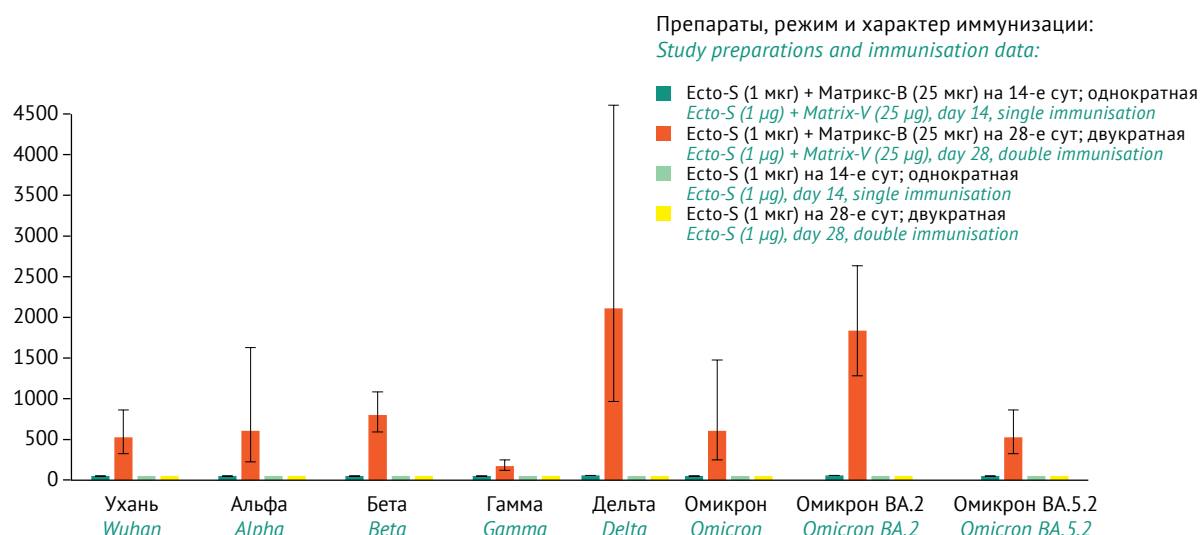


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Данные иммуноферментного анализа образцов сыворотки крови иммунизированных морских свинок. Ось абсцисс: штаммы вируса SARS-CoV-2, которые использовались для получения антигена. Ось ординат: среднее геометрическое значений обратных титров антител. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала ($p=0,95$).

Fig. 2. Enzyme-linked immunosorbent assay data on serum samples from immunised guinea pigs. The X-axis shows the SARS-CoV-2 variants used to obtain the study antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The whiskers reflect confidence intervals ($p=0.95$).

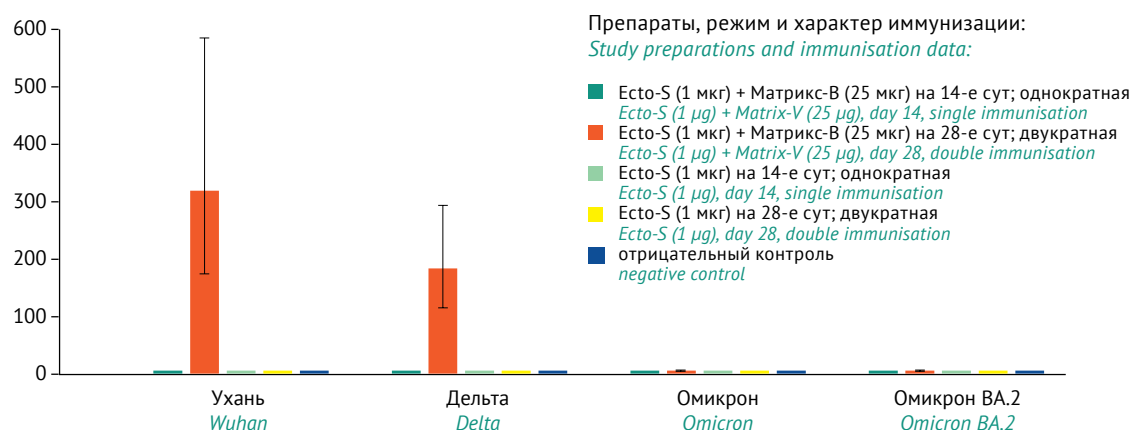


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Данные реакции вирус-нейтрализации с образцами сыворотки крови иммунизированных морских свинок. Ось абсцисс: штаммы вируса SARS-CoV-2, которые использовались для получения антигена. Ось ординат: среднее геометрическое значений обратных титров антител. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала ($p=0,95$).

Fig. 3. Virus neutralisation data on serum samples from immunised guinea pigs. The X-axis shows the SARS-CoV-2 variants used to obtain the study antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The whiskers reflect confidence intervals ($p=0.95$).

штаммов Omicron и Omicron BA.2 отсутствовала. Однократное введение препаратов животным всех экспериментальных групп не привело к выработке вируснейтрализующих антител.

Для верификации результатов, полученных в эксперименте на морских свинках, была проведена иммунизация мышей идентичным комплексом Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В

(25 мкг), а также отдельно антигеном Ecto-S-Wuhan с повышенной концентрацией (7 мкг). Результаты ИФА представлены на рисунке 4. После однократного введения всех препаратов иммунный ответ в ИФА определялся только у единичных животных, а при оценке группы не отличался достоверно ($p=0,95$) от отрицательного контроля. После двукратной иммунизации

отметили существенное увеличение значений титров антител образцов сыворотки крови мышей против Ecto-S-Wuhan (7 мкг, без адъюванта) при связывании с антигеном SARS-CoV-2 штамма Wuhan. Также значительное увеличение титров антител в сыворотке крови мышей наблюдали при двукратном введении комплекса Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг) (рис. 4).

В РН получены результаты, которые подтверждают данные, полученные на модели морских свинок (рис. 5). Однократное введение всех препаратов мышам не приводило к формированию вируснейтрализующего ответа (значения титров антител менее 1:10). Двукратное введение комплекса Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг) индуцировало вируснейтрализующий

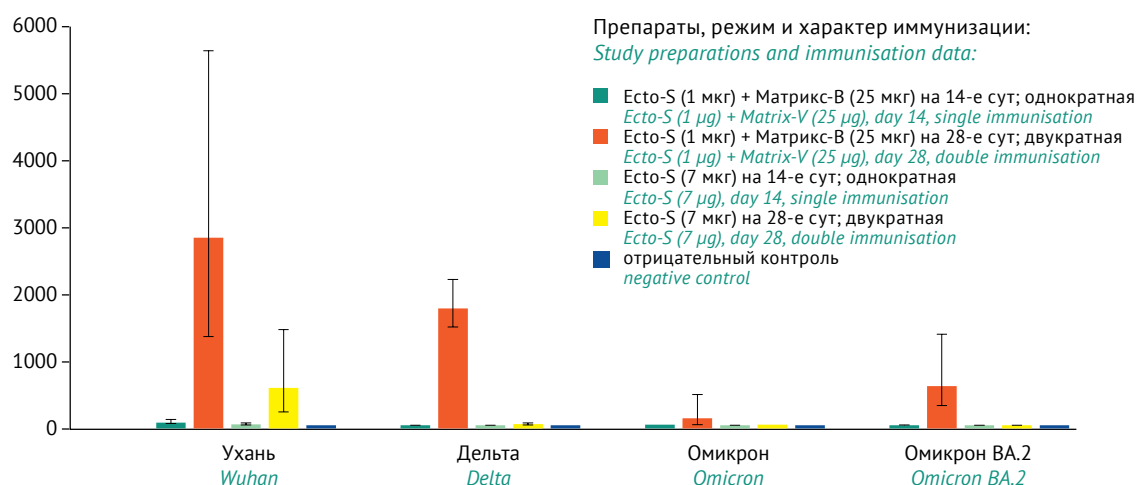


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Данные иммуноферментного анализа с образцами сыворотки крови иммунизированных мышей. Ось абсцисс — штаммы вируса SARS-CoV-2, которые использовались для получения антигена. Ось ординат — среднее геометрическое значений обратных титров антител. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала ($p=0,95$).

Fig. 4. Enzyme-linked immunosorbent assay data on serum samples from immunised mice. The X-axis shows the SARS-CoV-2 variants used to obtain the study antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The whiskers reflect confidence intervals ($p=0.95$).

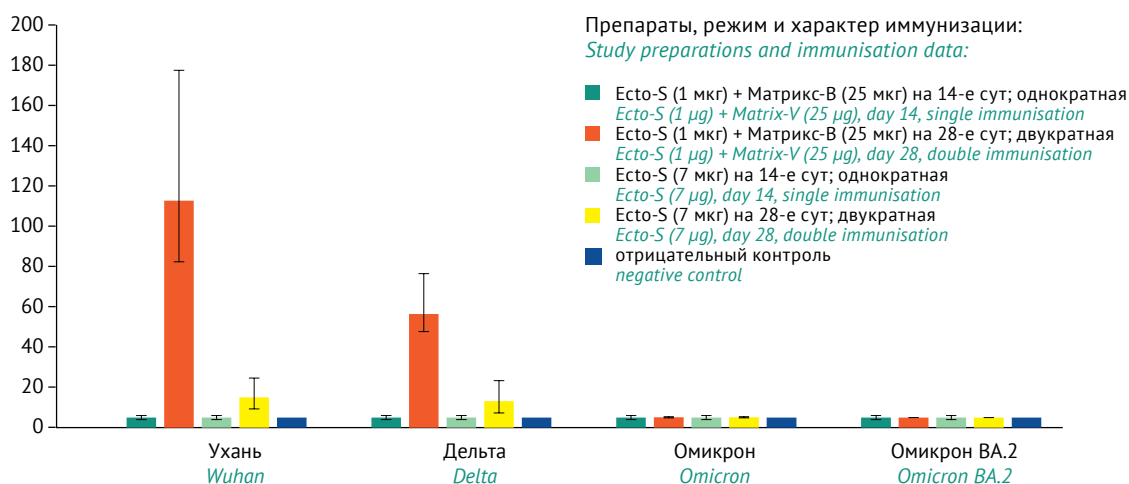


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Данные реакции вирус-нейтрализации с образцами сыворотки крови иммунизированных мышей. Ось абсцисс: штаммы вируса SARS-CoV-2, которые использовались для получения антигена. Ось ординат: среднее геометрическое значений обратных титров антител. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала ($p=0,95$).

Fig. 5. Virus neutralisation data on serum samples from immunised mice. The X-axis shows the SARS-CoV-2 variants used to obtain the study antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The whiskers reflect confidence intervals ($p=0.95$).

ответ на антиген штаммов Wuhan и Delta: значения титров антител составили 1:113 и 1:56 соответственно. При этом нейтрализующая способность сывороток крови была достоверно выше в отношении линии Wuhan, чем Delta. Вирусы Omicron и Omicron BA.2 не были нейтрализованы антителами сыворотки крови мышей, иммунизированных разработанными препаратами.

Обсуждение

Разработанная генетическая конструкция позволила получить рекомбинантный белок, идентичный по антигенным свойствам эктодомену S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2. В данной работе не затронуты вопросы оптимизации трансфекции клеток, отбора клонов и эффективности с точки зрения производства. Приводятся данные, характеризующие антиген, который использовался для иммунизации животных.

Первая рекомбинантная противокоронавирусная вакцина NuvaXovid с ИСКОМ-адъювантом, которая была внедрена, включает в себя рекомбинантный S-белок вируса SARS-CoV-2, полученный в клетках насекомых биотехнологическим методом – бакуловирусной системой экспрессии. Данная система ранее применялась для экспрессии рекомбинантного гемагглютинаина вируса гриппа, который использовался для производства противогриппозной вакцины Flublok®. Препарат не содержит адъювантов, а иммуногенные свойства рекомбинантного гемагглютинаина обусловлены особенностями процессинга белка клетками насекомых и самосборкой в вирусоподобные частицы размером около 40 нм. При этом нагрузка по специфическому белку составляет 15 мкг гемагглютинаина каждого субтипа. Для создаваемого нами вакцинного прототипа изначально планировалось применение ИСКОМ-адъюванта. При таком дизайне вирусоподобные свойства обусловлены частицей адъюванта и преимущества бакуловирусного антигена не очевидны. Была выбрана хорошо зарекомендовавшая себя разработанная в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора система экспрессии рекомбинантных белков на основе клеток HEK293.

Оценка иммуногенных свойств произведенного антигена в комплексе с ИСКОМ-адъювантом была проведена на двух видах животных – мышах и морских свинках, и результаты иммунного ответа оказались близко сопоставимы. Однократное введение Ecto-S-Wuhan, а также комплекса Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В не приводило к определяемому ответу. Ранее аналогичные результаты при введении доз от 50 нг до 1 мкг были показаны на примере гриппозных

инактивированных антигенов [1]. В настоящей работе на мышинной модели исследовался антиген в дозе 7 мкг, но при однократном введении только у единичных животных в ИФА фиксировалось незначительное превышение значений по сравнению с данными отрицательного контроля. Наличие специфических антител анализировали при помощи двух методов – РН и ИФА. Второй метод широко используется для диагностики, первый – позволяет определить наличие вируснейтрализующих антител. Результаты ИФА сывороток крови экспериментальных животных (рис. 4) свидетельствуют о том, что двукратное введение Ecto-S-Wuhan, а также комплекса Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В приводит к формированию выраженного гуморального ответа как у мышей, так и у морских свинок.

В представленной работе был разработан и исследован антиген Ecto-S-Wuhan, созданный на основе генетической последовательности штамма Wuhan SARS CoV-2, характерного для начала пандемии. В результате вирусной эволюции уже возникло множество генетических вариантов вируса, для которых нейтрализующая способность сывороток, специфичных к исходным штаммам вируса, существенно снижена либо отсутствует. В связи с этим для проверки нейтрализующей специфической активности сывороток животных, иммунизированных исследуемыми препаратами, были использованы штаммы вируса SARS CoV-2 разных генетических линий.

Кросс-реактивность между использовавшимися антигенами штаммов SARS CoV-2 и антителами сыворотки крови экспериментальных животных, индуцированными двукратным введением синтетического комплекса Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В в ИФА, показана для всех пар сравнения. По данным эксперимента на морских свинках, достоверно ($p=0,95$) более высокий ответ на иммунизацию комплексом зафиксирован для антигенов Delta и Omicron BA.2. По данным эксперимента на мышах Balb/c, достоверно ($p=0,95$) более высокий ответ зафиксирован для гомологичного антигена Wuhan и Delta (рис. 2). Исследования в РН показали уровень кросс-реактивности антител сыворотки крови экспериментальных животных и штаммов SARS CoV-2 с точки зрения нейтрализующих свойств.

На обеих животных моделях показано, что достоверной ($p=0,95$) нейтрализующей активностью обладают сыворотки животных, двукратно иммунизированных комплексом Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В (рис. 3, 5). Максимальная

нейтрализующая активность проявилась в отношении генетических линий Wuhan и Delta, между которыми нет достоверных различий ($p=0,95$). Несмотря на сравнительно высокие значения СГТ-нейтрализующих титров антител сыворотки крови мышей и морских свинок к вирусам Wuhan и Delta, достоверных ($p=0,95$) признаков нейтрализации образцов штаммов Omicron и Omicron BA.2 не отмечено (рис. 3, 5). Эти результаты соответствуют представленными ранее, анализ которых показал, что нейтрализующая активность сывороток, полученных к антигенам штаммов Omicron 1 и 2 (СГТ 1:1437, 1:368), по отношению к прототипному штамму Wuhan SARS-CoV-2 (СГТ 1:80, 1:20), снижена в 18 раз [4].

Только у единичных мышей, двукратно иммунизированных Ecto-S-Wuhan в однократной дозе 7 мкг, были отмечены вируснейтрализующие свойства антител крови против генетических линий Wuhan и Delta, титр антител составил 1:40 в обоих случаях, но значения СГТ в этих группах достоверно ($p=0,95$) не отличались от показателей в группах отрицательного контроля. Фактически даже двукратное

введение рекомбинантного антигена без адьюванта не приводило к формированию нейтрализующего иммунного гуморального ответа против гомологичного вируса.

Заключение

Оценка уровня гуморального иммунного ответа экспериментальных животных на внутримышечное введение Ecto-S-Wuhan — рекомбинантного эктодомена S-белка вируса SARS-CoV-2 (генетическая линия Wuhan), совместно с ИСКОМ-адьювантом, содержащим сапонины *Q. saponaria*, продемонстрировала следующее: комплекс Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В при двукратном внутримышечном введении индуцирует высокий уровень вируснейтрализующих антител, что позволяет рассматривать комплекс в качестве прототипа противоковидной вакцины. Разработанный нами ИСКОМ-адьювант перспективен для использования в качестве компонента иммунобиологических препаратов на основе рекомбинантных антигенов для профилактики и терапии широкого спектра инфекционных заболеваний.

Литература/References

1. Евсеенко ВА, Гудымо АС, Данильченко НВ, Святченко СВ, Таранов ОС, Рыжиков АБ. Разработка и лабораторное получение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов, оценка их адьювантных свойств при иммунизации мышей гриппозными антигенами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):170–86.
Evseenko VA, Gudymo AS, Danilchenko NV, Svyatchenko SV, Taranov OS, Ryzhikov AB. Development and laboratory production of virus-like immune-stimulating complexes based on saponins and evaluation of their adjuvant potential using mice immunisation with influenza antigens. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):170–86 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-170-186>
2. Underwood E, Dunkle LM, Madhi SA, Gay CL, Heath PT, Kotloff KL, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of the NVX-CoV2373 vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2023;22(1):501–17.
<https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2218913>
3. Kudriavtsev AV, Vakhrusheva AV, Kryuchkov NA, Frolova ME, Blagodatskikh KA, Ivanishin TV, et al. Safety and immunogenicity of Betuvax-CoV-2, an RBD-Fc-based SARS-CoV-2 recombinant vaccine: preliminary results of the first-in-human, randomized, double-blind, placebo-controlled phase I/II clinical trial. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(2):326.
<https://doi.org/10.3390/vaccines11020326>
4. Зайковская АВ, Евсеенко ВА, Олькин СЕ, Пьянков ОВ. Изучение антигенных свойств штаммов коронавируса SARS-CoV-2, выделенных на территории РФ в 2020–2022 гг., в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей. *Инфекция и иммунитет*. 2023;13(1):37–45.
Zaykovskaya AV, Evseenko VA, Olkin SE, Pyankov OV. Investigating antigenic features of the SARS-CoV-2 isolated in Russian Federation in 2021–2022 by hyperimmune mouse serum neutralisation. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2023;13(1):37–45 (In Russ.).
<https://doi.org/10.15789/2220-7619-IAF-1998>
5. Herrera NG, Morano NC, Celikgil A, Georgiev GI, Malonis RJ, Lee JH, et al. Characterization of the SARS-CoV-2 S protein: biophysical, biochemical, structural, and antigenic analysis. *ACS Omega*. 2021;6(1):85–102.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03512>
6. Остерман ЛА. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука; 1981.
Osterman LA. *Methods for studying proteins and nucleic acids: electrophoresis and ultracentrifugation*. Moscow: Nauka; 1981 (In Russ.).
7. San Martín R, Briones R. Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *J Sci Food Agric*. 2000;80(14):2063–8.
[https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200011\)80:14%3C2063::AID-JSFA750%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200011)80:14%3C2063::AID-JSFA750%3E3.0.CO;2-2)
8. Гудымо АС, Мальцев СВ, Евсеенко ВА, Данильченко НВ, Марченко ВЮ, Дурыманов АГ, Рыжиков АБ. Экстракт цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве адьюванта при интраназальной иммунизации мышей гриппозными антигенами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(4):233–9.

Gudymo AS, Maltsev SV, Evseenko VA, Danilchenko NV, Marchenko VYu, Durymanov AG, Ryzhikov AB. *Cyclamen europaeum* (*Cyclamen purpurascens*) extract as adjuvant for nasal immunization of mice with influenza antigens. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(4):233–9 (In Russ.).

EDN: [ZXGLLN](#)

9. Щелкунов СН, Сергеев АА, Кабанов АС, Якубицкий СН, Бауэр ТВ, Пьянков СА. Патогенность

и иммуногенность вариантов вируса осповакцины при разных способах их введения мышам. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(2):357–64.

Shchelkunov SN, Sergeev AA, Kabanov AS, Yakubitsky SN, Bauer TV, Pyankov SA. Route-coupled pathogenicity and immunogenicity of vaccinia virus variant inoculated mice. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(2):357–64 (In Russ.).

<https://doi.org/10.15789/2220-7619-PAI-1375>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **В.А. Евseenko** — разработка технологии и получение иммуностимулирующих вирусоподобных комплексов, разработка концепции и дизайна экспериментального исследования; анализ и интерпретация экспериментальных данных, написание текста рукописи; **А.В. Зайковская** — получение антигенов штаммов SARS-CoV-2, проведение исследования методом вирус-нейтрализации, комплекс работ по экспериментам с животными; **А.С. Гудымо, Н.В. Данильченко** — комплекс работ по экспериментам с животными; **О.С. Таранов** — проведение комплекса электронно-микроскопических исследований; **С.Е. Олькин** — определение концентрации детергента и вирусоподобных комплексов; **А.Р. Иmatдинов, Е.Ю. Прудникова** — разработка и получение генетических конструкций для получения поверхностного S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2; **Е.И. Даниленко** — комплекс работ по наработке S-гликопротеина; **И.С. Шульгина, С.А. Пьянков** — наработка антигенов и постановка иммуноферментного анализа; **М.Н. Косенко** — выделение и очистка S-гликопротеина, получение стерильной готовой формы препарата; **А.Б. Рыжиков** — утверждение окончательной версии статьи для публикации.

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). Проведение исследований и все эксперименты были одобрены на заседании Биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол заседания БЭК № 3 от 07.06.2023).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **V.A. Evseenko** developed the production technology and applied it to produce virus-like immune-stimulating complexes, conceptualised and designed the experimental study, analysed and interpreted experimental data, and drafted the manuscript. **A.V. Zaykovskaya** obtained SARS-CoV-2 variant antigens, conducted virus neutralisation testing, and worked with experimental animals. **A.S. Gudymo** and **N.V. Danilchenko** worked with experimental animals. **O.S. Taranov** carried out electron microscopy. **S.E. Olkin** determined detergent and virus-like complex concentrations. **A.R. Imatdinov** and **E.Yu. Prudnikova** developed and produced genetic constructs to obtain SARS-CoV-2 surface glycoprotein (S). **E.I. Danilenko** produced SARS-CoV-2 surface glycoprotein (S). **I.S. Shulgina** and **S.A. Pyankov** produced antigens and conducted ELISA. **M.N. Kosenko** isolated and purified SARS-CoV-2 surface glycoprotein (S), produced the final sterile product. **A.B. Ryzhikov** approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. All the experiments were performed according to the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, the CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Russian Standard GOST 33216-2014). The Bioethics Committee at the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” approved the study and all the experiments (Bioethics Committee’s Meeting Minutes No. 3 of 7 June 2023).

Об авторах / Authors

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

Зайковская Анна Владимировна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>
zaykovskaya_av@vector.nsc.ru

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

Anna V. Zaykovskaya, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>
zaykovskaya_av@vector.nsc.ru

Гудымо Андрей Сергеевич

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

Таранов Олег Святославович, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
taranov@vector.nsc.ru

Олькин Сергей Евгеньевич, канд. хим. наук

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-7158-9889>
olkin_se@vector.nsc.ru

Иматдинов Алмаз Рамисович, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2889-6112>
imatdinov_ar@vector.nsc.ru

Прудникова Елена Юрьевна, канд. вет. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7983-5312>
prudnikova_eyu@vector.nsc.ru

Данильченко Наталья Викторовна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2655-4629>
danilchenko_nv@vector.nsc.ru

Шульгина Ирина Сергеевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6850-338X>
shulgina_is@vector.nsc.ru

Косенко Максим Николаевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8023-0601>
kosenko_mn@vector.nsc.ru

Даниленко Елена Игоревна

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8106-7037>
danilenko_ei@vector.nsc.ru

Пьянков Степан Александрович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6593-6614>
pyankov_sa@vector.nsc.ru

Рыжиков Александр Борисович, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7009-0748>
ryzhik@vector.nsc.ru

Поступила 27.07.2023

После доработки 01.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Andrei S. Gudymo

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

Oleg S. Taranov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
taranov@vector.nsc.ru

Sergei E. Olkin, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-7158-9889>
olkin_se@vector.nsc.ru

Almaz R. Imatdinov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2889-6112>
imatdinov_ar@vector.nsc.ru

Elena Yu. Prudnikova, Cand. Sci. (Vet.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7983-5312>
prudnikova_eyu@vector.nsc.ru

Natalia V. Danilchenko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2655-4629>
danilchenko_nv@vector.nsc.ru

Irina S. Shulgina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6850-338X>
shulgina_is@vector.nsc.ru

Maksim N. Kosenko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8023-0601>
kosenko_mn@vector.nsc.ru

Elena I. Danilenko

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8106-7037>
danilenko_ei@vector.nsc.ru

Stepan A. Pyankov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6593-6614>
pyankov_sa@vector.nsc.ru

Aleksandr B. Ryzhikov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7009-0748>
ryzhik@vector.nsc.ru

Received 27 July 2023

Revised 1 November 2023

Accepted 24 November 2023

УДК 578.7

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-544-559>

Научная статья | Scientific article



Эффективность применения индуктора интерферонов против вируса Чикунгунья *in vitro*

Е.В. Отрашевская^{1,✉}, К.В. Каа², Т.Г. Самарцева¹, А.С. Оксанич¹, Г.М. Игнатьев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный пер., 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

✉ Отрашевская Елена Викторовна; e.v.otrashevskaja@mail.ru

Резюме

Актуальность. Препараты для специфического лечения и профилактики лихорадки Чикунгунья, ее осложнений и последствий в настоящее время отсутствуют, в связи с этим особую актуальность приобретают вопросы разработки терапевтических и профилактических препаратов против вируса Чикунгунья (ЧИКВ), в том числе препаратов индукторов интерферонов.

Цель. Изучение эффективности профилактического применения препарата индуктора интерферонов против вируса Чикунгунья в модели *in vitro*.

Материалы и методы. Использовали штамм ЧИКВ Nika2021, две линии клеток — Vero и A549, а также препарат индуктора интерферонов (РНК двуспиральной натриевой соль) в двух дозировках (250 и 500 мкг/мл) и двух режимах применения (за 4 ч до заражения и одновременно с ним). Определяли титр вируса по его цитопатическому действию; содержание РНК ЧИКВ — методом ОТ-ПЦР-РВ и оценивали по показателю порогового числа циклов ПЦР; концентрацию продуцируемых клетками цитокинов — методом ИФА. В динамике анализировали активность ЧИКВ и содержание РНК ЧИКВ, а также продукцию цитокинов клетками (ИФН- α , - γ , ИЛ-6 и ФНО- α). Полученные данные обрабатывали при помощи пакетов программ Microsoft Office Excel 2016 и StatTech.

Результаты. Препарат в дозах 250 и 500 мкг/мл стимулировал продукцию в большей степени ИФН- α и в меньшей степени ИФН- γ ; в большей степени — в линии клеток A549, в меньшей — в линии клеток Vero. Динамика содержания РНК ЧИКВ соответствовала динамике его титра в клетке. В целом содержание РНК ЧИКВ в линии клеток Vero было значительно выше, чем в линии клеток A549 ($p < 0,002$ при дозировке препарата 250 мкг/мл, $p < 0,0005$ при дозировке 500 мкг/мл). Препарат применяли в двух режимах: профилактическом — за 4 ч до заражения клеток вирусом; экстренно профилактическом — одновременно с инфицированием. Содержание РНК ЧИКВ в режиме профилактического применения препарата относительно контрольного опыта (инфицирование без препарата) было значительно ниже в обеих дозах в обеих линиях клеток ($p < 0,002$ для Vero, $p < 0,0003$ для A549), в режиме экстренной профилактики — $p < 0,05$ и $p < 0,003$ соответственно. Выявлена и статистически подтверждена эффективность применения препарата индуктора интерферонов против ЧИКВ, показано преимущество линии клеток A549 для изучения противовирусной активности *in vitro*. В обеих линиях интактных клеток отмечена продукция ИЛ-6 и ФНО- α .

Выводы. Обнаружен положительный противовирусный эффект от применения препарата индуктора интерферонов против ЧИКВ *in vitro*, при этом степень эффективности зависела от линии клеток. Показана необходимость тщательного отбора клеточной линии в зависи-

мости от целей исследования, а также изучения продукции цитокинов клетками в моно-
слое до стимуляции вирусами и (или) препаратами.

Ключевые слова: вирус Чикунгунья; индуктор интерферонов; ИФН; ИЛ-6; ФНО- α ; цитокины; Vero; A549; РНК
двуспиральной натриевая соль; профилактические препараты

Для цитирования: Отрашевская Е.В., Каа К.В., Самарцева Т.Г., Оксанич А.С., Игнатьев Г.М. Эффективность
применения индуктора интерферонов против вируса Чикунгунья *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):544–559. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-544-559>

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-14-00184 «Разработка диагностических, профилактиче-
ских и терапевтических стратегий в отношении инфекции, вызванной вирусом Чикунгунья».

Конфликт интересов. Г.М. Игнатьев — член редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» (с 2008 г.). Осталь-
ные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Efficacy of interferon inducers against Chikungunya virus *in vitro*

Elena V. Otrashevskaja¹✉, Konstantin V. Kaa², Tatiana G. Samartseva¹,
Aleksy S. Oksanich¹, George M. Ignatyev¹

¹ I. Mechnikov Research Institute of 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

✉ Elena V. Otrashevskaja; e.v.otrashevskaja@mail.ru

Abstract

Scientific relevance. To date, no specific antivirals have been approved to treat and prevent Chikungunya fever, its complications, and sequelae. Therefore, the development of therapeutic and preventive medicinal products against Chikungunya virus (CHIKV), including interferon inducers, is gaining relevance.

Aim. The authors aimed to study the effectiveness of prophylactic administration of an interferon inducer against CHIKV in an *in vitro* model.

Materials and methods. The study used two cell lines (Vero and A549), a CHIKV strain (Nika2021), and an interferon-inducing medicinal product (double-stranded RNA sodium salt) at two doses (250 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$) administered at two schedules: Prevention (4 h prior to the virus challenge) and Emergency Prevention (at the time of the virus challenge). The authors determined the CHIKV titre by its cytopathogenic effect, the CHIKV RNA content by the cycle threshold value in real-time reverse-transcription polymerase chain reaction, and the concentration of cytokines using the enzyme immunoassay method. The study monitored the changes in CHIKV biological activity, CHIKV RNA levels, and the production of interferon- α (IFN- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-6 (IL-6), and tumour necrosis factor- α (TNF- α) in cells over time. The statistical analysis of the resulting data used Microsoft Office Excel 2016 and StatTech.

Results. The medicinal product at doses of 250 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$ stimulated the production of both IFN- α and IFN- γ (IFN- α to a greater extent than IFN- γ) in both cell lines (in A549 to a greater extent than in Vero). The changes in CHIKV RNA levels with time corresponded to those of the virus titre. In general, CHIKV RNA levels in Vero cells were significantly higher than those in A549 cells ($p < 0.002$ at 250 $\mu\text{g/mL}$ and $p < 0.0005$ at 500 $\mu\text{g/mL}$). The CHIKV RNA content after preventive interferon inducer administration was significantly lower than that in the control experiment (challenge without administration of the medicinal product) for both doses and both cell lines ($p < 0.002$ for Vero cells; $p < 0.0003$ for A549 cells). The CHIKV RNA con-

tent after interferon inducer administration as emergency prevention was significantly lower than that in the control experiment ($p < 0.05$ for Vero cells; $p < 0.003$ for A549 cells). The study demonstrated the efficacy of the interferon inducer against CHIKV and a higher applicability of the A549 cell line to studying antiviral activity *in vitro*. The authors observed the production of IL-6 and TNF- α by intact cells of both lines.

Conclusions. According to the results, the studied interferon inducer has a positive antiviral effect against CHIKV *in vitro*, with the antiviral effect degree depending on the cell line used. This experimental study demonstrated the need to carefully select the cell line for a study in accordance with its objectives and to evaluate the production of cytokines by a monolayer of cells before stimulation with viruses and/or medicinal products.

Keywords: Chikungunya virus; interferon inducer; IFN- α ; IFN- γ ; IL-6; TNF- α ; cytokines; Vero; A549; double-stranded RNA sodium salt; preventive medicines

For citation: Otrasevskaja E.V., Kaa K.V., Samartseva T.G., Oksanich A.S., Ignatyev G.M. Efficacy of interferon inducers against Chikungunya virus *in vitro*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):544–559. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-544-559>

Funding. This study was supported by the Russian Science Foundation under grant No. 22-14-00184 *Development of diagnosis, prevention, and treatment approaches to Chikungunya infection*.

Disclosure. G.M. Ignatyev has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2008. The other authors declare having no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Вирус Чикунгунья (ЧИКВ), представитель рода *Alphavirus* из семейства *Togaviridae*, – это оболочечный вирус с одноцепочечной РНК положительной полярности; размер генома приблизительно составляет 11,8 тыс. нуклеотидов. В клетках насекомых альфа-вирусы могут персистентно реплицироваться, в то время как размножение в клетках млекопитающих оказывает цитопатический эффект, в результате которого происходит драматическое отключение экспрессии генов хозяина, что, в свою очередь, приводит к супрессии врожденного иммунитета [1]. Патогенные альфа-вирусы могут напрямую противодействовать антивирусной активности клеток, подавляя врожденный (неспецифический) иммунитет или препятствуя формированию адаптивного (специфического) иммунитета [2]. Вирусемия в острую фазу заболевания сопровождается у пациентов лимфопенией, моноцитопенией, нейтрофилией, активацией Т-клеточного ответа и выраженной продукцией провоспалительных цитокинов, в том числе интерферонов (ИФН) – ИФН- α и ИФН- γ [3]. Ключевые клетки для репродукции ЧИКВ – фибробласты, моноциты, макрофаги и эндотелиальные клетки.

Лихорадка Чикунгунья представляет собой острое инфекционное заболевание, которое распространяется комарами. У пациентов, инфицированных ЧИКВ, часто развиваются полиартралгии и артриты с отеком суставов и выраженным болевым синдромом. Полиартралгии могут сохраняться достаточно долгое время

после исчезновения других симптомов, вовлекая в процесс разные суставы, иногда приводя к деструктивным артропатиям. Хронизация патологического процесса при ЧИКВ-инфекции характеризуется выраженными персистирующими или рецидивирующими болями в мелких суставах конечностей по типу ревматоидного артрита и коленях от нескольких месяцев до ряда лет, что значительно влияет на качество жизни и нередко приводит к длительной утрате трудоспособности [4–6]. Нередко при тяжелом течении заболевания наблюдается неврологическая манифестация ЧИКВ-инфекции, вплоть до энцефалита, энцефалопатии или развития синдрома Гийена – Барре [7].

В последние десятилетия заболевание, вызываемое ЧИКВ, стало глобальной проблемой для здравоохранения в более чем 100 странах Европы, Азии, Африки, Северной и Южной Америки, Карибского региона, Океании. Отмечено, что, как и все арбовирусы, ЧИКВ в эндемичных регионах вызывает спорадические вспышки. Однако, попадая в иммунологически наивную популяцию, вирус способен инициировать серьезную эпидемию [8]. Способность ЧИКВ к внезапному появлению и быстрому распространению на территории новых регионов требует проведения непрерывного и усиленного эпидемиологического мониторинга, а также постоянной готовности органов здравоохранения к вспышкам лихорадки Чикунгунья. Эффективные противовирусные, а также специфические профилактические препараты против ЧИКВ в настоящее время отсутствуют.

За полвека после разработки V.R. Harrison и соавт. [9] первой вакцины для профилактики лихорадки Чикунгунья ни один препарат так и не появился на рынке. Данный факт свидетельствует о том, что путь этот по разным причинам непростой.

Наиболее адекватная лабораторная модель для экспериментального изучения заболевания, вызываемого ЧИКВ, а также терапевтических и профилактических препаратов — низшие приматы. Их основное преимущество перед другими лабораторными животными: они — естественные хозяева вируса в природе, и патогенез заболевания у них имеет в общих чертах такую же клиническую картину, как у человека (лихорадка, сыпь, вирусемия, продукция ИФН) [10]. Для изучения противовирусных препаратов, в том числе вакцин для профилактики лихорадки Чикунгунья, широко используют инбредных мышей линии C57BL/6. Чем моложе мыши, тем чувствительнее они к ЧИКВ. Летальное инфицирование ЧИКВ моделируется на сосунках мышей C57BL/6, а также на мышках, дефектных по рецептору ИФН- α/β [11–13]. Для скринингового изучения противовирусных соединений и препаратов различного происхождения проводятся, ранее доклинических исследований на животных, эксперименты *in vitro* с использованием разных клеточных линий. Преимущества таких исследований: достаточно быстрое тестирование противовирусной активности того или иного препарата, оценка цитотоксического эффекта используемого соединения и др.

В опубликованном в 2021 г. обзоре V. Battisti и соавт. [14] приведены результаты исследований *in vitro* около 100 противовирусных соединений, действующих или непосредственно на ЧИКВ, или на клетки хозяина. В многочисленных работах использовались штаммы разных генотипов ЧИКВ, разные клеточные линии и методы оценки. Большинство исследователей применяли клеточную линию Vero для тестирования соединений прямого противовирусного действия. Однако для соединений, влияющих на факторы противовирусной защиты клеток хозяина, данная клеточная линия почти не использовалась [14]. Некоторые препараты и соединения на линии клеток Vero проявили парадоксальный эффект, демонстрируя положительный результат *in vivo* и при этом отсутствие или негативный эффект *in vitro*, и наоборот. Данный феномен объясняется тем, что клетки Vero не продуцируют ИФН I типа, который крайне важен для контроля и предотвращения ЧИКВ-инфекции. Впервые генетический дефект данной клеточной линии в продукции ИФН был отмечен в конце 1980-х

годов [15]. Позже проводился структурный анализ генома клеток Vero, а также сравнительные исследования полногеномной структуры разных сублиний Vero [16, 17]. Были обнаружены факторы, такие как крупная делеция (≈ 9 Mbp) и потеря гомозиготности 12-й хромосомы, характерные для четырех сублиний клеток Vero: JCRB0111, CCL-81, 76 и E6. Выявленные факторы привели к «потере» кластера генов ИФН I типа, а также гена ингибитора циклин-зависимой киназы (CDKN2), что, в свою очередь, может частично объяснить высокую чувствительность линии Vero к различным вирусам.

Критическая роль клеточного иммунитета, и прежде всего ИФН I типа, для контроля и предотвращения ЧИКВ инфекции была показана ранее [2, 3, 5, 18, 19]. Так, ИФН- α лимитирует репликацию и диссеминацию ЧИКВ, в то время как ИФН- β ограничивает воспалительную реакцию и таким образом препятствует развитию патологического процесса [20]. Известно, что ЧИКВ, подобно всем альфа-вирусам, способен обходить и (или) противодействовать ИФН- α/β -ответу клеток хозяина [2, 11, 18, 19, 21]. Эти факторы влияли на выбор модулирующих иммунный ответ препаратов в качестве терапевтических средств против ЧИКВ. В большинстве исследований, как *in vivo*, так и *in vitro*, при использовании препаратов ИФН противовирусный эффект отмечался только при их профилактическом применении, т.е. при экзогенном внесении до момента инфицирования [11, 19, 22–26]. Интересные исследования проводились с применением препарата индуктора интерферонов — тилорона, который известен в России с 1970-х годов. В кратком сообщении [27] имеется информация о положительном результате использования индуктора ИФН для подавления репликации ЧИКВ *in vitro* при профилактической обработке клеток линии Vero.

С учетом отсутствия специфических препаратов для лечения лихорадки Чикунгунья в настоящей работе был исследован появившийся на отечественном рынке препарат индуктора интерферонов Радамин®Виро против ЧИКВ в модели *in vitro* с использованием двух клеточных линий — Vero и A549. Клеточная линия Vero (эпителиальные клетки почки африканской зеленой мартишки), дефектная по ИФН, а значит, высокочувствительная к разным вирусам, широко используется для экспериментальных задач, в частности для изучения ЧИКВ, размножение которого сопровождается выраженным цитопатическим эффектом. Клетки линии A549 (клетки карциномы легкого человека) поддерживают устойчивую кинетику размножения ЧИКВ,

идеально подходят для изучения эффекта противовирусных препаратов.

Цель работы — изучение эффективности профилактического применения препарата индуктора интерферонов против вируса Чикунгунья в модели *in vitro*.

В ходе экспериментов дополнительно проводили оценку влияния используемых клеток (линии Vero и A549) на репродукцию ЧИКВ, а также на результаты применения препарата индуктора интерферонов (РНК двуспиральной натриевая соль) и цитокиновый баланс.

Материалы и методы

Материалы

Препарат индуктора интерферонов. В соответствии с инструкцией препарат (Радамин® Виро, АО «Биохимик») представляет собой натриевую соль двуспиральной рибонуклеиновой кислоты *Saccharomyces cerevisiae*. Препарат разводили поддерживающей средой DMEM (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия) до концентраций 500 и 250 мкг/мл.

Клеточные линии Vero и A549. Линия клеток Vero получена из банка посевных клеток ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». В работе использовали линию клеток Vero 145-го пассажа. Линия клеток A549 получена из банка клеток ООО «БиолоТ» (Россия). В паспорте данной линии отмечено, что клетки экспрессируют рецепторы к ИФН. В качестве среды поддержки для обеих линий клеток использовали среду DMEM (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия) с эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (Gibco, США): 5% — для клеток линии Vero, 10% — для A549. Обе клеточные линии культивировали при 37 °C с 5% содержанием CO₂ в термостате.

Вирус ЧИКВ. В экспериментах использовали штамм Nika2021. Нуклеотидная последовательность штамма Nika2021 представлена в GenBank (№ OQ320495.1¹). Выделение и пассирование штамма проводили так же, как описано ранее [28]. В экспериментах доза заражения ЧИКВ была равной 0,0001 MOI (multiplicity of infection — количество инфекционных доз вируса в расчете на одну клетку), что соответствовало показателю тканевой цитопатической дозы, вызывающей гибель 50% клеток, равному 100 ТЦД₅₀/100 мкл.

Методы

Определение титра вируса Чикунгунья. На линии клеток Vero в 96-луночных культуральных планшетах определяли, как описано ранее

[28], титр ЧИКВ. Посев клеток в концентрации 3×10^4 клеток/200 мкл проводили за 48 ч до начала титрования. Готовили десятикратные разведения вируса от 10^{-1} до 10^{-9} в питательной среде DMEM. На одно разведение использовали 8 лунок; в каждую вносили по 25 мкл каждого разведения вируса и добавляли 175 мкл поддерживающей питательной среды с 2% ЭТС. В контрольные лунки с клетками вносили по 200 мкл питательной среды с 2% ЭТС. Планшеты инкубировали при 37 °C в условиях термостата с 5% содержанием CO₂. Результат титрования учитывали на 5-е сутки по выраженному цитопатическому действию и рассчитывали показатель ТЦД₅₀, значение титра вируса выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

Определение содержания РНК ЧИКВ. Проводили методами обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), как было описано ранее [28]; ПЦР-РВ — с использованием оригинальных праймеров и зонда [28]. Амплификация велась на приборе «ДТпрайм» (ООО «НПО «ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: при 95 °C в течение 90 с, далее 40 циклов: при 95 °C — 15 с, при 55 °C — 40 с. Содержание РНК ЧИКВ оценивали по показателю порогового числа циклов ПЦР (C_t), при котором флуоресценция превышает пороговое значение. Расчет пороговых циклов проводили с использованием программного обеспечения к амплификатору «ДТпрайм».

Определение концентраций цитокинов — интерферонов α и γ, интерлейкина 6 и фактора некроза опухоли α. Проводили определение содержания цитокинов в образцах с использованием наборов реагентов (АО «Вектор-Бест», Россия) для иммуноферментного определения концентрации следующих цитокинов:

- ИФН-α — Альфа-Интерферон-ИФА-БЕСТ (кат. номер А-8758);
- ИФН-γ — Гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ (кат. номер А-8752);
- ИЛ-6 — Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ (кат. номер А-8768);
- ФНО-α — Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ (кат. номер А-8756).

Реакцию иммуноферментного определения концентрации цитокинов и учет результатов проводили согласно инструкции производителя в трех повторях.

Дизайн исследования

Для оценки эффективности препарата индуктора интерферонов против ЧИКВ в модели

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2523173327>

in vitro были проведены (табл. 1): анализ значений титра ЧИКВ, оценка содержания РНК ЧИКВ, определение концентрации ряда цитокинов после заражения монослоя клеток Vero и A549. Параллельно с предыдущими этапами работы проводились контрольные исследования продукции цитокинов после внесения препарата в монослой интактных клеток обеих линий; исследования продукции цитокинов, титра ЧИКВ и содержания РНК ЧИКВ после заражения монослоя клеток обеих линий.

Во всех экспериментах засекали 24-луночные планшеты клетками в концентрации 3×10^4 клеток/200 мкл. После формирования клеточного монослоя и удаления из всех лунок культуральной жидкости проводилась основная часть опыта: в меньшую часть лунок вносили поддерживающую среду DMEM, в остальные — либо ЧИКВ, либо препарат — в зависимости от эксперимента. В конце каждого опыта проводили контроль целостности монослоя клеток под микроскопом — через 4, 24, 48, 72 и 96 ч. В эти же сроки отбирали образцы культуральной жидкости для определения целевых показателей эксперимента.

Контрольный опыт «Клетки». Исследовали продукцию цитокинов интактными клетками Vero и A549. После удаления культуральной жидкости из всех 24 лунок со сформировавшимся клеточным монослоем в каждую лунку вносили среду поддержки DMEM — данный момент принимали за начало отсчета времени во всех экспериментах.

Контрольный опыт «Препарат». Исследовали продукцию цитокинов клетками Vero и A549 после обработки каждой линии препаратом в двух разных дозировках (250 и 500 мкг/мл). После общего этапа подготовки к опытам в 20 лунок планшета добавляли только препарат, а в оставшиеся 4 лунки — только среду поддержки для контроля состояния клеток. В указанные сроки отбирали образцы культуральной жидкости для определения концентрации изучаемых цитокинов.

Контрольный опыт «Виррус». Исследовали динамику репликации ЧИКВ и продукции цитокинов при заражении клеток Vero и A549. После общего этапа подготовки к опытам в 20 лунок планшета добавляли ЧИКВ в дозе 100 ТЦД₅₀/100 мкл (0,0001 MOI на клетку),

Таблица 1. Краткая характеристика экспериментов по оценке эффективности препарата индуктора интерферонов против вируса Чикунгунья *in vitro*

Table 1. Overview of *in vitro* experiments to evaluate the interferon inducer efficacy against CHIKV

Эксперимент <i>Experiment</i>	Линия клеток <i>Cell line</i>	ЧИКВ <i>CHIKV</i>	Доза, режим введения препарата <i>Dose, administration schedule</i>	Показатели <i>Parameters</i>
Основные: <i>Main:</i>				
«Профилактика» <i>Prevention</i>	Vero, A549	Штамм Nika2021 <i>Nika2021 strain</i>	250 мкг/мл, 500 мкг/мл; за 4 часа до заражения <i>250 µg/mL, 500 µg/mL; 4 hours before infection</i>	1. ИФН-α, -γ, ИЛ-6, ФНО-α 2. Титр ЧИКВ 3. Содержание РНК ЧИКВ <i>1. IFN-α, IFN-γ, IL-6, TNF-α 2. CHIKV titre 3. CHIKV RNA content</i>
«Экстренная профилактика» <i>Emergency Prevention</i>	Vero, A549	Штамм Nika2021 <i>Nika2021 strain</i>	250 мкг/мл, 500 мкг/мл; одновременно с заражением <i>250 µg/mL, 500 µg/mL; simultaneously with infection</i>	1. ИФН-α, -γ, ИЛ-6, ФНО-α 2. Титр ЧИКВ 3. Содержание РНК ЧИКВ <i>1. IFN-α, IFN-γ, IL-6, TNF-α 2. CHIKV titre 3. CHIKV RNA content</i>
Контрольные: <i>Control:</i>				
«Клетки» <i>Cells</i>	Vero, A549	Нет <i>No</i>	Нет <i>No</i>	ИФН-α, -γ, ИЛ-6, ФНО-α <i>IFN-α, IFN-γ, IL-6, TNF-α</i>
«Препарат» <i>Medicinal Product</i>	Vero, A549	Нет <i>No</i>	250 мкг/мл, 500 мкг/мл <i>250 µg/mL, 500 µg/mL</i>	ИФН-α, -γ, ИЛ-6, ФНО-α <i>IFN-α, IFN-γ, IL-6, TNF-α</i>
«Виррус» <i>Virus</i>	Vero, A549	Штамм Nika2021 <i>Nika2021 strain</i>	Нет <i>No</i>	1. ИФН-α, ИФН-γ, ИЛ-6, ФНО-α 2. Титр ЧИКВ 3. Содержание РНК ЧИКВ <i>1. IFN-α, IFN-γ, IL-6, TNF-α 2. CHIKV titre 3. CHIKV RNA content</i>

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

Примечание. ЧИКВ — вирус Чикунгунья; препарат — РНК двуспиральной натриевой соль; ИФН-α — интерферон α; ИФН-γ — интерферон γ; ИЛ-6 — интерлейкин-6; ФНО-α — фактор некроза опухоли α.

Note. CHIKV, Chikungunya virus; medicinal product, double-stranded RNA sodium salt; IFN-α, interferon-alpha; IFN-γ, interferon-gamma; IL-6, interleukin-6; TNF-α, tumour necrosis factor-alpha.

а в оставшиеся 4 лунки — только среду поддержки для контроля состояния клеток без вируса. В указанные сроки отбирали образцы вирусосодержащей культуральной жидкости, в которой определяли содержание РНК ЧИКВ методом ОТ-ПЦР-РВ, концентрацию изучаемых цитокинов, а также в клетках Vero — значения титра вируса.

Основной эксперимент «Профилактика».

Исследовали влияние препарата на репликацию ЧИКВ в клетках Vero и A549 при «профилактическом» введении препарата (за 4 ч до заражения ЧИКВ). После общего этапа подготовки к опытам в 16 лунок планшета № 1 добавляли препарат в концентрации 250 мкг/мл, а в 8 лунок — среду поддержки: 4 лунки — для контроля клеток, 4 — для контроля вируса. Параллельно в 16 лунок планшета № 2 добавляли препарат в концентрации 500 мкг/мл, а в 8 лунок — среду поддержки (4 лунки — для контроля клеток, 4 — для контроля вируса). Через 4 ч во все лунки, кроме четырех лунок для контроля клеток, добавляли ЧИКВ в дозе 100 ТЦД₅₀/100мкл (0,0001 MOI на клетку). В указанные сроки отбирали образцы вирусосодержащей культуральной жидкости, в которой определяли содержание РНК ЧИКВ методом ОТ-ПЦР-РВ, концентрацию изучаемых цитокинов, а также в клетках Vero — значения титра вируса.

Основной эксперимент «Экстренная профилактика». Исследовали влияние препарата на репликацию ЧИКВ в клетках линий Vero и A549 при одновременном внесении препарата и вируса. После общего этапа подготовки к опытам в 16 лунок планшета № 1 добавляли препарат в концентрации 250 мкг/мл, а в 16 лунок планшета № 2 — в концентрации 500 мкг/мл. В 8 лунок каждого планшета добавляли среду поддержки (4 лунки — для контроля клеток, 4 — для контроля вируса). Одновременно с внесением препарата во все лунки планшетов № 1 и 2 (кроме лунок для контроля клеток) вносили ЧИКВ в дозе 100 ТЦД₅₀/100 мкл (0,0001 MOI на клетку). В указанные сроки отбирали образцы вирусосодержащей культуральной жидкости, в которой определяли содержание РНК методом ОТ-ПЦР-РВ, концентрацию изучаемых цитокинов, а также в клетках Vero — значения титра вируса.

Применение препарата в режиме «Лечение» (после заражения) не проводили, так как, по данным литературы, применение препаратов ИФН, как синтетических, так и натуральных, *in vitro* и *in vivo* после инфицирования ЧИКВ значимого эффекта не приносило [9, 22–26].

Статистический анализ. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартного

пакета программ Microsoft Office Excel 2016, а также пакета программ StatTech². Значения титров ЧИКВ представлены в виде среднего геометрического значения и стандартного отклонения от среднего значения. Концентрация цитокинов и РНК ЧИКВ в методе ОТ-ПЦР-РВ представлена как среднее арифметическое значение и стандартное отклонение. При малой выборке в группе ($n \leq 3$) достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента. Сравнения проводили между максимальными значениями соответствующих показателей; для метода ОТ-ПЦР-РВ — между минимальными значениями. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляцию между показателями оценивали с помощью коэффициента Пирсона (*r*).

Результаты и обсуждение

Сравнение динамики репликации вируса Чикунгунья в линиях клеток Vero и A549

Сравнение проводили на основе полученных данных — значений биологического титра вируса (выраженное в lg ТЦД₅₀/мл) и содержания РНК ЧИКВ (выраженное через C_t).

В контрольном опыте «Клетки» клеточный монослой линий Vero и A549 в динамике и в конечной точке (через 96 ч) не имел признаков цитопатического поражения.

На рисунке 1 представлена динамика активности ЧИКВ, определяемой по значению титров вируса, в клетках обеих линий в контрольном опыте «Вирус», а также в основных экспериментах.

В целом, репликация ЧИКВ в линии клеток Vero через 48 ч превосходила таковую в линии клеток A549 во всех экспериментах ($p < 0,05$), а через 96 ч разница в значениях титров ЧИКВ между линиями клеток стала еще более выраженной ($p < 0,002$). При использовании препарата в обеих дозах в режиме «Профилактика» значение титра ЧИКВ через 48 ч было ниже в обеих линиях клеток относительно контроля, и эта разница сохранялась до конца эксперимента, хотя и менее выражено ($p < 0,05$ для линии Vero, $p < 0,02$ для линии A549).

Применение препарата в обеих дозах (250 и 500 мкг/мл) в режиме «Экстренная профилактика» приводило к достоверной разнице в значениях титра ЧИКВ в обеих линиях клеток через 48 ч относительно контроля ($p < 0,05$ для линии Vero, $p < 0,02$ для линии A549). Однако уже к 72-му часу разница между контролем

² <https://stattech.ru>

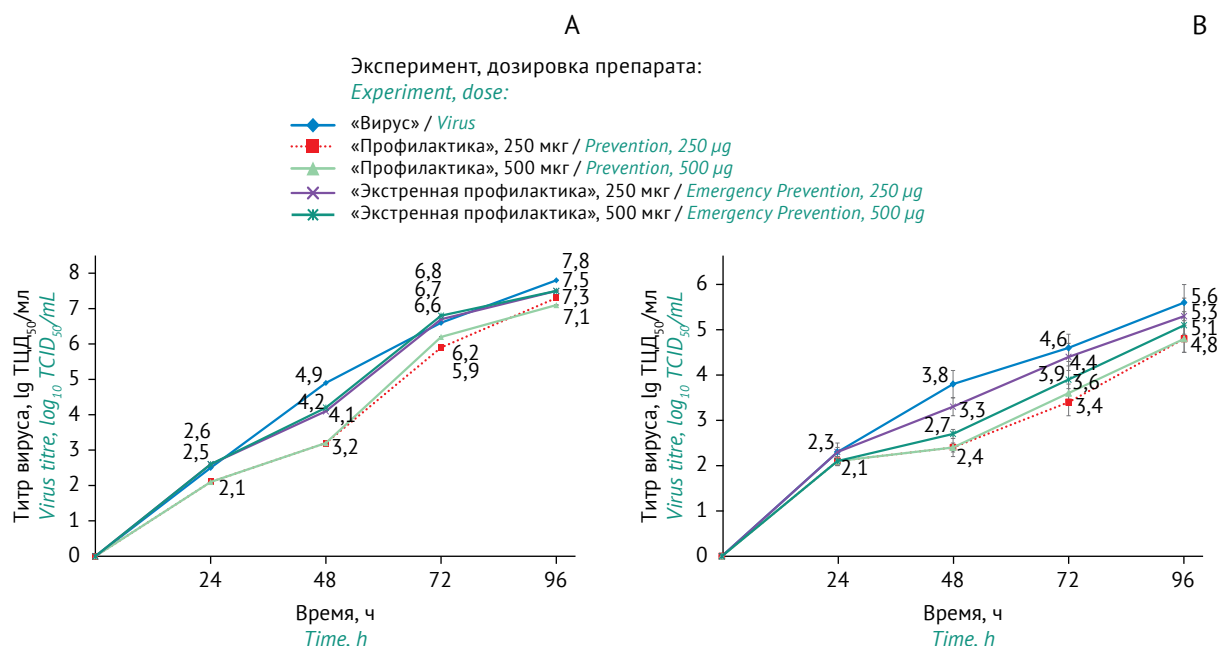


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Динамика активности ЧИКВ в линиях клеток Vero (А) и А549 (В), определяемая методом титрования. Данные представлены в виде lg TCID₅₀/мл как $M \pm m$.

Fig. 1. Time course of CHIKV activity in Vero (A) and A549 (B) cell lines, tested by titration. Data are presented as log₁₀ TCID₅₀/mL ($M \pm m$).

и основным экспериментом в линии клеток Vero исчезала, а через 96 ч разница в значениях титров ЧИКВ между контролем и основным экспериментом была недостоверна и в линии клеток A549 ($p > 0,05$). При сравнении титра ЧИКВ в клетках при использовании препарата в одном и том же режиме, но в разных дозах, статистическая разница отсутствовала ($p > 0,05$).

На рисунке 2 представлена динамика количества РНК ЧИКВ в линиях клеток Vero и A549, определяемого методом ОТ-ПЦР-РВ по показателю порогового цикла флуоресценции (C_t) в указанные часы наблюдения.

Содержание вирусной РНК в динамике во всех экспериментах по данным ОТ-ПЦР-РВ коррелировало со значениями титра вируса, коэффициент корреляции r для линий клеток Vero и A549: $-0,98$ и $-0,96$ соответственно. Динамика содержания РНК ЧИКВ соответствовала динамике значений титра вируса в клетках. В целом, содержание РНК ЧИКВ в линии клеток Vero было значительно выше, чем в линии клеток A549 ($p < 0,002$ при дозировке препарата 250 мкг/мл, $p < 0,0005$ при дозировке препарата 500 мкг/мл), во всех экспериментах. Через 96 ч в обеих линиях клеток в эксперименте «Профилактика» содержание РНК ЧИКВ было значительно ниже относительно контрольного опыта «Виррус» ($p < 0,002$ для линии Vero, $p < 0,0003$ для линии A549).

При применении препарата в режиме «Экстренная профилактика» содержание РНК ЧИКВ через 96 ч было статистически ниже относительно значений в контрольном опыте «Виррус» ($p < 0,05$ для линии Vero, $p < 0,003$ для линии A549), хоть и менее значимо, чем в режиме «Профилактика». Статистическая разница между результатами применения препарата в двух режимах в одной и той же линии клеток была недостоверна ($p > 0,05$). При сравнении значений титра ЧИКВ в клетках после применения препарата в одном и том же режиме, но в разных дозах, статистическая разница отсутствовала ($p > 0,05$).

Следует отметить, что содержание РНК ЧИКВ (по результатам ОТ-ПЦР-РВ) оказалось более наглядным показателем и позволило статистически подтвердить положительное влияние препарата. Данный феномен не был выявлен при определении титра ЧИКВ в культуре клеток. Учитывая тесную корреляцию между результатами двух методов, можно оценить метод ОТ-ПЦР-РВ как более чувствительный.

Сравнение динамики продукции цитокинов в клеточных линиях Vero и A549

На рисунках 3–6 представлена динамика продукции изученных цитокинов в обеих линиях клеток. В целом, препарат стимулировал продукцию ИФН (рис. 3–4): в большем количестве — ИФН- α , в меньшем — ИФН- γ ; в большей степени

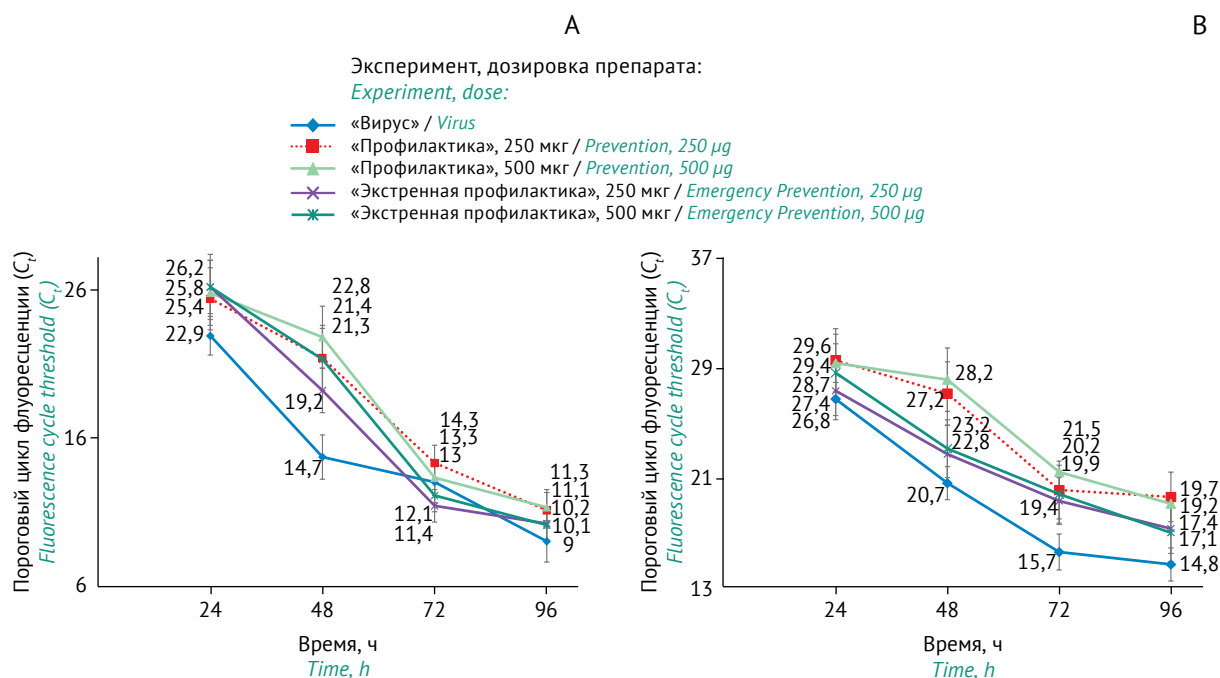


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Динамика содержания РНК ЧИКВ в линиях клеток Vero (А) и А549 (В), определяемой методом ОТ-ПЦР-РВ по показателю порогового цикла флуоресценции (C_t). Данные представлены в виде $M \pm m$.

Fig. 2. Time course of CHIKV RNA levels in Vero (A) and A549 (B) cell lines, tested by real-time RT-PCR using the fluorescence cycle threshold (C_t). Data are presented as $M \pm m$.

при дозе 500 мкг/мл, в меньшей — при дозе 250 мкг/мл; в большем количестве — в линии клеток А549, в меньшем — в линии Vero.

Прямой корреляции между активностью ЧИКВ и содержанием РНК ЧИКВ с продукцией ИФН, как α , так и γ , не выявлено.

Производство интерферона- γ . На рисунке 3 отражена динамика продукции ИФН- γ в линии клеток А549. В линии клеток Vero в контроле «Виррус» и в обоих основных экспериментах ИФН- γ не определялся на всем протяжении наблюдения, а в контроле «Препарат» были зарегистрированы минимальные концентрации данного цитокина при дозировках 250 и 500 мкг/мл ($1,8 \pm 0,2$ и $1,6 \pm 0,2$ пг/мл соответственно) лишь однократно в точке «48 ч» ($p > 0,05$). В обоих контрольных экспериментах «Клетки» ИФН- γ не определялся на всем протяжении наблюдения.

В контрольных опытах в линии клеток А549 наблюдения за содержанием ИФН- γ показали следующее: «Виррус» — цитокин обнаружен однократно через 48 ч после заражения (рис. 3); «Препарат» — выявлен в максимальных концентрациях уже через 24 ч, его содержание было достоверно выше при дозировке препарата 500 мкг/мл ($p < 0,005$), чем при 250 мкг/мл.

В основных экспериментах в линии клеток А549 наличие ИФН- γ отмечено через 4 ч.

Максимальный уровень ИФН- γ при введении препарата в дозе 250 мкг/мл в обоих режимах (за 4 ч до заражения и одновременно с ним) практически не отличался от такового в контроле «Виррус» ($p > 0,05$). Однако при введении препарата в дозе 500 мкг/мл максимальный уровень ИФН- γ в линии клеток А549 при обоих режимах применения оказался достоверно выше, чем в контроле «Виррус» ($p < 0,01$). При режиме «Экстренная профилактика» через 96 ч ИФН- γ практически не определялся в линии клеток А549. На концентрацию ИФН- γ доза препарата оказывала более сильное влияние, чем режим.

Производство интерферона- α . В контрольных опытах «Препарат» максимальные значения ИФН- α отмечены в обеих линиях клеток через 4 ч, статистически продукция цитокина в линии клеток А549 была выше ($p < 0,002$ для обеих доз препарата) относительно линии клеток Vero. В динамике продукция ИФН- α значительно снижалась, однако оставалась выше уровня, пройденного в точке «2 ч» ($p < 0,005$ для обеих линий клеток). В основных экспериментах концентрация ИФН- α в максимальных значениях в линии клеток Vero (рис. 4 А) была статистически ниже, чем в контрольном опыте «Препарат» ($p < 0,003$ для режима «Профилактика» и $p < 0,001$ для режима «Экстренная профилактика»). Концентрации

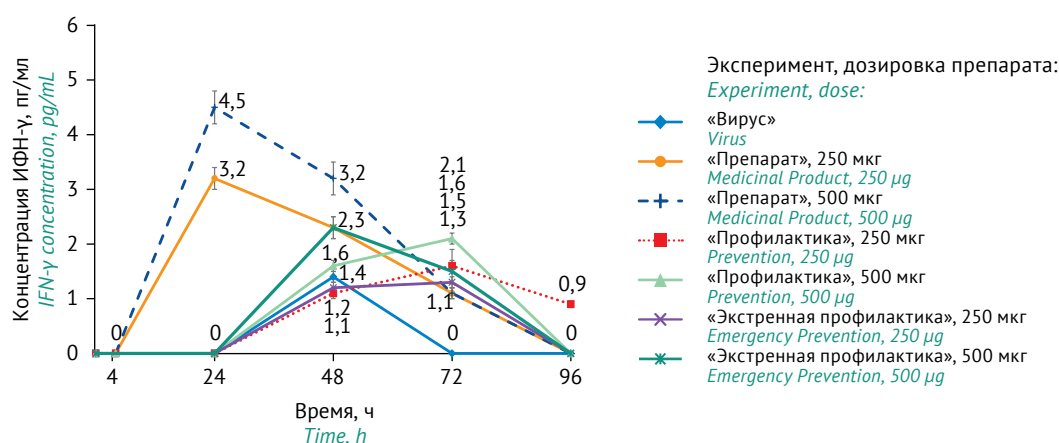


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Динамика продукции ИФН- γ в линии клеток A549, определяемого методом иммуноферментного анализа. Данные представлены как $M \pm m$.

Fig. 3. Time course of IFN- γ production by A549 cells, tested by enzyme immunoassay. Data are presented as $M \pm m$.

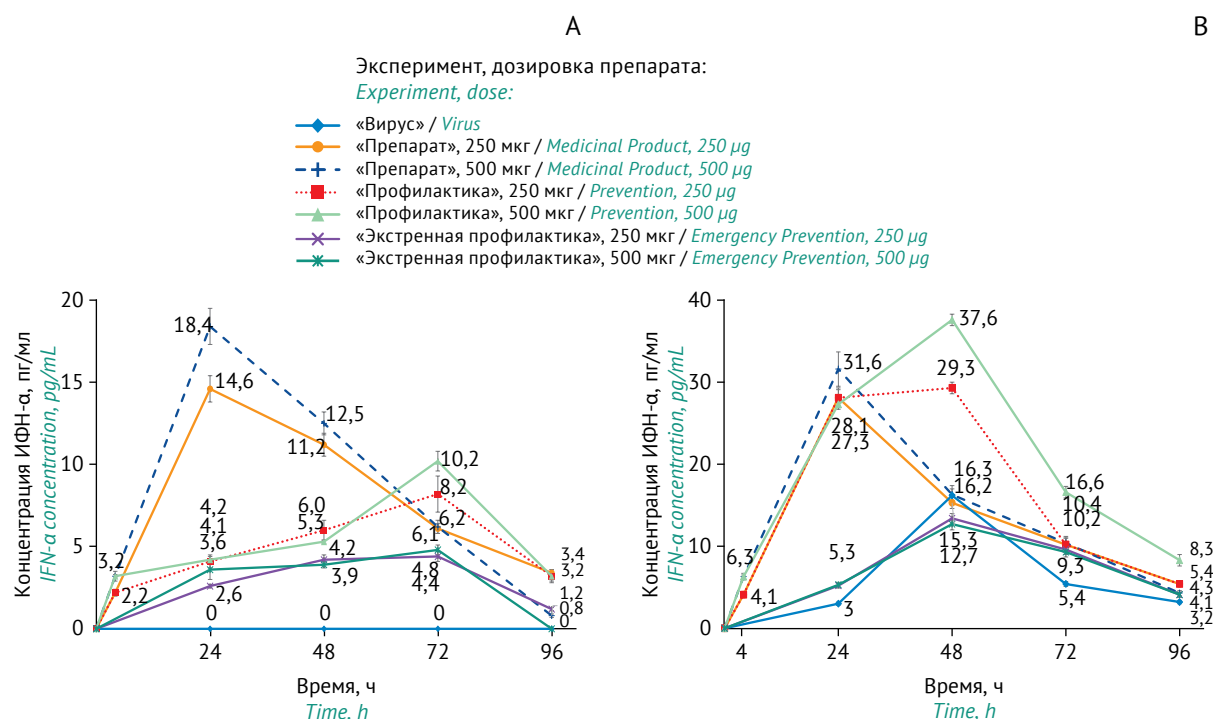


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Динамика продукции ИФН- α в линиях клеток Vero (A) и A549 (B), определяемого методом иммуноферментного анализа. Данные представлены в виде $M \pm m$. Продукция ИФН- α отсутствовала на всем протяжении наблюдения: в контрольных опытах «Клетки» (в линиях Vero и A549) и «Вирус» (в линии Vero).

Fig. 4. Time course of IFN- α production by Vero (A) and A549 (B) cells, tested by enzyme immunoassay. Data are presented as $M \pm m$. No IFN- α production was observed in the Cells control experiments (both Vero and A549 cell lines) and in the Virus control experiment (Vero cell line).

ИФН- α в линии клеток Vero были статистически ниже относительно соответствующих концентраций в линии клеток A549 ($p < 0,001$ для обоих режимов применения препарата). Продукция ИФН- α в линии клеток A549 только при режиме

«Экстренная профилактика» была ниже, чем в контроле «Препарат» ($p < 0,001$), но неожиданно также ниже, чем в контроле «Вирус» ($p < 0,005$). В исследовании «Профилактика» продукция ИФН- α существенно превосходила таковую

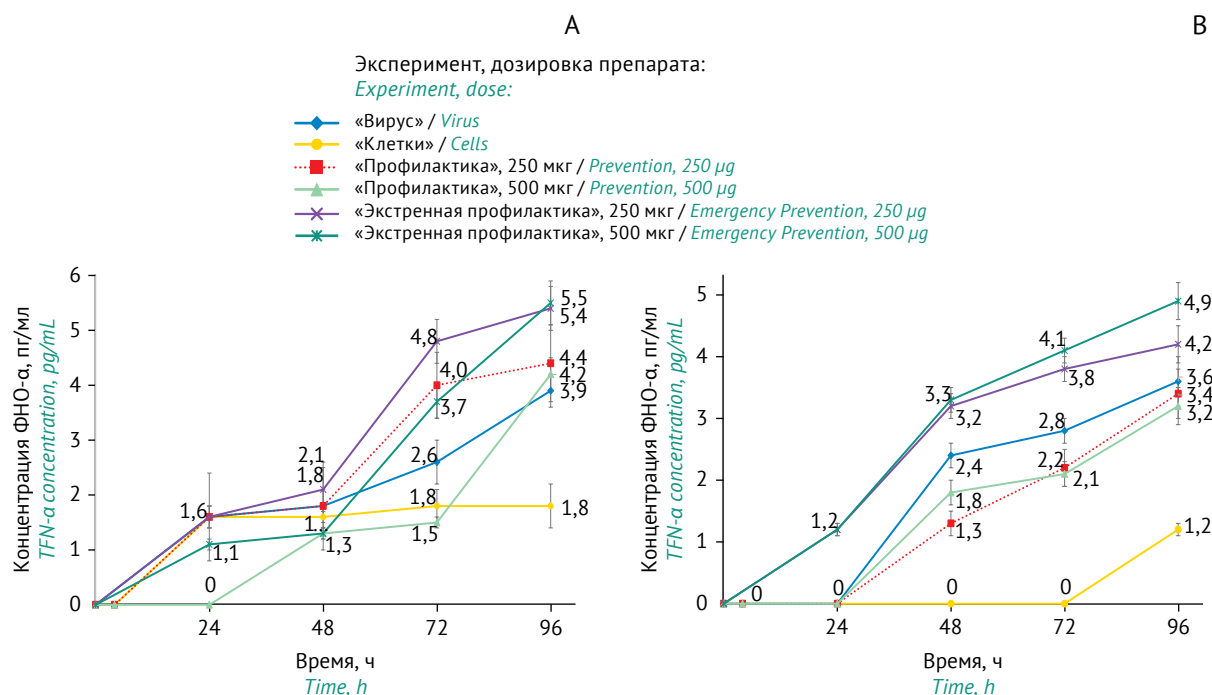


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Динамика продукции ФНО-α в линиях клеток Vero (А) и А549 (В), определяемого методом иммуноферментного анализа. Данные представлены в виде $M \pm m$. В контрольном опыте «Препарат» в обеих линиях клеток ФНО-α определялся только в точке «96 ч» в тех же концентрациях, что и в контрольном опыте «Клетки» ($p > 0,05$).

Fig. 5. Time course of TNF-α production by Vero (A) and A549 (B) cells, tested by enzyme immunoassay. Data are presented as $M \pm m$. TNF-α was observed in both cell lines in the Medicinal Product control experiments only at the time point of 96 h at the same concentrations as in the Cells control experiment ($p > 0,05$).

в контрольных опытах «Вирус» ($p < 0,001$) и была близка к значениям, полученным в контрольном исследовании «Препарат» для соответствующих доз. Влияние на продукцию ИФН-α режима применения и доз препарата при его профилактическом введении было очевидным, что продемонстрировано на рис. 4 для обеих линий клеток.

Производство фактора некроза опухоли α. Максимальные значения концентрации ФНО-α зафиксированы в конце периода наблюдения во всех экспериментах для обеих линий клеток. В контрольном опыте «Клетки» в линии А549 продукция ФНО-α была обнаружена только в точке «9 ч» в отличие от линии клеток Vero, в которых продукция была отмечена уже через 24 ч (рис. 5). При сравнении значений концентраций ФНО-α в контрольном исследовании «Вирус» статистически достоверного различия между данными показателями для линий А549 и Vero не выявлено. Однако был отмечен более высокий уровень продукции этого цитокина в линии клеток Vero относительно такового в линии А549 в основных экспериментах ($p < 0,002$ при дозировке препарата 250 мкг/мл, $p < 0,0005$ при дозировке препарата 500 мкг/мл). Продукция ФНО-α в линии клеток Vero в основных экспериментах оказалась

выше, чем в контрольном исследовании «Вирус» (рис. 5 А), но статистически разница была достоверна только в эксперименте «Экстренная профилактика» ($p < 0,05$).

Аналогичная динамика продукции ФНО-α наблюдалась в линии клеток А549, но только для режима применения препарата «Экстренная профилактика» ($p < 0,01$), а вот для режима «Профилактика» отмечалась тенденция к снижению продукции ФНО-α относительно контроля «Вирус», но разница была статистически значима только в случае введения дозы препарата 500 мкг/мл ($p < 0,05$). Выявлена сильная прямая корреляция между содержанием ФНО-α и титром ЧИКВ в клетках (r от 0,95 до 0,83), а также сильная обратная корреляция с содержанием РНК ЧИКВ (r от -0,97 до -0,81) в обеих линиях клеток во всех экспериментах с заражением ЧИКВ.

Производство интерлейкина-6. В контрольном исследовании «Клетки» концентрация ИЛ-6 была статистически выше ($p < 0,002$) в клетках Vero на всем протяжении эксперимента, с максимальными значениями через 96 ч ($p < 0,005$) (рис. 6). В контрольном опыте «Препарат» (по сравнению с контрольным опытом «Клетки») продукция

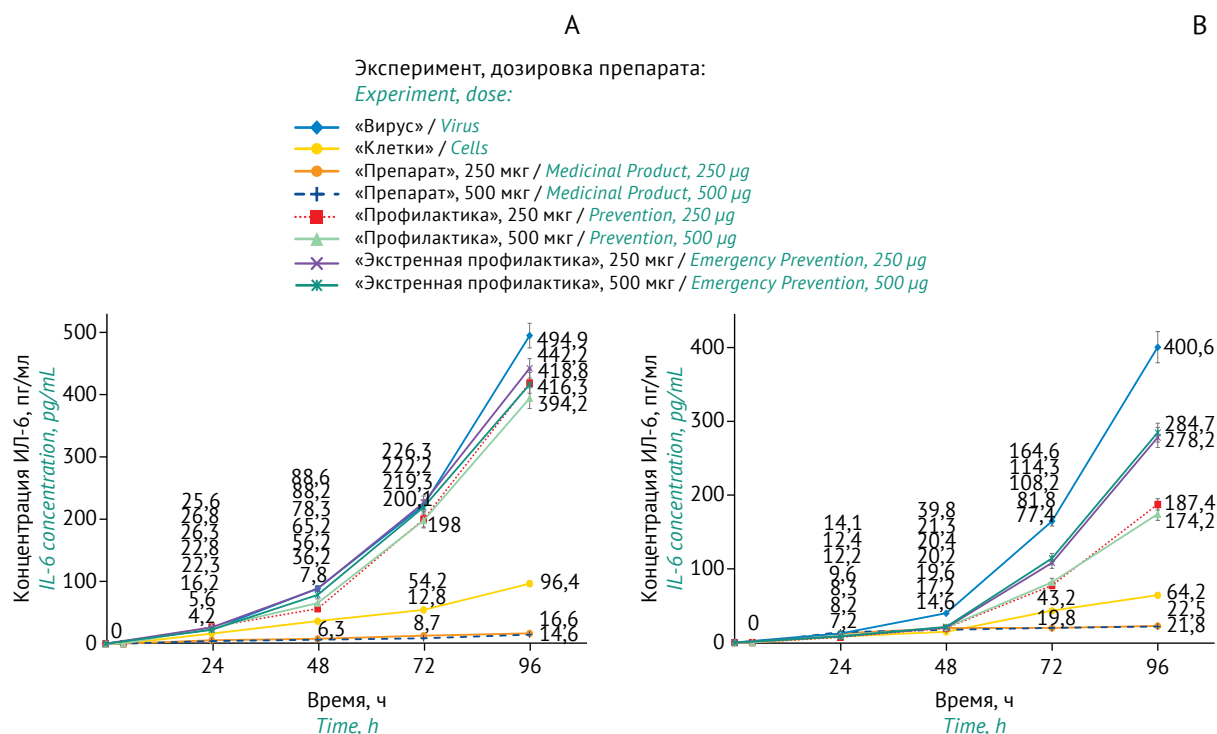


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Динамика продукции ИЛ-6 в линиях клеток Vero (A) и A549 (B), определяемого методом иммуноферментного анализа. Данные представлены в виде $M \pm m$.

Fig. 6. Time course of IL-6 production by Vero (A) and A549 (B) cells, tested by enzyme immunoassay. Data are presented as $M \pm m$.

ИЛ-6 достоверно снизилась ($p < 0,0005$) в обеих линиях клеток и в случае обеих доз препарата. Так, в клетках Vero продукция ИЛ-6 снизилась в 6 раз, а в клетках A549 – в 3 раза.

Продукция ИЛ-6 в основных экспериментах была статистически ниже, чем в контрольном исследовании «Виррус», как в линии Vero, так и в линии A549 ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно). Значительнее всего продукция ИЛ-6 была снижена по сравнению с показателем контрольного опыта «Виррус» в эксперименте «Профилактика» при введении дозы препарата 500 мкг/мл в линии клеток и Vero, и A549 ($p < 0,003$ и $p < 0,0003$ соответственно). Была выявлена сильная прямая корреляция между значениями содержания ИЛ-6 и титра ЧИКВ в клетках (r от 0,92 до 0,83), а также сильная обратная корреляция с содержанием РНК ЧИКВ (r от $-0,97$ до $-0,85$) в обеих линиях клеток во всех экспериментах с заражением ЧИКВ.

Обсуждение

Выраженный тропизм вируса к разным клеткам и тканям определяет достаточно широкий спектр клинических симптомов ЧИКВ-инфекции у человека. Тропизм ЧИКВ к разным линиям клеток проявляется в виде устойчивой репликации

вируса *in vitro*. Широко и традиционно используемые для доклинических исследований клетки линии Vero не продуцируют ИФН I типа за счет потери кластера генов ИФН I типа [16, 17] и являются дефектными по продукции ИФН α -1/13, α -2, α -4, α -6, α -8, α -14, α -17, α -21, β -1 и ω -1 [16]. Данный феномен позволяет использовать линию клеток Vero для наработки вирусов, а также для изучения *in vitro* прямого противовирусного действия тех или иных препаратов, в нашем исследовании – против ЧИКВ. Однако ранее E.J. Franco и соавт. показали, что чувствительность ЧИКВ к противовирусным препаратам *in vitro* меняется в широких пределах в зависимости от использованной клеточной линии [24]. Обнаруженная особенность подчеркивает необходимость более тщательного выбора линии клеток в зависимости от цели исследования, что особенно важно в доклинических исследованиях противовирусных препаратов. В настоящем исследовании в контрольных опытах была продемонстрирована дефектность клеток линии Vero (по продукции ИФН), которая в значительной степени повлияла на активность ЧИКВ – она ожидаемо оказалась существенно выше в данной клеточной линии. К тому же влияние препарата Радамин®Виро на продукцию ИФН- γ

было выявлено и статистически подтверждено только в линии клеток A549.

При помощи метода ОТ-ПЦР-РВ разница в эффектах применения препарата в разных режимах была подтверждена статистически. Можно сделать вывод, что клеточная линия A549 обладает объективным преимуществом (относительно линии Vero) для изучения влияния препарата индуктора ИФН на противовирусные факторы клеток при заражении ЧИКВ. Следует подчеркнуть, что, по данным мониторинга титра ЧИКВ в клетках, преимущество режима «Профилактика» не было убедительным по сравнению с экстренной профилактикой. Представляется оправданным применение двух методов контроля активности вируса при изучении эффективности противовирусных препаратов *in vitro*.

В настоящем исследовании и некоторых других работах [23, 24, 26] отмечается определенный эффект применения экзогенного ИФН против ЧИКВ-инфекции *in vitro* в линии клеток Vero. Однако эффект был кратковременным и отмечался исключительно при внесении больших, сверхтерапевтических доз препаратов [23, 24, 26]. Клетки линии Vero обладают рецепторами к ИФН и, следовательно, могут реагировать на экзогенное внесение ИФН [16]. Можно предположить, что если в опытах использовать не дефектную по ИФН линию клеток, например A549, то возможно обнаружить эффект и от обычных, терапевтических доз ИФН. Так, E.J. Franco и соавт. показали, что ИФН-α в дозе 10 МЕ/мл и более значительно снижал репликацию ЧИКВ в клетках A549, что не наблюдалось в клетках Vero [24].

Исследуемый препарат индуктора ИФН Радамин®Виро — по сути аналог препарата Ридостин (ООО «Диафарм», Россия) и так же представляет собой натриевую соль двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (дсРНК), выделенную из *S. cerevisiae*. Механизм индукции ИФН дсРНК природного происхождения или синтетическими полинуклеотидами в целом совпадает с процессами, происходящими при индукции ИФН вирусами. Изначально происходит связывание индуктора ИФН на рецепторах чувствительных к данному индуктору клеток, далее инициируется проникновение индуктора внутрь клетки, в результате начинается экспрессия интерферон-стимулированных генов (ИСГ), их транскрипция, синтез мРНК-ИФН, трансляция и собственно продукция ИФН [29]. Таким образом, при введении в организм дсРНК стимулирует образование эндогенных ИФН-α, ИФН-β и ИФН-γ, важнейших цитокинов иммунного

ответа, которые индуцируют дифференцировку миелоидных клеток, стимулируют фагоцитоз нейтрофилов и макрофагов, активируют натуральные киллеры, усиливают Т-хелперный ответ Th1-типа и таким образом запускают врожденный и адаптивный иммунный ответ. Влияние ридостина как препарата индуктора ИФН на транскрипцию генов семейства ИФН в фибробластах и лимфоцитах человека было изучено ранее с помощью количественной ПЦР-РВ, что проявилось в увеличении транскрипции генов ИФН-β, олигоаденилатсинтетазы и дсРНК-зависимой протеинкиназы [30].

В наших экспериментах Радамин®Виро оказал выраженное стимулирующее действие на продукцию ИФН-α и более слабое воздействие на продукцию ИФН-γ, что, прежде всего, было подтверждено результатами контрольных экспериментов в интактных клетках. Опосредованное противовирусное действие препарата было подтверждено двумя методами в основных экспериментах. Данное воздействие было временным при однократном применении препарата. Влияние препарата было подтверждено в контрольном эксперименте только в линии клеток A549.

Предполагается, что действие препарата индуктора ИФН не ограничивается только индукцией ИФН, но может также предотвратить и (или) восстановить вызываемые вирусами нарушения в цитокиновой сети [31]. Вероятно, в настоящей работе впервые экспериментально исследовалось влияние Радамина®Виро на продукцию *in vitro*, кроме ИФН, таких цитокинов как ФНО-α и ИЛ-6. Продукция цитокинов в процессе жизнедеятельности клеток в состоянии монослоя была подтверждена в наших экспериментах продукцией ИЛ-6 и ФНО-α. Более того, концентрации данных цитокинов отличались между линиями клеток. Данный феномен следует принимать во внимание при исследовании *in vitro* цитокинового баланса в клетках под воздействием вирусов или тех или иных препаратов. Более того, спектр изучения исходной продукции цитокинов, который, безусловно, будет зависеть от используемой линии, должен быть достаточно широким. После однократного введения препарата продукция ФНО-α была подавлена на некоторое время, а продукция ИЛ-6 была значительно снижена до конца эксперимента в обеих линиях клеток относительно таковой в контрольных опытах «Вирус». Данный феномен можно расценить как смещение баланса в цитокиновой сети в сторону продукции ИФН при стимулирующем влиянии индуктора ИФН на ИСГ.

Как и все альфа-вирусы, ЧИКВ в клетках млекопитающих в основном вызывает драматическое отключение экспрессии генов хозяина, что приводит к супрессии врожденного иммунитета [1]. Ранее было показано, что, как только ЧИКВ начинает размножаться, его резистентность к экзогенному применению ИФН I и II типов препятствует их эффективности [2, 11]. После инфицирования ЧИКВ применение препаратов ИФН, как синтетических, так и натуральных, *in vitro* или на лабораторных животных значимого эффекта не приносило [11, 22–26]. Исследования С. Schilte и соавт. показали, что прямой противовирусный эффект ИФН I типа при ЧИКВ-инфицировании реализуется через индукцию одного или нескольких ИСГ [18]. На сегодняшний день насчитывается более 300 ИСГ. Известно, что ИФН-λ, как и ИФН-α/β, индуцируют практически одни и те же группы ИСГ [32].

М. Plotnikova и соавт. [26] проведены интересные исследования, в которых изучалась противовирусная активность рекомбинантного ИФН-λ. Подавление репликации ЧИКВ было продемонстрировано только при превентивном применении больших доз рекомбинантного человеческого ИФН-λ, также была отмечена определенная «провокация» репликации ЧИКВ в случае применения рекомбинантного ИФН-λ сразу после заражения линии клеток Vero [26]. Можно предположить конкуренцию и (или) антагонизм между ЧИКВ и препаратами индукторов ИФН (или ИФН) в борьбе за те или иные ИСГ. Исходя из этого предположения можно объяснить меньший эффект от введения препарата в режиме «Экстренная профилактика» (одновременно с заражением) в нашем исследовании, а также практически отсутствие эффекта при применении препаратов ИФН и индукторов ИФН в качестве терапевтического средства [11, 22–26].

Ранее были опубликованы краткие результаты экспериментов *in vitro*, в которых еще один препарат индукторов ИФН – тилорон продемонстрировал эффективность в профилактическом режиме применения против ЧИКВ [27]. В настоящих исследованиях применение

препарата в режиме «Профилактика» (до заражения) имело выраженное преимущество, однако и в режиме «Экстренная профилактика» препарат позволял сдерживать репликацию ЧИКВ и влиять на баланс цитокинов. Следует подчеркнуть, что в наших исследованиях Радамин®Виро применяли однократно.

Учитывая положительные результаты проведенных исследований и демонстративное преимущество линии клеток A549, далее планируется продолжить изучение эффективности препарата в линии клеток A549 с двукратным применением и в комбинации режимов «Профилактика – Лечение» и «Экстренная профилактика – Лечение» с целью поддержания продукции ИФН в течение всего периода инфицирования ЧИКВ. Также можно исследовать эффективность препарата в режиме «Лечение» на линии клеток A549 и расширить спектр изучаемых цитокинов.

Заключение

В результате экспериментальной работы обнаружен положительный противовирусный эффект превентивного применения препарата индуктора ИФН против вируса Чикунгунья *in vitro*, который был получен не только за счет стимулирования продукции цитокинов, прежде всего ИФН, но и за счет опосредованного влияния на уровень содержания ФНО-α и ИЛ-6.

Полученные данные свидетельствуют о преимуществе использования линии клеток A549 (относительно традиционно применяемой линии клеток Vero) для изучения противовирусного влияния препарата индуктора ИФН.

Продукция некоторых видов цитокинов в процессе жизнедеятельности клеток в моно-слое, выявленная в нашем эксперименте, обусловливает необходимость изучения исходной картины цитокинового баланса в разных линиях клеток *in vitro*.

Дальнейшие исследования подбора оптимальной схемы применения индуктора ИФН против вируса Чикунгунья планируется проводить с использованием линии клеток A549 и расширением спектра изучаемых цитокинов.

Литература/References

1. Kuhn RJ. *Togaviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields Virology*. Vol. 1. 5th ed. Wolters Kluwer, Lippincott-Williams & Wilkins; 2007. P. 1001–2.
2. Fros JJ, Pijlman GP. Alphavirus infection: host cell shut-off and inhibition of antiviral responses. *Viruses*. 2016;8(6):166. <https://doi.org/10.3390/v8060166>
3. Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, Leroy EM. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *J Infect Dis*. 2011;204(1):115–23. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq006>
4. Davenport BJ, Bullock C, McCarthy MK, Hawman DW, Murphy KM, Kedl RM, et al. Chikungunya virus evades antiviral CD8T cell responses to establish

- persistent infection in joint-associated tissues. *J Virol.* 2020;16(94):e02036-19.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02036-19>
5. Schilte C, Staikovsky F, Couderc T, Madec Yo, Carpentier F, Kassab S, et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2137.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002137>
 6. Marimoutou C, Ferraro J, Javelle E, Deparis X, Simon F. Chikungunya infection: self-reported rheumatic morbidity and impaired quality of life persist 6 years later. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(7):688–93.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.024>
 7. Burt J F, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(4):e107–17.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30385-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30385-1)
 8. Devaux CA. Emerging and re-emerging viruses: a global challenge illustrated by Chikungunya virus outbreaks. *World J Virol.* 2012;1(1):11–22.
<https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i1.11>
 9. Harrison VR, Eckels KH, Bartelloni PJ, Hampton C. Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. *J Immunol.* 1971;107(3):643–7.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.107.3.643>
 10. Broeckel R, Haese N, Messaoudi I, Streblow DN. Nonhuman primate models of Chikungunya virus infection and disease (CHIKV NHP Model). *Pathogens.* 2015;4(3):662–81.
<https://doi.org/10.3390/pathogens4030662>
 11. Gardner CL, Burke CW, Higgs ST, Klimstra WB, Ryman KD. Interferon-alpha/beta deficiency greatly exacerbates arthritogenic disease in mice infected with wild-type Chikungunya virus but not with the cell culture-adapted live-attenuated 181/25 vaccine candidate. *Virology.* 2012;425(2):103–12.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.020>
 12. Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e29.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040029>
 13. Ziegler SA, Lu L, da Rosa AP, Xiao SY, Tesh RB. An animal model for studying the pathogenesis of Chikungunya virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(1):133–9.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.133>
 14. Battisti V, Urban E, Langer T. Antivirals against the Chikungunya virus. *Viruses.* 2021;13(7):1307.
<https://doi.org/10.3390/v13071307>
 15. Emeny JM, Morgan MJ. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J Gen Virol.* 1979;43(1):247–52.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247>
 16. Osada N, Kohara A, Yamaji T, Hirayama N, Kasai F, Sekizuka T, et al. The genome landscape of the African green monkey kidney-derived Vero cell line. *DNA Res.* 2014;21(6):673–83.
<https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>
 17. Konishi K, Yamaji T, Sakuma C, Kasai F, Endo T, Kohara A, et al. Whole-genome sequencing of Vero E6 (Vero C1008) and comparative analysis of four Vero cell sublines. *Front Genet.* 2022;13:801382.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.801382>
 18. Schilte C, Couderc T, Chretien F, Sourisseau M, Gangneux N, Guivel-Benhassine F, et al. Type I IFN controls Chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J Exp Med.* 2010;207(2):429–42.
<https://doi.org/10.1084/jem.20090851>
 19. White LK, Sali T, Alvarado D, Gatti E, Pierre P, Streblow D, Defilippis VR. Chikungunya virus induces IPS-1-dependent innate immune activation and protein kinase R-independent translational shutoff. *J Virol.* 2011;85(1):606–20.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00767-10>
 20. Cook LE, Locke MC, Young AR, Monte K, Hedberg ML, Shimak RM, et al. Distinct roles of interferon alpha and beta in controlling Chikungunya virus replication and modulating neutrophil-mediated inflammation. *J Virol.* 2019;94(1):e00841-19.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00841-19>
 21. Chirathaworn C, Chansaenroj J, Poovorawan Y. Cytokines and chemokines in Chikungunya virus infection: protection or induction of pathology. *Pathogens.* 2020;9(6):415.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9060415>
 22. Fros JJ, Liu WJ, Prow NA, Geertsema C, Ligtenberg M, Vanlandingham DL, et al. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J Virol.* 2010;84(20):10877–87.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00949-10>
 23. Gallegos KM, Drusano GL, Argenio DZ, Brown AN. Chikungunya virus: *in vitro* response to combination therapy with ribavirin and interferon alfa 2a. *J Infect Dis.* 2016;214(8):1192–7.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiw358>
 24. Franco EJ, Rodriguez JL, Pomeroy JJ, Hanrahan KC, Brown AN. The effectiveness of antiviral agents with broad-spectrum activity against chikungunya virus varies between host cell lines. *Antivir Chem Chemother.* 2018;26:2040206618807580.
<https://doi.org/10.1177/2040206618807580>
 25. Grabarz F, Lopes APY, Barbosa FF, Barazzzone GC, Santos JC, Botosso VF, et al. Strategies for the production of soluble interferon-alpha *Consensus* and potential application in arboviruses and SARS-CoV-2. *Life (Basel).* 2021;11(6):460.
<https://doi.org/10.3390/life11060460>
 26. Plotnikova M, Lozhkov A, Romanovskaya-Romanko E, Baranovskaya I, Sergeeva M, Kaa K, et al. IFN-λ1 Displays various levels of antiviral activity *in vitro* in a select panel of RNA viruses. *Viruses.* 2021;13(8):1602.
<https://doi.org/10.3390/v13081602>
 27. Ekens S, Madrid PB, Tilorone, a broad-spectrum antiviral for emerging viruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(5):e00440-20.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00440-20>
 28. Игнатьев ГМ, Каа КВ, Оксанич АС, Антонова ЛП, Самарцева ТГ, Мефед КМ и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах

- рода *Aedes* spp., отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(3):227–32.
Ignatyev GM, Kaa KV, Oksanich AS, Antonova LP, Samartseva TG, Mefed KM, et al. Indication and identification of Dengue and Chikungunya viruses in *Aedes* spp. mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(3):227–32 (In Russ.).
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>
29. Gantier MP, Williams BR. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(5–6):363–71.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.06.016>
30. Sokolova TM, Shuvalov AN, Telkov MV, Kolyadzhnaya LV, Ershov FI. Ridostin induces transcription of a wide spectrum of interferon genes in human cells. *Bull Exp Biol Med*. 2013;156(2):213–6.
<https://doi.org/10.1007/s10517-013-2313-z>
31. Полосков ВВ, Ершов ФИ. Активаторы синтеза эндогенных интерферонов (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(1):188–92.
Poloskov VV, Ershov FI. Activation of synthesis of endogenous interferon (review). *Drug Development & Registration*. 2017;(1):188–92 (In Russ.).
EDN: [YKPHKX](https://elibrary.ru/ykphkx)
32. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: what do they all do? *Annu Rev Virol*. 2019;6(1):567–84.
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Отрашевская** – анализ и интерпретация результатов исследований, статистическая обработка данных, написание и оформление текста; **К.В. Каа** – участие в экспериментальных исследованиях, интерпретация результатов исследований, работа с графическим материалом; **Т.Г. Самарцева** – участие в экспериментальных исследованиях; **А.С. Оксанич** – разработка дизайна, концепции и проведение молекулярно-биологических исследований, критический анализ текста рукописи; **Г.М. Игнатьев** – разработка дизайна исследований; руководство и непосредственное участие в выполнении исследования; утверждение окончательной версии статьи для публикации; ответственность за все аспекты работы, подлежащее изучению и решению вопросов, связанных с достоверностью данных или целостностью всех частей статьи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Otrachevskaja** analysed and interpreted the study results, conducted statistical data analysis, drafted and formatted the manuscript. **K.V. Kaa** conducted experiments, interpreted the study results, and designed the graphical material. **T.G. Samartseva** conducted experiments. **A.S. Oksanich** designed and conceptualised the study, conducted molecular and biological experiments, critically analysed the manuscript. **G.M. Ignatyev** designed the study, supervised and conducted experiments, approved the final version of the manuscript for publication, agreed to be accountable for all aspects of the work and to ensure appropriate investigation and resolution of the issues related to the reliability of data or the integrity of all parts of the work.

Об авторах / Authors

Отрашевская Елена Викторовна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>
e.v.otrashevskaja@mail.ru

Каа Константин Владимирович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>
kaa_23@mail.ru

Самарцева Татьяна Геннадьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Оксанич Алексей Сергеевич, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>
oksanich@yahoo.com

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

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>
marburgman@mail.ru

Elena V. Otrachevskaja

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>
e.v.otrashevskaja@mail.ru

Konstantin V. Kaa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>
kaa_23@mail.ru

Tatiana G. Samartseva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Aleksey S. Oksanich, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>
oksanich@yahoo.com

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

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>
marburgman@mail.ru

Поступила 11.07.2023

После доработки 20.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Received 11 July 2023

Revised 20 November 2023

Accepted 24 November 2023



Перспективы применения метода проточной цитометрии в оценке качества препарата вакцины чумной живой

Н.В. Абзаева , И.В. Кузнецова, С.Е. Гостищева, А.М. Жиров, Д.А. Ковалев, А.В. Костроминов, А.А. Фисун, Г.Ф. Иванова

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

 Абзаева Наталья Вячеславовна; stavnipchi@mail.ru

Резюме

Актуальность. Показатель качества «Количество живых микробных клеток» определяется на всех этапах производства вакцины чумной живой. В настоящее время для определения количества живых микробных клеток используют бактериологический метод. Однако для повышения точности анализа и сокращения времени его проведения перспективным представляется использование метода проточной цитометрии.

Цель. Изучить возможность применения метода проточной цитометрии в оценке качества препарата вакцины чумной живой.

Материалы и методы. Использовали экспериментальные серии вакцины чумной живой (пять серий). Изучение показателя качества «Количество живых микробных клеток» в препарате вакцины проводили бактериологическим методом согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ФС.3.3.1.0022.15). Цитофлуориметрический анализ образцов проводили с использованием флуоресцентного красителя SynaptoGreen.

Результаты. Проведена оценка значения количества живых микробных клеток в образцах вакцин бактериологическим методом, что составило от $27,8 \pm 2,2$ до $56,5 \pm 3,1\%$ (в среднем — $39,8 \pm 5,4\%$), и методом проточной цитометрии — от $29,2 \pm 1,2$ до $59,1 \pm 2,1\%$ (в среднем — $41,7 \pm 5,5\%$). Статистическая обработка данных показала, что результаты контроля качества препарата вакцины, полученные обоими методами, не имели достоверных различий и характеризовались высоким коэффициентом детерминации.

Выводы. Показана целесообразность применения метода проточной цитометрии при контроле качества препарата чумной вакцины при определении количества живых микробных клеток. Высокая информативность, быстрота и простота выполнения анализа делают метод проточной цитометрии более предпочтительным в сравнении с традиционными методами анализа.

Ключевые слова: метод проточной цитометрии; вакцина чумная живая; контроль качества; количество живых микробных клеток; бактериологический метод

Для цитирования: Абзаева Н.В., Кузнецова И.В., Гостищева С.Е., Жиров А.М., Ковалев Д.А., Костроминов А.В., Фисун А.А., Иванова Г.Ф. Перспективы применения метода проточной цитометрии в оценке качества препарата вакцины чумной живой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):560–569. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-560-569>

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

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

Prospects for using flow cytometry in the quality control of live plague vaccines

Natalia V. Abzaeva✉, Irina V. Kuznetsova, Svetlana E. Gostischeva, Andrey M. Zhirov, Dmitry A. Kovalev, Artem V. Kostrominov, Alisa A. Fisun, Galina F. Ivanova

Stavropol Plague Control Research Institute, 13–15 Sovetskaya St., Stavropol 355035, Russian Federation

✉ Natalia V. Abzaeva; stavnipchi@mail.ru

Abstract

Scientific relevance. The number of live bacteria is a quality parameter controlled at all stages of live plague vaccine production. Currently, live microbial cell counting uses a bacteriological method. However, flow cytometry has the potential to increase analytical accuracy and reduce testing time.

Aim. This study aimed at testing the applicability of flow cytometry to assessing the quality of live plague vaccines.

Materials and methods. The study quantified live microbial cells in 5 experimental batches of live plague vaccine as part of their quality control using the bacteriological method according to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (FS.3.3.1.0022.15). Cytofluorometry of the samples used the SynaptoGreen fluorescent dye.

Results. The study quantified live microbial cells in live plague vaccine samples using the bacteriological method and flow cytometry. The results obtained by the bacteriological method ranged from 27.8 ± 2.2 to $56.5 \pm 3.1\%$ with an average of $39.8 \pm 5.4\%$. The results obtained by flow cytometry ranged from 29.2 ± 1.2 to $59.1 \pm 2.1\%$ with an average of $41.7 \pm 5.5\%$. The statistical analysis showed no significant difference between the results of vaccine quality control by both methods, as well as a high coefficient of determination.

Conclusions. The results show that flow cytometry is an appropriate method for the quantification of live microbial cells as part of the quality control of plague vaccines. Being quick, easy, and highly informative, flow cytometry is preferable to traditional methods.

Keywords:

flow cytometry; live plague vaccine; quality control; number of live bacteria; percentage of live microbial cells; bacteriological method

For citation:

Abzaeva N.V., Kuznetsova I.V., Gostischeva S.E., Zhirov A.M., Kovalev D.A., Kostrominov A.V., Fisun A.A., Ivanova G.F. Prospects for using flow cytometry in the quality control of live plague vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):560–569. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-560-569>

Funding. The study was performed without external funding.

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

Введение

Выпускаемый в Российской Федерации¹ препарат вакцины чумной живой представляет собой лиофилизат вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. Препарат применяется по эпидемическим показаниям для специфической иммунопрофилактики. Показатель качества «Количество живых микробных клеток» определяется на всех этапах производства вакцины: получение посевной культуры, накопление биомассы, фасовка препарата, лиофильное высушивание. Данный показатель особенно

важен для подтверждения качества получаемой биомассы. Количество живых микробных клеток препарата определяется не только на этапах изготовления и контроля качества вакцины, но и в течение срока годности, что позволяет изучить стабильность препарата при хранении. Косвенно данный показатель влияет на иммуногенность вакцины — способность обеспечить надежную противои инфекционную защиту.

Согласно нормативной документации на препарат значение показателя «Количество живых микробных клеток» должно составлять

¹ Государственный реестр лекарственных средств https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=a55e6d43-fef5-4c3d-af16-a15f6b065685

не менее 25% от общего числа². В настоящее время в производстве вакцины чумной живой для определения количества живых микробных клеток используют бактериологический метод³. В то же время существует ряд других методов, к которым относятся биохимические и циторефрактометрические методы, а также новые инструментальные подходы (проточная цитофлуориметрия и биолюминесцентные методы), позволяющие оценить физиологическое состояние бактериальной клетки после лиофильного высушивания, в ходе которого из-за повреждения клеточной стенки и цитоплазматической мембраны может происходить частичная гибель клеток.

Бактериологический метод позволяет определять количество живых бактерий — колониеобразующих единиц (КОЕ) по числу колоний, выросших на плотной питательной среде. Процент живых микробных клеток вычисляют в виде соотношения числа выросших колоний к общей концентрации микробных клеток, определенной визуальным методом с помощью отраслевого стандартного образца мутности 10 ME (ОСО 42-28- 85 соответствующего года выпуска).

Данная методика определения количества живых микробных клеток в препарате является достаточно трудоемкой и позволяет получить результат через несколько суток. Кроме того, среди факторов, влияющих на результаты методики, можно выделить качество питательных сред для высева вакцинной суспензии, химическую чистоту используемой посуды, адсорбцию микроорганизмов на поверхности стекла пипетки и др.

Для определения количества живых микроорганизмов возможно использование экспресс-методов, значительно сокращающих время анализа.

Аналогом бактериологического метода является метод мембранной фильтрации, принцип которого заключается в том, что после пропускания анализируемой пробы через фильтр, на поверхности которого остаются присутствующие в пробе микроорганизмы, фильтр помещают на плотную питательную среду, инкубируют в соответствующих условиях и подсчитывают число видимых колоний.

В качестве биохимического метода оценки показателя используют определение дегидрогеназной активности бактерий в отношении метиленового синего. Метод основан на том,

что окисленная форма метиленового синего, имеющая синюю окраску, при соединении с атомом водорода, отщепляемым от органического субстрата дегидрогеназой, переходит в восстановленную бесцветную форму [1]. По окончании реакции по формуле рассчитывают количество живых микробных клеток, учитывая время протекания реакции в сравнении с заранее определенным эталоном [2]. Для каждого производственного цикла составляют градуированные шкалы соответствия времени обесцвечивания красителя количеству жизнеспособных микробных клеток. При этом для составления шкал соответствия используется культуральный метод.

Также к биохимическим методам относится определение количества восстановленного трифенилтетразол-хлорида, который под действием митохондриальных дегидрогеназ живых клеток превращается в нерастворимый в воде формазан, имеющий фиолетовую окраску [3]. С учетом значения оптической плотности растворенных кристаллов формазана проводится расчет процента жизнеспособных микробных клеток по формуле. Для каждого опыта кривая составляется индивидуально с помощью фотоэлектроколориметра, при этом для расчета коэффициента восстановления тетразола из одного образца вакцинного препарата жизнеспособность определяют культуральным методом.

Метод окраски селективными кислотными или основными красителями (феноловый красный, цианол, трипановый синий, нейтральный красный) позволяет различить живые (бесцветные) и погибшие (темно-синие) микробные клетки, произвести подсчет их числа под оптическим микроскопом и определить процентное содержание жизнеспособных клеток как отношение количества живых клеток к общему числу [4].

Циторефрактометрический метод основан на различиях в оптических свойствах живых и мертвых микробных клеток, выявляемых при просмотре с использованием иммерсионной аноптральной микроскопии [5]. Однако данный метод предпочтителен для использования на этапе анализа нативной биомассы или препарата со сроком годности до трех месяцев.

Биолюминесцентный метод, основанный на определении содержания аденозинтрифосфата (АТФ) в микробных клетках [6, 7], позволяет сократить длительность анализа до 6 ч, однако

² Нормативная документация ЛСР-005758/08-231120. Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций; 2020.

³ ФС.3.3.1.0022.15 Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

недостатком метода является необходимость подбора и оптимизации условий пробоподготовки для каждого конкретного образца.

Следует отметить, что, несмотря на быстроту проведения описанных методик, они не являются оптимальными, так как зачастую предполагают длительный период пробоподготовки.

Метод проточной цитометрии основан на анализе параметров светорассеяния и интенсивности флуоресценции каждой индивидуальной клетки в суспензии [8–11]. Метод может использоваться для определения количества живых микробных клеток лиофилизированных вакцин, так как именно в процессе высушивания происходит наиболее интенсивная гибель микробных клеток, сопровождающаяся нарушением целостности клеточной оболочки [12], что позволяет флуоресцентному красителю проникнуть внутрь поврежденной клетки.

Таким образом, анализ существующих в настоящее время методик учета количества живых микробных клеток показал, что выбор способа определения данного показателя применительно к контролю качества иммунобиологических лекарственных препаратов является актуальной задачей.

Цель работы – изучить возможность применения метода проточной цитометрии в оценке качества препарата вакцины чумной живой.

Для достижения данной цели было необходимо определить количество живых микробных клеток в препарате вакцины чумной живой методом проточной цитометрии и бактериологическим методом, провести сравнительный анализ данных, полученных двумя методами.

Материалы и методы

Материалы:

- исследуемый образец: вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций (ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора), пять экспериментальных серий (1-эксп, 2-эксп, 3-эксп, 4-эксп, 5-эксп, срок годности до 21.03.2024);
- агар Хоттингера pH 7,2±0,1 с натрием сернистокислым 0,25 г/л (ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора);
- 0,9% натрия хлорид (хч) ГОСТ 4233-77 (ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт»

Роспотребнадзора);

- краситель SynaptoGreen (C4/FM1–43) (Invitrogen, США).

Оборудование:

- проточный цитометр Attune (Thermo Scientific, США) с программным обеспечением Attune cytometric software (Thermo Scientific, США);
- бокс микробиологической безопасности II класса LA2 Labculture (ESCO Technologies Inc., США);
- микроцентрифуга-встряхиватель ТЭТА 2 (ООО «Биоком», Россия).

Методы

При выполнении работ руководствовались требованиями санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»⁴.

Бактериологический метод. Определение количества живых микробных клеток проводили согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации, ФС.3.3.1.0022.15 «Вакцина чумная живая»⁵.

Метод проточной цитометрии

Подготовка исследуемого образца вакцины. В ампулу с лиофилизированным препаратом вакцины добавляли 5 мл 0,9% раствора натрия хлорида и растворяли в течение 3 мин. Полученную взвесь переносили в пластиковую пробирку (Eppendorf, Германия) объемом 15 мл. В ампулу вновь добавляли 5 мл 0,9% раствора натрия хлорида, аккуратно встряхивали и переносили содержимое в ту же пробирку.

Окраска препарата. В пробирку типа Эппендорф (Eppendorf, Германия) вносили 100 мкл подготовленного образца вакцины, добавляли 7 мкл красителя SynaptoGreen и оставляли при комнатной температуре в защищенном от света месте на 10 мин. Доводили объем окрашенной взвеси до 1 мл 0,9% раствором натрия хлорида.

Приготовление отрицательного контрольного образца. В качестве отрицательного образца применяли препарат убитых прогреванием микробных клеток, для приготовления которого отбирали 100 мкл образца вакцины и нагревали при 100 °С в течение 40 мин. После этого проводили окраску препарата вышеописанным способом.

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

⁵ ФС.3.3.1.0022.15 Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Определение количества живых микробных клеток. Для точного определения границ субпопуляции мертвых клеток однократно перед началом измерений проводили установление границ этой субпопуляции. Помещали пробирку с окрашенным отрицательным контролем в штатив-держатель цитометра и измеряли флуоресценцию. Исследование проводили согласно инструкции к прибору. Флуоресценцию измеряли при длине волны 440 ± 50 и 512 ± 25 нм с использованием фильтров VL1-H и VL2-H соответственно.

Аналогично проводили определение количества живых клеток в препарате вакцины чумной живой.

Обработка, статистический анализ и визуализация данных проводились с использованием языка R версия 4.0.3⁶, пакетов ggplot2⁷ и ggpubr⁸. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для проведения оценки количества жизнеспособных микробных клеток вакцины чумной живой методом проточной цитометрии

на первом этапе исследования анализировали отрицательный контрольный образец — препарат убитых прогреванием микробных клеток. Оценка количества клеток проводилась путем добавления флуоресцентного красителя SynaptoGreen, не способного проникать внутрь неповрежденной (живой) микробной клетки. Особенностью данного красителя является спектральная чувствительность к составу окружающей среды за счет эффектов релаксации и самотушения — при взаимодействии с живой клеткой происходит окрашивание липофильной мембраны с относительно слабой флуоресценцией в синей области спектра, а при локализации красителя в гидрофильной среде (в том числе в цитоплазме разрушенной клетки) происходит сдвиг максимума флуоресцентного сигнала в красную область спектра, сопровождающийся повышением интенсивности флуоресценции [13].

Результаты цитометрического анализа препарата убитых прогреванием микробных клеток *Y. pestis* представлены в виде двумерной диаграммы (диаграмма светорассеивания), где каждой клетке соответствует точка и показано распределение кластера живых и мертвых клеток внутри общей популяции (рис. 1).

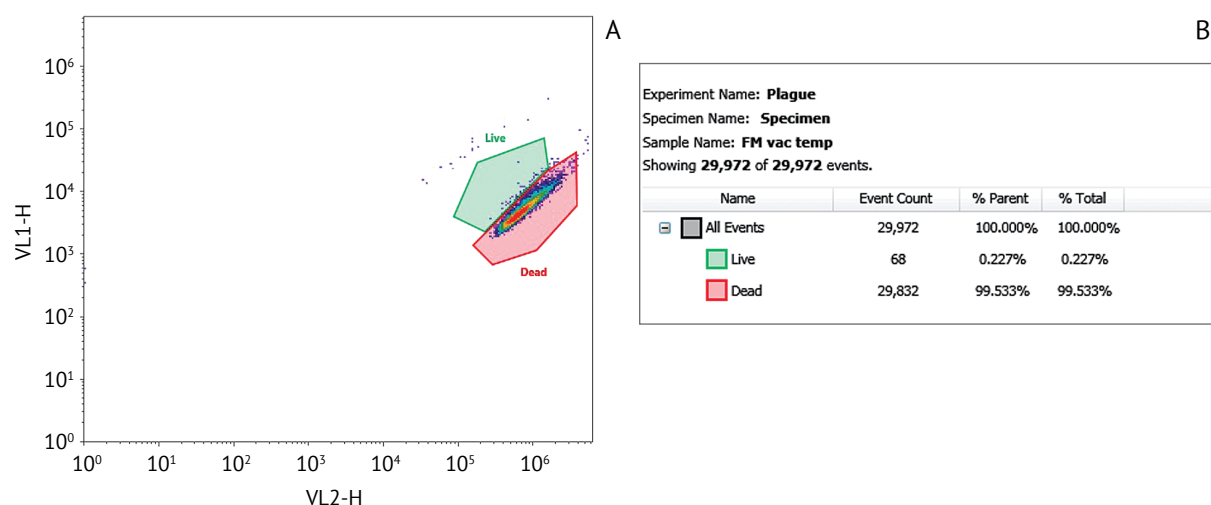


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Результаты цитометрического анализа отрицательного контрольного образца — препарата убитых прогреванием микробных клеток. А — диаграмма светорассеивания клеток. По оси X — интенсивность флуоресценции при длине волны 512 ± 25 нм; по оси Y — интенсивность флуоресценции при длине волны 440 ± 50 нм. Красным цветом выделена область, содержащая мертвые микробные клетки, зеленым цветом — живые клетки. В — автоматически рассчитанные программой результаты цитометрического анализа в виде количества мертвых (dead) и живых (live) клеток (скриншот).

Fig. 1. Flow cytometry results for the negative control sample (preparation of heat-killed microbial cells). A, scatter plot for the cells. X-axis: fluorescence intensity at 512 ± 25 nm; Y-axis: fluorescence intensity at 440 ± 50 nm. Red: dead cells; green: live cells. B, flow cytometry results automatically calculated by the program as live and dead microbial cell counts and percentages (screenshot).

⁶ <https://www.r-project.org/>

⁷ Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag. New York; 2016.

⁸ <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>

С использованием метода проточной цитометрии была проведена оценка количества жизнеспособных микробных клеток в пяти экспериментальных сериях вакцины чумной живой. Каждая серия исследовалась в трех повторях. Для подтверждения достоверности полученных результатов параллельно определяли количество живых микробных клеток в исследуемых образцах бактериологическим методом. Полученные результаты представлены в *таблице 1*.

Значение количества живых микробных клеток при анализе образцов экспериментальных серий вакцины бактериологическим методом составило от $27,8 \pm 2,2$ до $56,5 \pm 3,1$ (в среднем – $39,8 \pm 5,4\%$), а при исследовании цитометрическим методом – от $29,2 \pm 1,2$ до $59,1 \pm 2,1$ (в среднем – $41,7 \pm 5,5\%$).

Наблюдаемый разброс значений показателя количества живых микробных клеток в экспериментальных сериях вакцины чумной живой является допустимым – показатель должен быть не менее 25%⁹. При этом вне зависимости от способа определения в пределах одной серии препарата данный показатель находился в границах доверительного интервала. Разница между данными, полученными как для каждой серии, так и для среднего значения, не превышала 3%, что подтверждает согласованность методов.

Результаты цитометрического анализа препарата вакцины чумной живой на примере образца пятой экспериментальной серии вакцины представлены на *рисунке 2*.

При статистическом анализе полученных данных было установлено, что результаты контроля качества препарата вакцины методом проточной цитометрии и бактериологическим методом

не имели достоверных различий (t -критерий Стьюдента, $p < 0,05$) и характеризовались высоким коэффициентом детерминации (R^2 , $p < 0,05$). На *рис. 3* представлены результаты корреляционного анализа между значениями показателя количества живых микробных клеток, установленными бактериологическим методом и методом проточной цитометрии – синим цветом обозначена линия тренда, серым – границы 95% доверительного интервала.

Диаграмма рассеяния разности количества живых микробных клеток и средних значений полученных результатов измерений (диаграмма Блэнда–Альтмана) представлена на *рис. 4*. Средняя разность значений измерений (среднее арифметическое, $\text{mean} \pm$ стандартное отклонение, SD) составила $1,82 \pm 0,83\%$, что свидетельствует о наличии незначительного систематического расхождения. Значимых линейных взаимосвязей между разностью и средними значениями обнаружено не было (корреляция Пирсона, $p > 0,05$). Эти данные, а также расположение всех значений измерений в пределах средней разности ($\pm 1,96 SD$) отражают согласованность двух методов измерения показателя количества живых микробных клеток.

Полученные данные свидетельствуют о высокой точности метода проточной цитофлуориметрии при определении количества живых микробных клеток. В мировой практике данный метод используется в различных областях промышленности и науки, например при определении эффективности дезинфицирующих средств в отношении микроорганизмов [15], изучении влияния химических соединений на проницаемость бактериальной клетки [16], для оценки количества живых микробов в условиях промышленного металлургического производства

Таблица 1. Сравнительная оценка количества живых микробных клеток экспериментальных серий препарата вакцины чумной живой

Table 1. Comparison of live microbial cell quantification results for experimental batches of live plague vaccine

Серия препарата вакцины <i>Vaccine batch</i>	Общее количество микробных клеток, млрд/мл <i>Total microbial cell count, bn/mL</i>	Количество живых микробных клеток, % от общего количества клеток <i>Number of live bacteria as % of total microbial cell count</i>	
		Бактериологический метод <i>Bacteriological method</i>	Цитометрический метод <i>Flow cytometry</i>
1	50	$27,8 \pm 2,2$	$29,2 \pm 1,2$
2	50	$39,9 \pm 1,4$	$40,8 \pm 2,3$
3	55	$56,5 \pm 3,1$	$59,1 \pm 2,1$
4	70	$33,9 \pm 0,7$	$36,7 \pm 1,5$
5	65	$41,1 \pm 0,9$	$42,5 \pm 0,5$

Таблица составлена авторами по собственным данным [14] с изменениями / The table is prepared by the authors using their own data and [14]

⁹ Нормативная документация ЛСР-005758/08-231120. Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций; 2020.

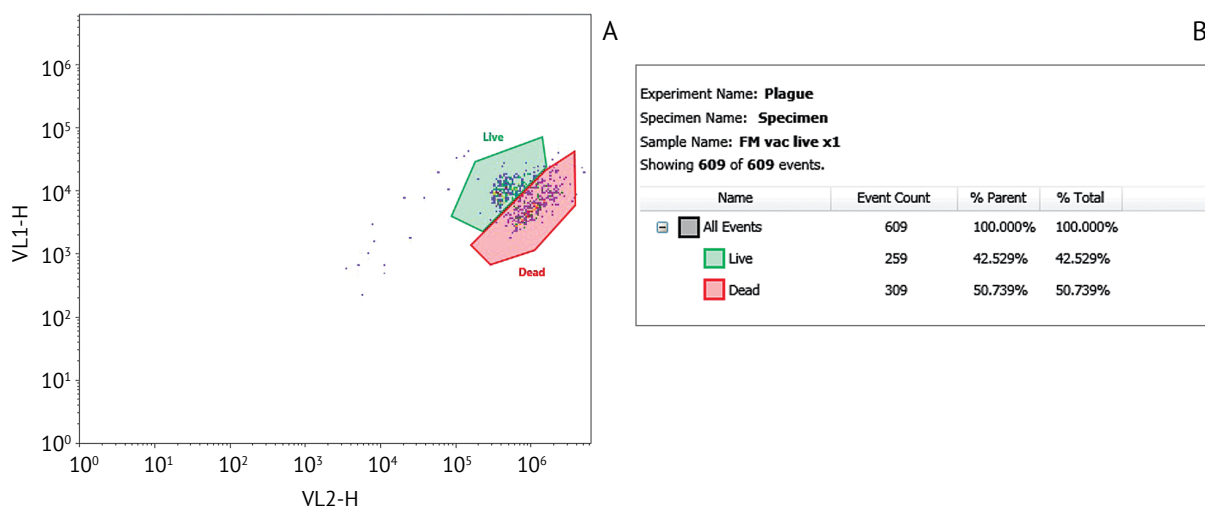


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Результаты цитометрического анализа препарата вакцины чумной живой. А — диаграмма светорассеивания клеток. По оси X — интенсивность флуоресценции при длине волны 512±25 нм; по оси Y — интенсивность флуоресценции при длине волны 440±50 нм. Красным цветом выделена область, содержащая мертвые микробные клетки, зеленым цветом — живые клетки. В — автоматически рассчитанные программой результаты цитометрического анализа в виде количества мертвых (dead) и живых (live) клеток (скриншот).

Fig. 2. Flow cytometry results for the live plague vaccine. A, scatter plot for microbial cells. X-axis: fluorescence intensity at 512±25 nm; Y-axis: fluorescence intensity at 440±50 nm. Red: dead cells; green: live cells. B, flow cytometry results automatically calculated by the program as live and dead microbial cell counts and percentages (screenshot).

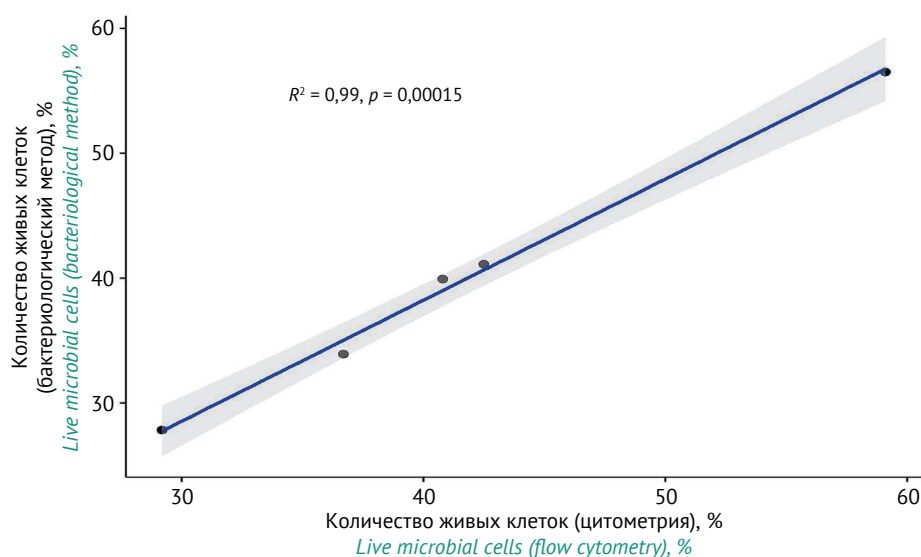


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Результаты корреляционного анализа между значениями количества живых микробных клеток, установленными бактериологическим методом и методом проточной цитометрии. Синим цветом обозначена линия тренда, серым — границы 95% доверительного интервала.

Fig. 3. Correlation between the results of live microbial cell quantification by bacteriological and flow cytometry methods. Blue: trend line; grey: 95% confidence interval.

[17] и др. Метод проточной цитометрии характеризуется как надежный и стабильный экспресс-метод [18].

Результаты проведенного исследования продемонстрировали возможность применения цитометрического метода для контроля качества

препарата вакцины чумной при определении показателя количества живых микробных клеток. Данный метод позволяет упростить проведение анализа показателя и значительно сократить время его проведения. Метод проточной цитометрии позволяет напрямую анализировать

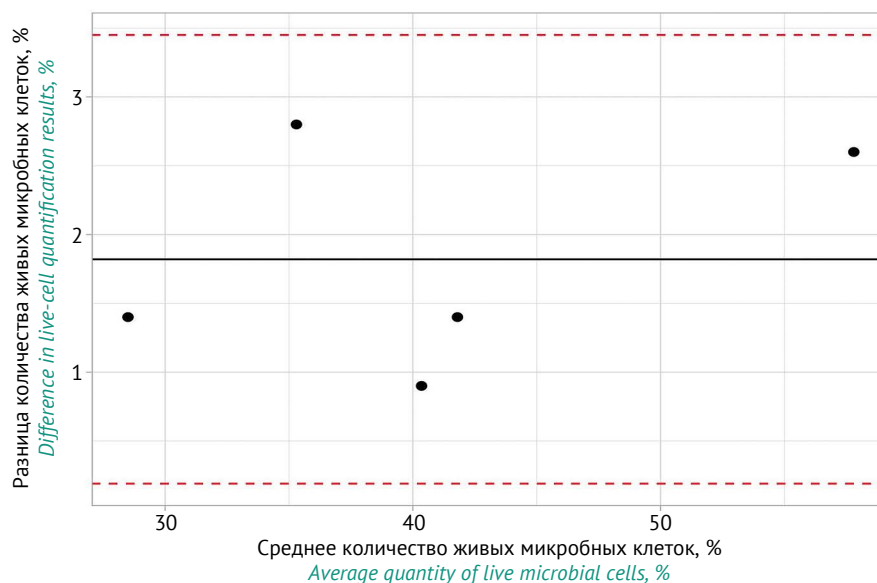


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Результаты анализа согласованности методов определения количества живых микробных клеток. По оси X — среднее значение количества живых микробных клеток, определенное бактериологическим и цитометрическим методами; по оси Y — разница значений количества живых микробных клеток, определенных бактериологическим и цитометрическим методами. Сплошной линией указано среднее значение разности количества живых микробных клеток, определенное бактериологическим и цитометрическим методами; пунктирной — 95% доверительный интервал среднего значения разности показателей.

Fig. 4. Consistency of the methods for live microbial cell quantification. X-axis: average quantity of live microbial cells determined by bacteriological and flow cytometry methods; Y-axis: difference in the results obtained by bacteriological and flow cytometry methods. Solid line: average difference in the results obtained by bacteriological and flow cytometry methods; dotted line: 95% confidence interval.

весь объем вакцинной суспензии в образце (ампуле), не используя последовательное титрование до необходимого разведения с последующим высевом части разведенной суспензии на питательные среды.

Выводы

Значение показателя качества «Количество живых микробных клеток» в экспериментальных сериях препарата вакцины чумной живой, установленное методом проточной цитометрии, составило от $29,2 \pm 1,2$ до $59,1 \pm 2,1\%$, что полностью соответствует требованиям нормативной документации. При сравнительном исследовании образцов бактериологическим методом показано, что значение показателя составило от $27,8 \pm 2,2$ до $56,5 \pm 3,1\%$, при этом в пределах каждой серии различие полученных данных не являлось достоверным и разница составила не более 3%.

Литература/References

1. Касина ИВ, Рашепкин ЛИ, Горяев АА, Алексеева СА, Немировская ТИ, Мовсесянц АА. Оценка качества вакцины туляремийной живой по результатам испытаний в рамках обязательной сертификации.

Применение метода проточной цитофлуориметрии позволило увеличить информативность, упростить определение исследуемого показателя, сократить время проведения анализа и исключить факторы, способные повлиять на результаты (например, некачественные питательные среды).

Показана целесообразность практического применения и перспектива метода цитометрии для определения показателя количества живых микробных клеток при контроле качества препарата вакцины чумной живой, а также, возможно, и для других иммунобиологических лекарственных препаратов.

Включение описанной методики в нормативную документацию позволит использовать ее для контроля качества вакцины чумной живой наряду с регламентированными методами.

БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016;16(4):253–9.

Kasina IV, Raschepkin LI, Goryaev AA, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI, Movsesyants AA. Live tularemia vac-

- cine quality assessment according to test results under the mandatory certification. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(4):253–9 (In Russ.). EDN: [UWBNNH](#)
2. Fukui M, Takii S. Reduction of tetrazolium salts by sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*. 1989;62(1):13–20.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03653.x>
 3. Bhupathiraju VK, Hernandez M, Landfear D, Alvarez-Cohen L. Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. *J Microbiol Methods*. 1999;37(3):231–43.
[https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(99\)00069-x](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(99)00069-x)
 4. Johnson MB, Criss AK. Fluorescence microscopy methods for determining the viability of bacteria in association with mammalian cells. *J Vis Exp*. 2013;(79):e50729.
<https://doi.org/10.3791/50729>
 5. Фихман БА. Иммерсионная микрорефрактометрия бактериальных клеток. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1963;(5). Fikhman BA. Immersion microrefractometry of bacterial cells. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1963;(5) (In Russ.).
 6. Ломакина ГЮ, Модестова ЮА, Угарова НН. Биолуминесцентная детекция жизнеспособности клеток (обзор). *Биохимия*. 2015;80(6):829–44. Lomakina GYu, Modestova YuA, Ugarova NN. Bioluminescence assay of cell viability. *Biochemistry*. 2015;80(6):829–44 (In Russ.). EDN: [UAAWWF](#)
 7. Угарова НН, Ломакина ГЮ, Перевышина ТА, Отрашевская ЕВ, Черников СВ. Контроль жизнеспособности клеток БЦЖ-вакцины в процессе ее производства методом биолуминесцентной АТФ-метрии. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2019;60(4):254–62. Ugarova NN, Lomakina GYu, Perevyshina TA, Otrashkevskaya EV, Chernikov SV. In-process control of BCG vaccine cell viability by bioluminescent ATP assay. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2019;60(4):254–62 (In Russ.). EDN: [TVEZMT](#)
 8. Ou F, McGoverin C, Swift S, Vanholsbeeck F. Rapid and cost-effective evaluation of bacterial viability using fluorescence spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411(16):3653–63.
<https://doi.org/10.1007/s00216-019-01848-5>
 9. Shimomura Y, Ohno R, Kawai F, Kimbara K. Method for assessment of viability and morphological changes of bacteria in the early stage of colony formation on a simulated natural environment. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(7):5037–42.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00106-06>
 10. Pianetti A, Falcioni T, Bruscolini F, Sabatini L, Sisti E, Papa S. Determination of the viability of *Aeromonas hydrophila* in different types of water by flow cytometry, and comparison with classical methods. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(12):7948–54.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7948-7954.2005>
 11. Gweon E, Choi C, Kim J, Kim B, Kang H, Park T, et al. Development of a new approach to determine the potency of bacille Calmette–Guérin vaccines using flow cytometry. *Osong Public Health Res Perspect*. 2017;8(6):389–96.
<https://doi.org/10.24171/j.phrp.2017.8.6.06>
 12. Лопатина НВ, Мишанькин БН. Экспериментальная адаптация вакцинного штамма чумного микроба к процессу лиофилизации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018;17(3):51–6. Lopatina NV, Mishankin BN. Experimental adaptation of a strain of the plague microbe to lyophilization process. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018;17(3):51–6 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-3-51-56>
 13. Massicotte R, Mafu AA, Ahmad D, Deshaies F, Pichette G, Belhumeur P. Comparison between flow cytometry and traditional culture methods for efficacy assessment of six disinfectant agents against nosocomial bacterial species. *Front Microbiol*. 2017;8:112.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00112>
 14. Фисун АА, Абзаева НВ, Ковалев ДА, Кузнецова ИВ, Жиров АМ, Гостищева СЕ и др. Определение количества живых микробных клеток в препарате вакцины чумной живой методом проточной цитометрии. В кн.: *Материалы региональной научно-практической конференции с международным участием «Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе»*. Ставрополь; 2022. С. 217–8. Fisun AA, Abzaeva NV, Kovalev DA, Kuznetsova IV, Zhiron AM, Gostishcheva SE, et al. Determination of the number of living microbial cells in the preparation of live plague vaccine by flow cytometry. In: *Materials of the regional scientific and practical conference with the international participation “Problems of especially dangerous infections in the North Caucasus”*. Stavropol; 2022. P. 217–8 (In Russ.). EDN: [YMVOQI](#)
 15. Shi L, Gunther S, Hubschmann T, Wick LY, Harms H, Muller S. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry A*. 2007;71(8):592–8.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.20402>
 16. Vanhauteghem D, Demeyere K, Callaert N, Boelaert A, Haesaert G, Audenaert K, et al. Flow cytometry is a powerful tool for assessment of the viability of fungal conidia in metalworking fluids. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(16):e00938-17.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00938-17>
 17. Zahavy E, Rotem S, Gur D, Aloni-Grinstein R, Aftalion M, Ber R. Rapid antibiotic susceptibility determination for *Yersinia pestis* using flow cytometry Spectral Intensity Ratio (SIR) fluorescence analysis. *J Fluoresc*. 2018;28(5):1151–61.
<https://doi.org/10.1007/s10895-018-2279-3>
 18. Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol*. 2019;49(10):1457–973.
<https://doi.org/10.1002/eji.201970107>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Н.В. Абзаева** – сбор, анализ и обобщение данных литературы, интерпретация результатов исследования, оформление текста рукописи; **И.В. Кузнецова** – проведение экспериментальных исследований и сравнительного анализа красителей; сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; **С.Е. Гостищева** – культивирование вакцинного штамма, разработка концепции исследования, окончательное редактирование текста рукописи для публикации; **А.М. Жилов** – пробоподготовка образцов и реагентов, подготовка графического материала; **Д.А. Ковалев** – планирование и разработка дизайна экспериментального исследования, редактирование и критический пересмотр содержания рукописи, формулирование выводов; **А.В. Костроминов** – культивирование клеток, получение экспериментальных данных, оформление рукописи; **А.А. Фисун** – культивирование клеток, сбор экспериментальных данных; **Г.Ф. Иванова** – культивирование клеток, обоснование концепции исследования, обобщение и систематизация результатов исследования.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **N.V. Abzaeva** collected, analysed, and summarised literature data; interpreted the study results; and formatted the manuscript. **I.V. Kuznetsova** conducted experiments and dye comparisons; collected, analysed, and collated experimental data. **S.E. Gostischeva** cultivated the vaccine strain, conceptualised the study, and finalised manuscript editing for publication. **A.M. Zhirov** prepared samples and reagents and worked with the graphical material. **D.A. Kovalev** planned and designed the study, edited and critically reviewed the manuscript, and formulated the conclusions. **A.V. Kostrominov** cultivated cells, generated experimental data, and formatted the manuscript. **A.A. Fisun** cultivated cells and generated experimental data. **G.F. Ivanova** cultivated cells, substantiated the study concept, summarised and collated the study results.

Об авторах / Authors

Абзаева Наталья Вячеславовна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7418-9673>

stavnipchi@mail.ru

Кузнецова Ирина Владимировна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9513-0761>

stavnipchi@mail.ru

Гостищева Светлана Евгеньевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9891-3665>

sveta.gostisheva@yandex.ru

Жилов Андрей Михайлович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

stavnipchi@mail.ru

Ковалев Дмитрий Анатольевич, канд. хим. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

stavnipchi@mail.ru

Костроминов Артем Валерьевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2228-5038>

plagueartem@mail.ru

Фисун Алиса Анатольевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3400-9989>

stavnipchi@mail.ru

Иванова Галина Филипповна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6127-6738>

stavnipchi@mail.ru

Поступила 19.10.2022

После доработки 30.10.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Natalia V. Abzaeva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7418-9673>

stavnipchi@mail.ru

Irina V. Kuznetsova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9513-0761>

stavnipchi@mail.ru

Svetlana E. Gostischeva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9891-3665>

sveta.gostisheva@yandex.ru

Andrey M. Zhirov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

stavnipchi@mail.ru

Dmitry A. Kovalev, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

stavnipchi@mail.ru

Artem V. Kostrominov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2228-5038>

plagueartem@mail.ru

Alisa A. Fisun

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3400-9989>

stavnipchi@mail.ru

Galina F. Ivanova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6127-6738>

stavnipchi@mail.ru

Received 19 October 2022

Revised 30 October 2023

Accepted 24 November 2023

УДК 615.076:615.371:616.9

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-570-583>

Научная статья | Scientific article



Экспериментальная оценка возможности определения бактериальных эндотоксинов с помощью гель-тромб теста в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной

М.В. Абрамцева✉, Н.С. Алехина, Е.Д. Колышкина

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

✉ Абрамцева Марина Витальевна; Abramtceva@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Оценка содержания пирогенных примесей в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной (Вианвак®) проводится в настоящее время только биологическим тестом на пирогенность. Определение бактериальных эндотоксинов (БЭ) с помощью гель-тромб теста и введение показателя «Бактериальные эндотоксины» в нормативную документацию на препарат позволят существенно повысить надежность контроля качества данной вакцины, а также гармонизировать требования к ней с требованиями ведущих фармакопей мира к данной группе лекарственных препаратов.

Цель. Экспериментальная оценка возможности определения содержания бактериальных эндотоксинов с помощью гель-тромб теста в брюшнотифозной Ви-полисахаридной вакцине.

Материалы и методы. Образцы вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной (раствор для подкожного введения, 0,5 мл/доза) пяти серий; ЛАЛ-реактив; ТАЛ-реактив. Испытания проводились с использованием гель-тромб теста с учетом требований Государственной фармакопеи Российской Федерации (ОФС.1.2.4.0006.15) и теста на пирогенность согласно ОФС.1.2.4.0005.15.

Результаты. Расчетное предельное содержание БЭ в испытуемой вакцине составляет 96 ЕЭ/мл, значение максимально допустимого разведения (МДР) — 3200. Установлены нормативные требования к качеству вакцины по показателю «Бактериальные эндотоксины» (не более 48 ЕЭ/доза). Выявлено наличие БЭ в разведениях препарата 1/16–1/32 и отсутствие — в разведениях 1/64–1/256. Выбрано и валидировано рабочее разведение препарата 1/128. Полученные значения содержания БЭ в исследуемых образцах находятся в диапазоне от 0,24 до 0,48 ЕЭ/доза. Испытания на пирогенность *in vivo* образцов пяти серий вакцины в разведениях от 1/16 до 1/256 показали, что введение животным препарата в разведениях 1/16–1/128 вызывало пирогенную реакцию, а при введении вакцины в разведении 1/256 пирогенная реакция отсутствовала во всех экспериментах.

Выводы. Экспериментально доказана возможность определения бактериальных эндотоксинов в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной с помощью гель-тромб теста. Рекомендовано введение показателя «Бактериальные эндотоксины» в Государственную фармакопею Российской Федерации ФС.3.3.1.0012.15 «Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная».

Ключевые слова: бактериальные эндотоксины; гель-тромб тест; вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная; ЛАЛ-тест; тест на пирогенность

© М.В. Абрамцева, Н.С. Алехина, Е.Д. Колышкина, 2023

Для цитирования: Абрамцева М.В., Алехина Н.С., Колышкина Е.Д. Экспериментальная оценка возможности определения бактериальных эндотоксинов с помощью геля-тромб теста в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):570–583. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-570-583>

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.

Experimental evaluation of the possibility of determining bacterial endotoxins in typhoid Vi polysaccharide vaccines using the gel-clot test

Marina V. Abramtseva , Natalya S. Alekhina, Elena D. Kolyshkina

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

 Marina V. Abramtseva; Abramtseva@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. Currently, only the rabbit pyrogen test is used to test the Vianvac® typhoid Vi polysaccharide vaccine for pyrogenicity. As part of the product specification file, the gel-clot test for bacterial endotoxins (BE) will improve the reliability of quality control, as well as harmonise the requirements for the vaccine with the requirements outlined for this group of medicinal products by leading world pharmacopoeias.

Aim. This study aimed at an experimental assessment of the applicability of the gel-clot test to the quantification of BE in the typhoid Vi polysaccharide vaccine.

Materials and methods. This study used samples from 5 batches of the typhoid Vi polysaccharide vaccine (0.5 mL/dose, solution for subcutaneous injection), LAL and TAL reagents. The analysis included the gel-clot test and the pyrogenicity test according to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (OFS.1.2.4.0006.15 and OFS.1.2.4.0005.15, respectively).

Results. According to calculations, the BE limit for the tested vaccine was 96 EU/mL, and the maximum valid dilution (MVD) was 3200. The authors determined the regulatory requirements for typhoid Vi polysaccharide vaccine quality in terms of BE (not more than 48 EU/dose). The *in vitro* BE tests were positive at vaccine dilutions of 1/16 to 1/32 and negative at 1/64 to 1/256. The authors selected and validated a working vaccine dilution of 1/128. The BE content measured in the tested samples ranged from 0.24 to 0.48 EU/dose. The *in vivo* pyrogen tests were positive at dilutions of 1/16 to 1/128 and negative at 1/256 in all experiments with samples from 5 vaccine batches at dilutions ranging from 1/16 to 1/256.

Conclusions. This study has experimentally proven that the gel-clot test can quantify BE in the typhoid Vi polysaccharide vaccine. The authors have recommended introducing the gel-clot BE test in the monograph of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation on the typhoid Vi polysaccharide vaccine (FS.3.3.1.0012.15).

Keywords: bacterial endotoxins; gel-clot test; typhoid Vi polysaccharide vaccine; LAL test; pyrogen test

For citation: Abramtseva M.V., Alekhina N.S., Kolyshkina E.D. Experimental evaluation of the possibility of determining bacterial endotoxins in typhoid Vi polysaccharide vaccines using the gel-clot test. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):570–583. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-570-583>

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 reporting No. 121022000147-4).

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

Введение

В Российской Федерации для специфической профилактики брюшного тифа применяется вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная, которая содержит в своем составе капсульный полисахарид (Ви-антиген), извлеченный из супернатанта культуры *Salmonella typhi*. Одна доза препарата содержит 25 мкг Ви-антигена¹.

Контроль качества вакцинных препаратов согласно Государственной Фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) должен включать в себя испытания по показателям «Пирогенность» биологическим методом на кроликах *in vivo* и/или «Бактериальные эндотоксины»² с применением методики *in vitro*, основанной на использовании лизата амебоцитов мечехвоста (ЛАЛ-тест), которая может быть выполнена тремя различными подходами (гель-тромб тест, турбидиметрический метод, хромогенный метод)³.

В соответствии с нормативной документацией на вакцину брюшнотифозную Ви-полисахаридную определение содержания в ней пирогенных примесей проводится биологическим тестом на пирогенность⁴.

Основными недостатками теста на пирогенность являются использование лабораторных животных, невозможность количественной оценки содержания пирогенных примесей [1], высокая вариабельность результатов и зависимость результата испытания от индивидуальной чувствительности животного [2]. Кроме того, к минусам метода относятся высокая стоимость и трудозатратность [1]. Испытание способно вызывать стресс у животных из-за длительности и инвазивности процедуры, что может привести к получению некорректных результатов [3]. Биологический тест на пирогенность никогда не был валидирован, и его результаты не могут быть экстраполированы на человека [3].

Согласно требованиям Евразийской экономической комиссии («Руководство по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата»)⁵ определение

бактериальных эндотоксинов (БЭ) с помощью ЛАЛ-теста является основным тестом для испытания парентеральных лекарственных препаратов. К преимуществам ЛАЛ-теста относят возможность проведения полуколичественного или количественного определения содержания БЭ [4], высокую чувствительность, хорошую воспроизводимость результатов⁶. Кроме того, метод отличается простотой выполнения, возможностью анализировать значительное количество образцов за короткий промежуток времени и экономичность [1]. Внедрение ЛАЛ-теста в лабораторную практику способствовало существенному сокращению числа животных, используемых в испытаниях [5]. Однако высокая специфичность в отношении липополисахаридов грамотрицательных бактерий ограничивает возможности ЛАЛ-теста для мониторинга пирогенности и потенциальной иммунной активации, опосредованной другими пирогенными примесями. ЛАЛ-тест не способен обнаруживать широкий спектр биологически значимых пирогенов, таких как липопротеины, пептидогликаны и липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий [5, 6]. Это во многих случаях исключает полный отказ от испытания на пирогенность [7]. Несмотря на то что чувствительность ЛАЛ-теста значительно превышает чувствительность теста на кроликах, испытание *in vivo* считается более универсальным и позволяет выявить наличие в лекарственном препарате пирогенных загрязнений любой природы [8, 9].

Таким образом, тест на пирогенность и ЛАЛ-тест являются однонаправленными, но не аналогичными ввиду различий в чувствительности и специфичности к пирогенным примесям [3, 8].

Требования Европейской фармакопеи⁷ и Британской фармакопеи⁸ к брюшнотифозным полисахаридным вакцинам предусматривают определение БЭ с помощью ЛАЛ-теста, исключая проведение испытания на пирогенность *in vivo*. Фармакопея США⁹ допускает оба метода оценки

¹ ФС.3.3.1.0012.15 Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

² ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁴ ФС.3.3.1.0012.15 Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁵ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07.09.2018 № 151 «Руководство по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

⁶ Неугодова Н.П., Долгова Г.В., Ситников А.Г. Достоинства ЛАЛ-теста как средства контроля качества лекарственных средств. ЛАЛ-тест. 2003;(2):6–8.

⁷ Monograph 1160. Typhoid polysaccharide vaccine. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2019.

⁸ Typhoid polysaccharide vaccine. British Pharmacopoeia; 2020.

⁹ USP 41–NF 39 <1234> Vaccines for human use — polysaccharide and glycoconjugate vaccines; 2021.

пирогенных примесей в зависимости от нормативных требований к конкретному лекарственному препарату.

Обобщая изложенные литературные данные и регуляторные требования, можно заключить, что определение БЭ с помощью гель-тромб теста и включение показателя «Бактериальные эндотоксины» в нормативную документацию на отечественную вакцину брюшнотифозную Ви-полисахаридную позволит значительно повысить надежность контроля, а также гармонизировать подходы к оценке ее качества с требованиями зарубежных фармакопей. Выбор гель-тромб теста обусловлен его доступностью, простотой, экономичностью и хорошей воспроизводимостью результатов [5, 10].

Цель работы — экспериментальная оценка возможности определения БЭ с помощью гель-тромб теста в брюшнотифозной Ви-полисахаридной вакцине. Для выполнения данной цели были поставлены следующие задачи:

- рассчитать предельное содержание БЭ в испытуемом препарате и значение максимально допустимого разведения (МДР);
- подтвердить заявленную чувствительность ЛАЛ-реактива;
- определить рабочее разведение вакцины и провести испытания на наличие в ней мешающих факторов;
- произвести оценку пирогенности испытуемого препарата биологическим методом *in vivo* в разведениях, близких к рабочему, определенному по результатам ЛАЛ-теста;
- провести сравнение данных, полученных в испытаниях с помощью ЛАЛ-теста и при оценке пирогенности *in vivo*.

Материалы и методы

Материалы:

- образцы вакцины Вианвак® (вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная), раствор для подкожного введения, 0,5 мл/доза, производства ООО «Гритвак», Россия; серии № 400-0520, 402-0620, 414-0922, 406-0721, 413-0522 (2020–2022 гг. выпуска);
- ЛАЛ-реактив и контрольный стандарт эндотоксина (Charles River Endosafe, США);
- ТАЛ-реактив и контрольный стандарт эндотоксина (Xiamen Bioendo Technology Co., Ltd, Китай);
- вода для ЛАЛ-теста «AL-WATER» (ООО «Альгимед Техно», Россия);

- натрия хлорид 0,9%, растворитель для приготовления лекарственных форм для инъекций (ОАО «Дальхимфарм», Россия);
- наконечники для автоматических дозаторов (Eppendorf, Германия; Sartorius, Германия);
- круглодонные пробирки с диаметром 10 и 13 мм (ООО «Альгимед Техно», Россия);
- пробирки центрифужные 50 мл (Corning, США);
- шприцы инъекционные однократного применения с номинальным объемом 3,0 см³ (SFM Hospital Products, Германия).

Оборудование:

- баня водяная (GFL 1003, Германия);
- автоматические дозаторы с переменным объемом 20–200 и 10–100 мкл (Eppendorf, Германия) и 0,5–5000 мкл (Sartorius, Германия);
- перемешивающее устройство типа Vortex (Elmi, Латвия);
- pH/Ion-метр SevenCompact S220 (Mettler Toledo, КНР);
- весы электронные BD-590 (Tanita, Япония);
- термометр медицинский электронный МТ-1931 (Microlife, Швейцария).

Методы

Гель-тромб тест (метод В)¹⁰. Исследуемые образцы вакцины разводили водой для ЛАЛ-теста. Приготовленные разведения по 0,1 мл вносили в круглодонные депирогенизированные пробирки, после чего в каждую пробирку добавляли по 0,1 мл ЛАЛ-реактива, предварительно разведенного водой для ЛАЛ-теста. Далее реакционные смеси тщательно перемешивали и инкубировали в водяной бане при температуре 37 °С, после чего каждую пробирку плавно переворачивали на 180° и оценивали наличие в ней плотного геля, образование которого говорит о положительной реакции и присутствии в смеси БЭ. Все испытания проводились в двойной повторности, опыты сопровождалось положительным и отрицательным контролями.

Испытание на пирогенность *in vivo*¹¹. В эксперименте использовали кроликов породы Советская шиншилла весом 2,0–3,5 кг. Исследуемые образцы разводили стерильным раствором натрия хлорида 0,9% для инъекций. Выбор диапазона разведений вакцины был основан на результатах гель-тромб теста. Раствор вводили в краевую ушную вену кролика из расчета 1 мл на 1 кг веса животного. Для каждого опытного образца испытание проводили на трех кроликах. Согласно ГФ РФ¹²

¹⁰ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹¹ ОФС.1.2.4.0005.15 Пирогенность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹² Там же.

реакция на введение препарата считается пирогенной, если сумма наибольших повышений температур ($\Sigma \Delta T_{\max}$) $> 1,2$ °С или хотя бы у одного из кроликов отмечено повышение температуры ($\Delta T_{\max}$) на 0,6 °С и выше. Экспериментальные животные содержались в условиях вивария в соответствии с ГОСТ 33044-2014¹³. Работы с лабораторными животными выполняли на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, в соответствии с правилами Европейской Конвенции ETS № 123¹⁴ и директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU¹⁵. Публикация научной статьи была одобрена на заседании локального этического комитета «ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России» (протокол заседания № 3 от 26.09.2023).

Результаты и обсуждение

Расчет предельного содержания бактериальных эндотоксинов

Значение предельного содержания БЭ (ПС БЭ) рассчитывается по формуле (1)¹⁶:

$$\text{ПС БЭ} = \frac{K}{M}, \quad (1)$$

где K — пороговая пирогенная доза, равная 5 ЕЭ/кг в 1 час при парентеральном пути введения препарата; M — максимальная терапевтическая доза препарата, вводимая в течение 1 ч (в мг, мл, ЕД на 1 кг массы тела).

Согласно Инструкции по медицинскому применению¹⁷ объем однократного подкожного введения вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной составляет 0,5 мл; вакцинация предусмотрена для взрослых и детей в возрасте

от трех лет. Для обеспечения жестких требований в расчете учтено наименьшее значение веса ребенка в возрасте трех лет — 9,6 кг (по данным ВОЗ)¹⁸. Соответственно, ПС БЭ рассчитывается по формуле (2):

$$\text{ПС БЭ} = \frac{5 \text{ ЕЭ/кг} \times 9,6 \text{ кг}}{0,5 \text{ мл}} = 96 \frac{\text{ЕЭ}}{\text{мл}} \text{ или } (48 \frac{\text{ЕЭ}}{\text{доза}}). \quad (2)$$

Так как конкретные требования к качеству полисахаридных брюшнотифозных вакцин по показателю «Бактериальные эндотоксины» отсутствуют в ГФ РФ, в Европейской и Британской фармакопеях, в Фармакопее США¹⁹, то за норму ПС БЭ принято расчетное значение.

Расчет значения максимально допустимого разведения

Максимально допустимое разведение (МДР), рассчитывается по формуле (3)²⁰:

$$\text{МДР} = \frac{\text{ПС БЭ} \times \text{концентрация испытуемого раствора}}{\text{чувствительность ЛАЛ-реактива} (\lambda)}. \quad (3)$$

В данном исследовании использовались ЛАЛ-реактивы с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл. Соответственно, значение МДР составляет 3200.

Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива

Согласно требованиям ГФ РФ необходимым условием выполнения гель-тромб теста является проведение предварительных анализов: подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива и оценка наличия мешающих факторов²¹. Данные испытания можно рассматривать как валидационные процедуры [11]²². В первую очередь проводится процедура подтверждения заявленной чувствительности

¹³ ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики.

¹⁴ European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes № 123, 18.03.1986. Council of Europe; 1986. <https://rm.coe.int/168007a67b>

¹⁵ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

¹⁶ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁷ Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Вианвак® (Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная); Р N000183/01-070218. https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=51ab849d-8edb-4ef3-819a-2a9807b63a14

¹⁸ https://cdn.who.int/media/docs/default-source/child-growth/child-growth-standards/indicators/weight-for-age/sft-wfa-girls-z-0-5.pdf?sfvrsn=6606c085_11

¹⁹ ФС.3.3.1.0012.15 Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Monograph 1160. Typhoid polysaccharide vaccine. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2019.

Typhoid polysaccharide vaccine. British Pharmacopoeia; 2020.

USP 41–NF 39 <1234> Vaccines for human use—polysaccharide and glycoconjugate vaccines; 2021.

²⁰ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²¹ Там же.

²² Ситников АГ. Опыт «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива», его назначение и место в общей системе контрольных анализов. ЛАЛ-тест. 2006;(4):1–8.

ЛАЛ-реактива, которая является универсальным средством оценки работоспособности всей тест-системы и позволяет не только проверить качество используемых реактивов, но и провести аттестацию оборудования, подтвердить квалификацию аналитиков²³.

Чувствительность используемого в анализе ЛАЛ-реактива определяет наименьшее содержание эндотоксина, которое можно оценить с помощью гель-тромб теста [12]²⁴.

В ходе проведения исследований использовали реактивы двух производителей, полученные из амебоцитов мечехвостов двух видов — *Limulus* (ЛАЛ-реактив) и *Tachypleus* (ТАЛ-реактив). Согласно требованиям ГФ РФ²⁵ и других фармакопей²⁶ допускается использование обоих реактивов как взаимозаменяемых. По своим свойствам реактивы аналогичны, заявленная производителями чувствительность (λ) данных реактивов составляет 0,03 ЕЭ/мл, что позволяет использовать их для проведения гель-тромб теста.

Результаты подтверждения чувствительности пары ЛАЛ-реактив / контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ) и ТАЛ-реактив / КСЭ представлены в таблицах 1 и 2.

Так как полученные в экспериментах значения чувствительности ЛАЛ-реактива (0,0357 и 0,0252 ЕЭ/мл) больше 0,5 λ и меньше 2 λ , заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива считается подтвержденной. Вместе с тем показано, что соблюдены все необходимые условия проведения эксперимента.

Выбор рабочего разведения вакцины

С целью выбора рабочего разведения проведен ряд испытаний пяти серий брюшнотифозной вакцины. Определение рабочего разведения является одним из главных компонентов валидации методики определения БЭ. Выбор разведения основывается на результатах, полученных в ходе количественного анализа [13]. Рабочее разведение должно соответствовать следующим требованиям: в данном разведении препарат не содержит БЭ; разведение как можно меньше (как минимум в 2 раза меньше значения МДР); значение pH раствора находится в оптимальном диапазоне для проведения ЛАЛ-теста (6,0–8,0) [13].

В ходе исследований вначале был проведен анализ десятикратных разведений вакцины

Таблица 1. Результаты подтверждения заявленной чувствительности пары ЛАЛ-реактив / контрольный стандарт эндотоксина
Table 1. Confirmation of labelled sensitivity for the combination of LAL and CSE

№ повторности <i>Replicate No.</i>	Разведение КСЭ <i>CSE dilution</i>				Отрицательный контроль <i>Negative control</i>	Конечная концентрация БЭ ($C_{БЭ}$), ЕЭ/мл <i>Final BE concentration (C_{BE}), EU/mL</i>	$\lg C_{БЭ}$ <i>$\log_{10} C_{BE}$</i>
	2λ 0,06 ЕЭ/мл <i>0.06 EU/mL</i>	λ 0,03 ЕЭ/мл <i>0.03 EU/mL</i>	0,5λ 0,015 ЕЭ/мл <i>0.015 EU/mL</i>	0,25λ 0,0075 ЕЭ/мл <i>0.0075 EU/mL</i>			
1	+	+	–	–	–	0,030	-1,5229
2	+	+	–	–		0,030	-1,5229
3	+	–	–	–	–	0,060	-1,2218
4	+	+	–	–		0,030	-1,5229
						Среднее значение $\lg C_{БЭ}$ <i>Mean $\log_{10} C_{BE}$</i> -1,4476	
						ant $\lg C_{БЭ}$ (ср. геом. значение) 0,0357 ЕЭ/мл <i>ant $\log_{10} C_{BE}$ (geometric mean)</i> 0.0357 EU/mL	

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

Примечание. В качестве отрицательного контроля использовали воду для ЛАЛ-теста. ЛАЛ — лизат амебоцитов мечехвоста *Limulus*; КСЭ — контрольный стандарт эндотоксина; БЭ — бактериальные эндотоксины; «+» — положительная реакция (наличие геля); «–» — отрицательная реакция (отсутствие геля).

Note. LAL reagent water was used as the negative control. LAL, *Limulus* amoebocyte lysate; CSE, control standard endotoxin; BE, bacterial endotoxin; +, positive reaction (gel clot); –, negative reaction (no gel clot).

²³ Чиркова МН, Ситников АГ. Гель-тромб тест, чувствительность ЛАЛ-реактива и метода. ЛАЛ-тест. 2005;(3):1–4.

²⁴ Там же.

²⁵ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁶ Monograph 2.6.14. Bacterial endotoxins. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2019.

USP 41–NF 39<85> Bacterial endotoxins test; 2021.

Таблица 2. Результаты подтверждения заявленной чувствительности пары ТАЛ-реактив / контрольный стандарт эндотоксина
Table 2. Confirmation of labelled sensitivity for the combination of TAL and CSE

№ повторности Replicate No.	Разведение КСЭ CSE dilution				Отрицательный контроль Negative control	Конечная концентрация БЭ (C _{БЭ}), ЕЭ/мл Final BE concentration (C _{BE}), EU/mL	lg C _{БЭ} log ₁₀ C _{BE}
	2λ 0,06 ЕЭ/мл 0.06 EU/mL	λ 0,03 ЕЭ/мл 0.03 EU/mL	0,5λ 0,015 ЕЭ/мл 0.015 EU/mL	0,25λ 0,0075 ЕЭ/мл 0.0075 EU/mL			
1	+	+	+	–	–	0,015	-1,8239
2	+	+	–	–		0,030	-1,5229
3	+	+	–	–	–	0,030	-1,5229
4	+	+	–	–		0,030	-1,5229
						Среднее значение lg C _{БЭ} Mean log ₁₀ C _{BE} -1,5981	
						ant lg C _{БЭ} (ср. геом. значение) 0,0252 ЕЭ/мл ant log ₁₀ C _{BE} (geometric mean) 0.0252 EU/mL	

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

Примечание. В качестве отрицательного контроля использовали воду для ЛАЛ-теста. ТАЛ – лизат амебоцитов мечехвоста *Tachypleus*; КСЭ – контрольный стандарт эндотоксина; БЭ – бактериальные эндотоксины, «+» – положительная реакция (наличие геля); «–» – отрицательная реакция (отсутствие геля).

Note. LAL reagent water was used as the negative control. TAL, *Tachypleus* amoebocyte lysate; CSE, control standard endotoxin; BE, bacterial endotoxin; +, positive reaction (gel clot); –, negative reaction (no gel clot).

от 1/1 до 1/3200 (значение МДР), далее – двукратных разведений. В испытаниях использовали ЛАЛ-реактив и ТАЛ-реактив. Наряду с положительным и отрицательным контролями корректность результатов опыта также подтверждалась положительным контролем испытуемого образца (контроль ингибирования) – испытуемый препарат с КСЭ в концентрации 2Л. Положительные результаты в контроле ингибирования доказывают, что препарат не оказывает подавляющего действия на ход реакции.

При проведении анализа десятикратных разведений исследовали по одному образцу пяти серий лекарственного препарата. В данном ряду разведений для пяти испытуемых образцов конечной точкой реакции стало разведение 1/10. В соответствии с этим выбран интервал для постановки анализа двукратных разведений от 1/8 до 1/128.

При проведении анализа двукратных разведений исследовали по три образца пяти серий испытуемого препарата. Для каждого образца готовили ряд последовательных двукратных разведений от 1/8 до 1/128. Каждое разведение исследовалось в двух повторностях. Результаты представлены в таблице 3.

Установлено, что для 15 исследуемых образцов конечной точкой реакции стали разведения 1/32 и 1/16. Так как рабочее разведение должно

быть минимально возможным, но при этом иметь запас прочности – выбрано разведение 1/128. Значения pH растворов препарата в данном разведении для всех испытанных образцов входят в пределы 6,5–6,8.

Результаты проведенных испытаний показали, что средние геометрические значения концентраций БЭ находятся в диапазоне от 0,48 до 0,96 ЕЭ/мл, что соответствует содержанию БЭ в образцах испытуемого препарата от 0,24 до 0,48 ЕЭ/доза (0,5 мл).

Анализ наличия мешающих факторов

Анализ наличия в препарате мешающих факторов, способных подавлять и/или потенцировать реакцию лизата амебоцитов с БЭ, является следующим этапом валидации гель-тромб теста и определяет возможность испытания лекарственного препарата с помощью данного метода; проводится в соответствии с требованиями ГФ РФ²⁷.

Испытания на наличие мешающих факторов трех серий брюшнотифозной вакцины в рабочем разведении 1/128 проводились с использованием трех образцов каждой серии в четырех повторностях (таблица 4). В исследовании использовали ТАЛ-реактив.

Результаты проведенных испытаний показали, что реакция ТАЛ-реактива с эндотоксином

²⁷ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 3. Результаты анализа двукратных разведений вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной при выборе рабочего разведения**Table 3.** Test results for two-fold dilutions of the typhoid Vi polysaccharide vaccine obtained as part of selecting the working dilution

№ повторности Replicate No.	Разведение вакцины Vaccine dilution			C _{бэ} , ЕЭ/мл C _{бэ} , EU/mL	lg C _{бэ} log ₁₀ C _{бэ}	Σ lg C _{бэ} Σ log ₁₀ C _{бэ}	Σ lg C _{бэ} /n Σ log ₁₀ C _{бэ} /n	ant Σ lg C _{бэ} /n, ЕЭ/мл ant Σ log ₁₀ C _{бэ} /n, EU/mL
	≤1/16	1/32	≥1/64					
Серия № 1 Batch 1								
Образец 1 Sample 1						-0,6376	-0,3188	0,4800
1	+	–	–	0,48	-0,3188			
2	+	–	–	0,48	-0,3188			
Образец 2 Sample 2						-0,3365	-0,1682	0,6788
1	+	+	–	0,96	-0,0177			
2	+	–	–	0,48	-0,3188			
Образец 3 Sample 3						-0,3365	-0,1682	0,6788
1	+	+	–	0,96	-0,0177			
2	+	–	–	0,48	-0,3188			
Серия № 2 Batch 2								
Образец 4 Sample 4						-0,3365	-0,1682	0,6788
1	+	+	–	0,96	-0,0177			
2	+	–	–	0,48	-0,3188			
Образец 5 Sample 5						-0,0354	-0,0177	0,9600
1	+	+	–	0,96	-0,0177			
2	+	+	–	0,96	-0,0177			
Образец 6 Sample 6						-0,3365	-0,1682	0,6788
1	+	–	–	0,48	-0,3188			
2	+	+	–	0,96	-0,0177			
Серия № 3 Batch 3								
Образец 7 Sample 7						-0,6376	-0,3188	0,4800
1	+	–	–	0,48	-0,3188			
2	+	–	–	0,48	-0,3188			
Образец 8 Sample 8						-0,6376	-0,3188	0,4800
1	+	–	–	0,48	-0,3188			
2	+	–	–	0,48	-0,3188			
Образец 9 Sample 9						-0,6376	-0,3188	0,4800
1	+	–	–	0,48	-0,3188			
2	+	–	–	0,48	-0,3188			

Продолжение таблицы 3

Table 3 (continued)

№ повторности <i>Replicate No.</i>	Разведение вакцины <i>Vaccine dilution</i>			$C_{БЭ}$, ЕЭ/мл C_{BE} , EU/mL	$\lg C_{БЭ}$ $\log_{10} C_{BE}$	$\Sigma \lg C_{БЭ}$ $\Sigma \log_{10} C_{BE}$	$\Sigma \lg C_{БЭ}/n$ $\Sigma \log_{10} C_{BE}/n$	ant $\Sigma \lg C_{БЭ}/n$, ЕЭ/мл ant $\Sigma \log_{10} C_{BE}/n$, EU/mL
	≤1/16	1/32	≥1/64					
Серия № 4 <i>Batch 4</i>								
Образец 10 <i>Sample 10</i>						-0,3365	-0,1682	0,6800
1	+	–	–	0,48	-0,3188			
2	+	+	–	0,96	-0,0177			
Образец 11 <i>Sample 11</i>						-0,3365	-0,1682	0,6800
1	+	–	–	0,48	-0,3188			
2	+	+	–	0,96	-0,0177			
Образец 12 <i>Sample 12</i>						-0,3365	-0,1682	0,6800
1	+	+	–	0,96	-0,0177			
2	+	–	–	0,48	-0,3188			
Серия № 5 <i>Batch 5</i>								
Образец 13 <i>Sample 13</i>						-0,6376	-0,3188	0,4800
1	+	–	–	0,48	-0,3188			
2	+	–	–	0,48	-0,3188			
Образец 14 <i>Sample 14</i>						-0,6376	-0,3188	0,4800
1	+	–	–	0,48	-0,3188			
2	+	–	–	0,48	-0,3188			
Образец 15 <i>Sample 15</i>						-0,3365	-0,1682	0,6800
1	+	+	–	0,96	-0,0177			
2	+	–	–	0,48	-0,3188			

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

Примечание. БЭ – бактериальные эндотоксины; $C_{БЭ}$ – концентрация БЭ; n – число параллельных проб образцов серии препарата ($n=2$); «+» – положительная реакция (наличие геля); «–» – отрицательная реакция (отсутствие геля); серия № 1 – коммерческая серия № 400-0520; серия № 2 – коммерческая серия № 402-0620; серия № 3 – коммерческая серия № 414-0922; серия № 4 – коммерческая серия № 406-0621; серия № 5 – коммерческая серия № 413-0522.

Note. BE, bacterial endotoxins; C_{BE} , BE concentration; n , number of replicates for a vaccine batch ($n=2$); +, positive reaction (gel clot); –, negative reaction (no gel clot); Batch 1, commercial batch No. 400-0520; Batch 2, commercial batch No. 402-0620; Batch 3, commercial batch No. 414-0922; Batch 4, commercial batch No. 406-0621; Batch 5, commercial batch No. 413-0522.

для серийных разведений КСЭ в растворе испытуемой вакцины аналогична его реакции с БЭ для серийных разведений КСЭ в воде (положительный контроль). Во всех опытах было получено среднее геометрическое значение концентрации эндотоксина не менее 0,5λ и не более 2λ, то есть результат эксперимента удовлетворяет требованиям данного теста. В пробах с отрицательными контролями (вода для ЛАЛ-теста

и вакцина в рабочем разведении) зафиксировано отсутствие гелеобразования, что подтверждает корректность полученных результатов.

На основании полученных результатов определено, что исследуемые образцы вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной в рабочем разведении 1/128 не содержат мешающих факторов. Установленное рабочее разведение 1/128 в 25 раз меньше значения МДР.

Таблица 4. Результаты определения наличия мешающих факторов в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной
Table 4. Results of testing the typhoid Vi polysaccharide vaccine for interfering factors

№ повтор- ности <i>Replicate No.</i>	Разведение КСЭ <i>CSE dilution</i>				C _{БЭ} ^{БЭ} , ЕЭ/мл <i>C_{BE}^{BE} EU/mL</i>	Среднее геометрическое значение C _{БЭ} ^{БЭ} , ЕЭ/мл <i>Geometric mean C_{BE}^{BE} EU/mL</i>
	2λ 0,06 ЕЭ/мл <i>0.06 EU/mL</i>	λ 0,03 ЕЭ/мл <i>0.03 EU/mL</i>	0,5λ 0,015 ЕЭ/мл <i>0.015 EU/mL</i>	0,25λ 0,0075 ЕЭ/мл <i>0.0075 EU/mL</i>		
Положительный контроль (вода для ЛАЛ-теста + КСЭ) <i>Positive control (LAL reagent water + CSE)</i>						
1	+	+	–	–	0,030	0,0300
2	+	+	–	–	0,030	
Вакцина в разведении 1/128 + КСЭ <i>1/128 vaccine dilution + CSE</i>						
Серия № 3, образец 1 <i>Batch 3, sample 1</i>						
1	+	–	–	–	0,060	0,0300
2	+	+	–	–	0,030	
3	+	+	–	–	0,030	
4	+	+	+	–	0,015	
Серия № 3, образец 2 <i>Batch 3, sample 2</i>						
1	+	+	–	–	0,030	0,0212
2	+	+	–	–	0,030	
3	+	+	+	–	0,015	
4	+	+	+	–	0,015	
Серия № 3, образец 3 <i>Batch 3, sample 3</i>						
1	+	+	+	–	0,015	0,0150
2	+	+	+	–	0,015	
3	+	+	+	–	0,015	
4	+	+	+	–	0,015	
Серия № 4, образец 1 <i>Batch 4, sample 1</i>						
1	+	+	–	–	0,030	0,0212
2	+	+	+	–	0,015	
3	+	+	–	–	0,030	
4	+	+	+	–	0,015	
Серия № 4, образец 2 <i>Batch 4, sample 2</i>						
1	+	+	–	–	0,030	0,0300
2	+	+	–	–	0,030	
3	+	+	–	–	0,030	
4	+	+	–	–	0,030	
Серия № 4, образец 3 <i>Batch 4, sample 3</i>						
1	+	+	–	–	0,030	0,0252
2	+	+	–	–	0,030	

Продолжение таблицы 4

Table 4 (continued)

№ повтор- ности <i>Replicate No.</i>	Разведение КСЭ <i>CSE dilution</i>				C _{БЭ} , ЕЭ/мл <i>C_{BE} EU/mL</i>	Среднее геометрическое значение C _{БЭ} , ЕЭ/мл <i>Geometric mean C_{BE} EU/mL</i>
	2λ 0,06 ЕЭ/мл <i>0.06 EU/mL</i>	λ 0,03 ЕЭ/мл <i>0.03 EU/mL</i>	0,5λ 0,015 ЕЭ/мл <i>0.015 EU/mL</i>	0,25λ 0,0075 ЕЭ/мл <i>0.0075 EU/mL</i>		
3	+	+	–	–	0,030	0,0252
4	+	+	+	–	0,015	
Серия № 5, образец 1 <i>Batch 5, sample 1</i>						
1	+	+	–	–	0,030	0,0357
2	+	+	–	–	0,030	
3	+	+	–	–	0,030	
4	+	–	–	–	0,060	
Серия № 5, образец 2 <i>Batch 5, sample 2</i>						
1	+	+	–	–	0,030	0,0300
2	+	+	–	–	0,030	
3	+	+	–	–	0,030	
4	+	+	–	–	0,030	
Серия № 5, образец 3 <i>Batch 5, sample 3</i>						
1	+	+	+	–	0,015	0,0178
2	+	+	+	–	0,015	
3	+	+	+	–	0,015	
4	+	+	–	–	0,030	

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

Примечание. КСЭ – контрольный стандарт эндотоксина; БЭ – бактериальные эндотоксины; $C_{БЭ}$ – концентрация БЭ; «+» – положительная реакция (наличие геля); «–» – отрицательная реакция (отсутствие геля); серия № 3 – коммерческая серия № 414-0922; серия № 4 – коммерческая серия № 406-0621; серия № 5 – коммерческая серия № 413-0522.

Note. CSE, control standard endotoxin; BE, bacterial endotoxins; C_{BE} , BE concentration; +, positive reaction (gel clot); –, negative reaction (no gel clot); Batch 3, commercial batch No. 414-0922; Batch 4, commercial batch No. 406-0621; Batch 5, commercial batch No. 413-0522

Оценка пирогенности брюшнотифозной вакцины биологическим методом

В тесте на пирогенность *in vivo* проанализированы образцы пяти серий исследуемой вакцины в разведениях, близких к рабочему, определенному по результатам ЛАЛ-теста: от 1/16 до 1/256 (таблица 5). В соответствии с ГФ РФ²⁸ для каждой анализируемой концентрации лекарственного средства тест на пирогенность проводили на трех кроликах. Тест-доза составляла 1 мл на 1 кг веса животного.

Как видно из таблицы 5, при введении животным брюшнотифозной вакцины серий № 1 и 2 в разведениях 1/16 и 1/32 наблюдалось

общее повышение температуры на 2,0–2,3 и на 1,8–2,1 °С соответственно, что согласно ГФ РФ²⁹ является пирогенной реакцией. Исследование препарата в разведениях 1/64 и 1/128 пирогенной реакции не выявило: $\Delta T_{\max}$ находилась в пределах 0,6–0,8 °С, $\Delta T_{\max} \leq 0,5$ °С.

Введение вакцины серий № 3 и 4 в разведениях 1/64 и 1/128 вызывало пирогенное действие: $\Delta T_{\max} > 1,2$ °С с индивидуальными повышениями температуры на 0,1–1,3 °С. При введении препарата этих серий в разведении 1/256 пирогенная реакция не наблюдалась: $\Delta T_{\max}$ находилась в пределах 0,9–1,0 °С, $\Delta T_{\max} < 0,5$ °С.

²⁸ ОФС.1.2.4.0005.15 Пирогенность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁹ Там же.

Таблица 5. Результаты испытания на пирогенность вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной
Table 5. Pyrogen test results for the typhoid Vi polysaccharide vaccine

Разведение вакцины <i>Vaccine dilution</i>	Индивидуальное максимальное повышение температуры ($\Delta T_{\max}$), °C <i>Maximum individual temperature rise ($\Delta T_{\max}$), °C</i>			Сумма индивидуальных максимальных повышений температуры ($\Sigma \Delta T_{\max}$), °C <i>Sum of individual temperature rises ($\Sigma \Delta T_{\max}$), °C</i>
Серия № 1 <i>Batch 1</i>				
1/16	0,8	0,7	0,5	2,0
1/32	0,9	0,5	0,7	2,1
1/64	0,4	0,4	0,3	0,8
1/128	0,3	0,3	0,2	0,8
Серия № 2 <i>Batch 2</i>				
1/16	0,6	0,8	0,9	2,3
1/32	0,5	0,7	0,6	1,8
1/64	0,1	0,5	0,2	0,8
1/128	0,3	0,2	0,1	0,6
Серия № 3 <i>Batch 3</i>				
1/64	1,3	0,3	1,2	2,8
1/128	0,7	0,6	0,3	1,6
1/256	0,4	0,3	0,3	1,0
Серия № 4 <i>Batch 4</i>				
1/64	0,1	0,6	0,7	1,4
1/128	0,3	0,4	0,6	1,3
1/256	0,3	0,3	0,3	0,9
Серия № 5 <i>Batch 5</i>				
1/64	0,3	0,7	0,8	1,8
1/128	0,5	0,3	0,3	1,1
1/256	0,3	0,4	0,3	1,0

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

Примечание. Серия № 1 – коммерческая серия № 400-0520; серия № 2 – коммерческая серия № 402-0620; серия № 3 – коммерческая серия № 414-0922; серия № 4 – коммерческая серия № 406-0621; серия № 5 – коммерческая серия № 413-0522.
Note. Batch 1, commercial batch No. 400-0520; Batch 2, commercial batch No. 402-0620; Batch 3, commercial batch No. 414-0922; Batch 4, commercial batch No. 406-0621; Batch 5, commercial batch No. 413-0522.

При проведении испытаний препарата серии № 5 в разведении 1/64 отмечалось общее повышение температуры на 1,8 °C с индивидуальными повышениями температуры на 0,3–0,8 °C, что является пирогенной реакцией. При исследовании образцов в разведении 1/128 и 1/256 пирогенной реакции выявлено не было: отмечено общее повышение температуры на 1,1 и 1,0 °C, соответственно, $\Delta T_{\max} < 0,5$ °C.

Таким образом, минимальными разведениями препарата, при введении которых пирогенная реакция у животных отсутствовала, являются

разведения: для серий № 1 и 2 – 1/64; для серий № 3 и 4 – 1/256; серии № 5 – 1/128.

Сравнительный анализ данных, полученных при исследовании вакцины с помощью ЛАЛ-теста и в испытании на пирогенность *in vivo*

При испытании пяти серий вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной с помощью гель-тромб теста был получен положительный результат в разведениях 1/16 и 1/32, а отрицательный – в разведениях 1/64 и более. Результаты испытаний на пирогенность

показали, что введение вакцины в разведениях 1/16 и 1/32 во всех опытах вызывало пирогенную реакцию у кроликов, введение вакцины в разведениях 1/64 и 1/128 вызывало пирогенную реакцию в трех и в двух опытах из пяти соответственно, а при введении вакцины в разведении 1/256 пирогенная реакция отсутствовала во всех экспериментах. Наличие пирогенной реакции при введении препарата в разведениях 1/64 и 1/128, в которых показано отсутствие БЭ, вероятно, связано с наличием в препарате других пирогенных примесей, также возможно, что высокая вариабельность результатов вызвана различиями в индивидуальных реакциях лабораторных животных на введение препарата.

Выводы

1. Экспериментально доказана возможность оценки содержания бактериальных эндотоксинов в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной с помощью гель-тромб теста.
2. Установлены и обоснованы нормативные требования к качеству вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной по показателю «Бактериальные эндотоксины»: предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 48 ЕЭ/доза. Для проведения анализа препарат разводят водой для ЛАЛ-теста не менее чем в 256 раз.

Литература/References

1. Gorman A, Golovanov AP. Lipopolysaccharide structure and the phenomenon of low endotoxin recovery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2022;180:289–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.10.006>
2. Kim JH, Jung K, Kim J, Lee J, Kim H, Song H, et al. Development of a rabbit monocyte activation test as an alternative to the rabbit pyrogen test and its application in the analysis of plasma-derived products. *Biologicals.* 2021;71:20–30. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2021.04.003>
3. Fennrich S, Hennig U, Toliashvili L, Schlensak C, Wendwl HP, Stoppelkamp S. More than 70 years of pyrogen detection: current state and future perspectives. *Altern Lab Anim.* 2016;44(3):239–53. <https://doi.org/10.1177/026119291604400>
4. Bu R, Deng X, Cao Y, Jin J, Mai B, Meng K, et al. Effect of different sample treatment methods on Low Endotoxin Recovery phenomenon. *J Microbiol Methods.* 2021;186:106241. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106241>
5. Spoladore J, Gimenes I, Bachinski R, Negherbon JP, Hartung T, Granjeiro JM, et al. Standardized pyrogen testing of medical products with the bacterial endotoxin test (BET) as a substitute for rabbit pyrogen testing (RPT): a scoping review.

3. Выявлено, что испытуемый препарат в рабочем разведении 1/128 не содержит мешающих факторов, способных подавлять и/или потенцировать реакцию лизата амебоцитов с бактериальными эндотоксинами. Рабочее разведение в 25 раз меньше значения максимально допустимого разведения.
4. Результаты проведенных испытаний продемонстрировали, что качество образцов пяти разных серий испытуемой вакцины (2020–2022 гг. выпуска) соответствует установленным нормативным требованиям. Полученные значения содержания бактериальных эндотоксинов в исследуемых образцах находятся в диапазоне от 0,24 до 0,48 ЕЭ/доза, что значительно меньше предельного содержания (48 ЕЭ/доза).
5. Сравнительный анализ данных гель-тромб теста (Метод В) и теста на пирогенность показал, что при испытании пяти серий вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной в разведении 1/256 пирогенная реакция отсутствует как *in vitro*, так и *in vivo*, что позволяет использовать данное разведение при проведении рутинных испытаний.
6. На основании полученных результатов рекомендовано введение показателя «Бактериальные эндотоксины» в Государственную фармакопею Российской Федерации ФС.3.3.1.0012.15 «Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная».

Toxicol in Vitro. 2021;74:105160.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105160>

6. Novitsky TJ. BET vs. PT non-endotoxin pyrogens. *LAL Update.* 2002;20(2):1–4.
7. Boucher PE. A framework for evaluating nonclinical safety of novel adjuvants and adjuvanted preventive vaccines. In: Schijns VEJC, O'Hagan DT, eds. *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. 2nd ed. Fort Washington, PA: Academic Press; 2017. P. 445–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00022-0>
8. Неугодова НП, Рябцева МС, Сапожникова ГА. Основные требования к биологическим показателям при оценке качества лекарственных средств. Возможности валидации биологических методов контроля. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2016;(3):3–8. Neugodova NP, Ryabtseva MS, Sapozhnikova GA. Basic requirements for biological criteria in drug quality evaluation. Validation of biological control methods. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2016;(3):3–8 (In Russ.). EDN: [WKNSQZ](https://www.edn.ru/WKNSQZ)
9. Fingola FF, Albertino SRG, de Abrantes SMP, Zamith HPS. Proposed reduction of the *in vivo* pyrogen test by the *in vitro* LAL assay for the quality

- control of anticrotalic, antiscorpion, antirabies and antitetanus sera. *Toxicol in Vitro*. 2019;59:292–9. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.04.031>
10. Шаповалова ОВ, Неугодова НП, Сапожникова ГА. Выбор метода определения бактериальных эндотоксинов. *Антибиотики и химиотерапия*. 2018;63(5–6):43–5. Shapovalova OV, Neugodova NP, Sapozhnikova GA. Choosing bacterial endotoxin detection method. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2018;63(5–6):43–5 (In Russ.). EDN: [XVVINE](#)
 11. Burguet N, Brito LC. Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica. *VacchiMonitor*. 2012;21(3):32–6 (In Span.).
 12. Dawson ME. Preliminary testing. *LAL Update*. 1996;14(1):1–4.
 13. Шаповалова ОВ, Неугодова НП, Долгова ГВ, Сапожникова ГА. Методические подходы к разработке показателя «Бактериальные эндотоксины» в фармацевтических субстанциях. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2012;(2):47–50. Shapovalova OV, Neugodova NP, Dolgova GV, Sapozhnikova GA. Methodological approaches to the elaboration of “Bacterial endotoxins” index in the pharmaceutical substances. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2012;(2):47–50 (In Russ.). EDN: [RWVTUZ](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.В. Абрамцева** — разработка дизайна экспериментального исследования; анализ и обобщение литературных данных; анализ и систематизация экспериментальных данных; формулирование выводов; написание и редактирование текста рукописи; утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Н.С. Алехина** — сбор, анализ и систематизация литературных данных; проведение инструментальных исследований (ЛАЛ-тест), пробоподготовка образцов; анализ и систематизация экспериментальных данных; оценка воспроизводимости результатов; оформление рукописи; **Е.Д. Колышкина** — сбор, анализ и систематизация литературных данных; проведение инструментальных исследований (тест на пирогенность), пробоподготовка образцов; анализ и систематизация экспериментальных данных; оценка воспроизводимости результатов; оформление рукописи.

Соответствие принципам этики. Исследования на животных проводили в соответствии с правилами Европейской Конвенции ETS № 123 и директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU. Публикация научной статьи была одобрена на заседании локального этического комитета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол заседания № 3 от 26.09.2023).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **M.V. Abramtseva** designed the experimental study, analysed and summarised literature data, analysed and collated experimental data, formulated the conclusions, drafted and edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication. **N.S. Alekhina** collected, analysed, and collated literature data; conducted experiments (LAL tests); prepared samples; analysed and collated experimental data; assessed the results for reproducibility; and formatted the manuscript. **E.D. Kolyshkina** collected, analysed, and collated literature data; conducted experiments (rabbit pyrogen tests); prepared samples; analysed and collated experimental data; assessed the results for reproducibility; and formatted the manuscript.

Ethics approval. All the experiments in animals were performed according to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS No. 123) and Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council. The Local Bioethics Committee at the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products approved publishing this research paper under meeting minutes No. 3 dated 23 September 2023.

Об авторах / Authors

Абрамцева Марина Витальевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0714-1303>

Abramtseva@expmed.ru

Алехина Наталья Сергеевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1583-4887>

NAlekhina@expmed.ru

Колышкина Елена Дмитриевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4976-483X>

kolyshkina@expmed.ru

Marina V. Abramtseva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0714-1303>

Abramtseva@expmed.ru

Natalya S. Alekhina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1583-4887>

NAlekhina@expmed.ru

Elena D. Kolyshkina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4976-483X>

kolyshkina@expmed.ru

Поступила 21.09.2023

После доработки 01.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Received 21 September 2023

Revised 1 November 2023

Accepted 24 November 2023

УДК 579.61:57.083.1

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-584-593>

Научная статья | Scientific article



Валидационные исследования методики спирального посева для определения «Специфической активности» лактосодержащих пробиотических препаратов

А.А. Воропаев[✉], О.В. Фадейкина, В.Ф. Евлашкина, Т.Д. Боханова, 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. Определение количества жизнеспособных клеток является важным микробиологическим исследованием при оценке качества лекарственных препаратов, содержащих живые микроорганизмы. Для оптимизации трудовых и материальных затрат, повышения точности и воспроизводимости испытаний целесообразно применение частично автоматизированных инструментальных методов, к которым относится метод спирального посева.

Цель. Проведение валидационных исследований методики спирального посева при испытании по показателю «Специфическая активность» биологических лекарственных препаратов, содержащих живые бактериальные клетки, на примере лактосодержащего пробиотического лекарственного препарата.

Материалы и методы. В исследовании использовали культуру *Lactiplantibacillus plantarum*, выделенную из образца пробиотического лекарственного препарата. Спиральный посев на агаризованные питательные бактериологические среды осуществляли с помощью автоматической системы нанесения пробы Eddy Jet 2 с последующим автоматическим учетом результатов с применением счетчика колоний IUL Flash & Go. Валидационные исследования проводили согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ОФС.1.1.0021.18).

Результаты. Определены основные валидационные характеристики методики спирального посева: рабочий диапазон от 10^4 до 10^5 КОЕ/мл, предел количественного определения — 10^2 КОЕ/мл, коэффициент линейной детерминации R^2 — 0,99. Правильность методики спирального посева при определении специфической активности составила 93% с повторяемостью 4,9%.

Выводы. Методика спирального посева с применением автоматического счетчика колоний может использоваться при оценке качества лактосодержащих пробиотических лекарственных препаратов по показателю «Специфическая активность», поскольку результаты валидационных исследований подтверждают аналогичность анализируемых характеристик методу Коха, который применяется в настоящее время в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации. Использование методики спирального посева способствует оптимизации затрат и повышению точности результатов испытаний.

Ключевые слова: метод спирального посева; валидационные исследования; оценка качества биологических лекарственных препаратов; специфическая активность; пробиотики; лактосодержащий пробиотик

© А.А. Воропаев, О.В. Фадейкина, В.Ф. Евлашкина, Т.Д. Боханова, Д.С. Давыдов, 2023

Для цитирования: Воробаев А.А., Фадеекина О.В., Евлашкина В.Ф., Боханова Т.Д., Давыдов Д.С. Валидационные исследования методики спирального посева для определения «Специфической активности» лактосодержащих пробиотических препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):584–593. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-584-593>

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.

Validation studies of the spiral plating method to determine the potency of lactobacillus-containing probiotics

Andrey A. Voropaev✉, Olga V. Fadeikina, Vera F. Evlashkina, Tatiana D. Bohanova, 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. Viable cell counting is an important microbiological test for the quality assessment of medicinal products containing live microorganisms. To optimise labour and material costs and enhance testing precision and reproducibility, it is practical to use partially automated instrumental methods, such as the spiral plating method.

Aim. The aim was to conduct a validation study of the spiral plating method for assessing the potency of biologicals containing live bacterial cells, using a lactobacillus-containing probiotic medicinal product as a case study.

Materials and methods. This study used a culture of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from a probiotic medicinal product. Spiral plating on agar-based biological culture media was performed using an automatic Eddy Jet 2 plating system. The study used an IUL Flash & Go colony counter for automatic reporting of the results. The validation study was conducted according to the general chapter on the validation of microbiological testing methods (OFS.1.1.0021.18) of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Results. According to the validation results for the main parameters, the spiral plating method had the range of 10^4 – 10^5 CFU/mL; the limit of quantification of 10^2 CFU/mL; and the coefficient of linear determination, R^2 , of 0.99. The accuracy of the spiral plating method in determining the potency of the test sample was 93%; the repeatability was 4.9%.

Conclusions. The study results confirm the similarity of the spiral plating method with an automatic colony counter to Koch's plating method, which is currently used in accordance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, in terms of the validated parameters. Therefore, spiral plating can be used to evaluate the potency of lactobacillus-containing probiotics. Spiral plating can help improve the cost-effectiveness and accuracy of testing.

Keywords: spiral plating method; validation studies; quality assessment of biologicals; potency; probiotics; lactobacillus-containing probiotic

For citation: Voropaev A.A., Fadeikina O.V., Evlashkina V.F., Bohanova T.D., Davydov D.S. Validation studies of the spiral plating method to determine the potency of lactobacillus-containing probiotics. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):584–593. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-584-593>

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 reporting No. 121022000147-4).

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

Введение

Лактосодержащие пробиотики представляют собой биомассу живых бактерий, относящихся к различным видам семейства *Lactobacillaceae*, в том числе *Lactiplantibacillus plantarum* (ранее — *Lactobacillus plantarum*) [1], *Limosilactobacillus fermentum* (ранее — *Lactobacillus fermentum*), *Lactobacillus acidophilus* и других видов¹. Распространены препараты, представляющие собой лиофилизаты для приготовления суспензии для приема внутрь, то есть биомассу, лиофильно высушенную в защитных средах (сахарозо-желатиновой, сахарозо-желатино-молочной или иной); в одной дозе лиофилизата содержится не менее 2×10^9 КОЕ лактобактерий² [2]. Важнейшим показателем качества препарата является специфическая активность, определяемая по количеству живых лактобактерий в препарате. Классической методикой определения специфической активности пробиотиков согласно Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) ОФС.1.7.2.0009.15³ является метод Коха. Согласно описанию метода суспензию испытуемого образца разводят (в соотношении 1,0 мл образца и 9,0 мл разводящей жидкости), готовят последовательные десятикратные разведения и высевают по 0,1 мл микробной суспензии на чашки Петри с питательной бактериологической средой. Учет результатов осуществляется оператором вручную путем подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на поверхности среды.

Описанная методика является трудно стандартизуемой и характеризуется высокими показателями неопределенности. В соответствии с распределением Пуассона для бактерий в суспензии⁴ предельная точность, то есть границы 95% доверительного интервала для значений показателя КОЕ, могут достигать $\pm 50\%$ [3, 4]. Следует отметить, что для проведения испытаний согласно данной методике и получения стабильных и воспроизводимых результатов необходимы высокие трудозатраты, в том числе высокая квалификация исполнителей. В связи с этим для оптимизации трудовых и материальных затрат, повышения точности и воспроизводимости результатов испытаний представляется целесообразным проведение оценки

возможности использования метода спирального посева при определении количества жизнеспособных клеток. Применение данного метода позволяет сократить количество трудоемких манипуляций и уменьшить количество расходных материалов. Суть метода заключается в распределении суспензии бактериальных клеток с помощью автоматического устройства по поверхности агаризованных питательных сред, находящихся во вращаемых чашках Петри, по траектории архимедовой спирали от центра к периферии чашки в экспоненциально уменьшающемся объеме. Данный метод был разработан для уменьшения используемого числа чашек Петри при проведении микробиологического контроля пищевой молочной продукции [5]. Однако в последние годы указанный метод используется для оценки количества живых бактерий, в том числе в коллекциях микроорганизмов. Метод одобрен Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA), Международной организацией по стандартизации ИСО (International Organisation for Standardisation, ISO), Государственной агрохимической ассоциацией (Association of Official Agricultural Chemists, AOAC) [6, 7]. В то же время необходимо отметить, что до настоящего времени данный метод не включен в ГФ РФ и фармакопее других стран.

Цель работы — проведение валидационных исследований методики спирального посева при испытании по показателю «Специфическая активность» биологических лекарственных препаратов, содержащих живые бактериальные клетки, на примере лактосодержащего пробиотического лекарственного препарата. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: определить валидационные характеристики методики спирального посева (специфичность, рабочий диапазон, предел количественного определения, линейность, повторяемость, правильность); оценить сопоставимость результатов испытаний с использованием двух схем разведения образца; провести сравнительное исследование показателя «Специфическая активность» методом спирального посева и референс-методом на примере лактосодержащего препарата.

¹ ОФС.1.7.1.0006.15 Лактосодержащие пробиотики. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

² ФС.3.3.1.0060.18 Пробиотик лактобактерий монокомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³ ОФС.1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ ГОСТ ISO 11133-2016. Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред.

Материалы и методы

Материалы:

- лекарственный препарат лактобактерий «Лактобактерин» в виде лиофилизата для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения (АО «НПО Микроген», Россия)⁵;
- питательная среда MRS агар (bioMerieux, Франция), серия 2420923103;
- фармакопейный стандартный образец (ФСО) мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, серия S-2/10-010623 (далее – ФСО мутности).

Оборудование:

- устройство для автоматического нанесения пробы Eddy Jet 2 (Neutec Group, США);
- счетчик колоний автоматический IUL Flash & Go (Neutec Group, США).

Методы

Бактериальную культуру штамма *Lactiplantibacillus (Lactobacillus) plantarum* 8P-A3 выделяли из исследуемого лекарственного препарата лактобактерий.

Подготовку и восстановление бактериальной культуры проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.4.0002.15⁶.

В качестве референс-метода использовали метод серийных разведений с последующим высевом на плотные среды (метод Коха) согласно ОФС.1.7.2.0009.15⁷.

Приготовление суспензии бактериальных клеток проводили визуальным методом с использованием ФСО мутности 10 МЕ согласно ОФС.1.7.2.0008.15⁸.

Культивирование лактобактерий проводили при температуре 37 °С в течение 48 ч в аэробных условиях. В случае референс-метода оценку количества колоний на поверхности питательной среды проводили визуально с последующим расчетом исходной концентрации микроорганизмов. В случае метода спирального посева использовали режим посева, при котором вносится уменьшающееся количество образца по мере движения от центра к краю чашки, что эквива-

лентно нескольким десятикратным разведениям (далее – логарифмический спиральный посев). Подсчет колоний проводили в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения счетчика колоний Flash & Go.

В соответствии с ОФС.1.1.0021.18⁹ были приняты следующие значения критериев приемлемости изучаемых валидационных параметров:

- правильность (accuracy) – процент восстановления должен составлять не менее 70% от истинного значения (полученного референс-методом);
- повторяемость (repeatability) методики, рассчитанная по параллельным определениям, – коэффициент вариации должен составлять не более 35%;
- специфичность (specificity) – должен определяться искомым микроорганизм *L. plantarum*;
- предел количественного определения (limit of quantification) – минимальная концентрация микроорганизмов, которая может быть определена с приемлемым уровнем правильности и повторяемости;
- рабочий диапазон (range) – требуемый уровень правильности должен обеспечиваться внутри рабочего диапазона;
- линейность (linearity) – коэффициент линейной детерминации R^2 должен быть не ниже 0,90.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 2007. Рассчитывали следующие показатели описательной статистики: среднееарифметическое значение (X_{cp}), стандартное отклонение (S), относительное стандартное отклонение (RSD). Статистическую значимость различий значений двух групп данных определяли с помощью t -критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Определение специфичности, рабочего диапазона и предела количественного определения методики спирального посева

Определение характеристик методики проводили в одном эксперименте, используя выделенную из препарата бактериальную культуру *L. plantarum*. Из суспензии двухсуточной культуры второго пассажа с концентрацией микробных клеток, соответствующей ФСО мутности

⁵ Государственный реестр лекарственных средств. https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=61b5f1cb-06b1-44bf-ba2e-4139553ad235

⁶ ОФС.1.2.4.0002.15 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁷ ОФС.1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁸ ОФС.1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁹ ОФС.1.1.0021.18 Валидация микробиологических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 1. Результаты определения рабочего диапазона и предела количественного определения методики спирального посева при исследовании лактосодержащего пробиотического препарата

Table 1. Results of determining the range and the limit of quantification for the spiral plating method, obtained when testing a lactobacillus-containing probiotic product

Разведение исходной суспензии <i>L. plantarum</i> (КОЕ/мл) <i>Dilution of the stock suspension of L. plantarum (CFU/mL)</i>	Концентрация <i>L. plantarum</i> в исходной суспензии согласно методике спирального посева, КОЕ/мл <i>L. plantarum concentration in the stock suspension according to the spiral plating method, CFU/mL</i>	RSD, %	Правильность методики (в сравнении с результатами, полученными референс-методом), % <i>Accuracy of the spiral plating method (in comparison with the reference method results), %</i>
10^{-3} (3×10^6)	$1,22 \times 10^8$	5,0	40,1
10^{-4} (3×10^5)	$2,24 \times 10^8$	5,8	73,8
10^{-5} (3×10^4)	$3,10 \times 10^8$	7,1	102,0
10^{-6} (3×10^3)	$2,05 \times 10^8$	12,6	67,5
10^{-7} (3×10^2)	$1,85 \times 10^8$	46,4	60,8
10^{-8} (3×10^1)	$2,00 \times 10^8$	223,6	65,8

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

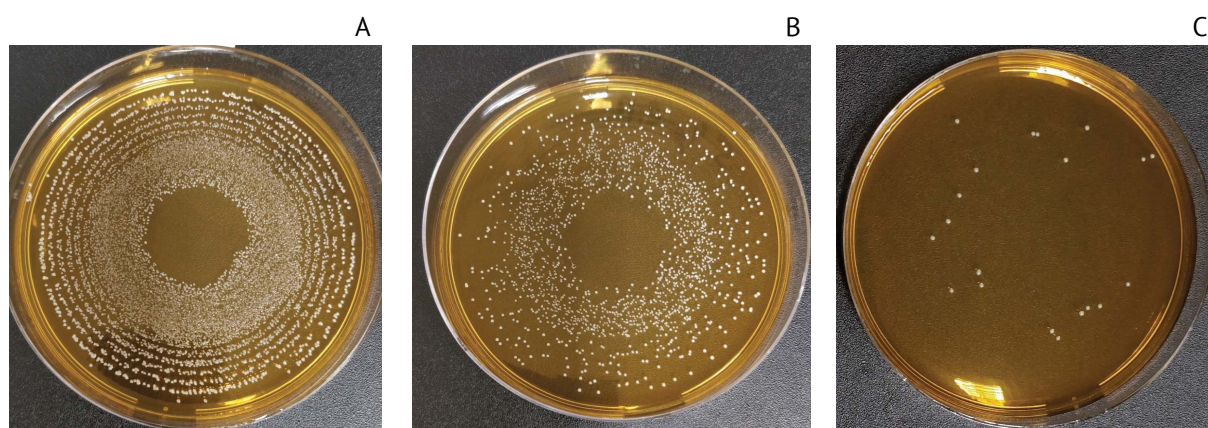
Примечание. КОЕ — колониеобразующие единицы; RSD — относительное стандартное отклонение.

Note. CFU, colony-forming units; RSD, relative standard deviation.

10 МЕ, готовили ряд последовательных десятикратных разведений. С использованием метода спирального посева проводили посев бактериальной суспензии из диапазона разведений 10^{-3} – 10^{-8} , а референс-методом — из разведений 10^{-6} и 10^{-7} . Для учета результатов спирального посева использовали автоматический счетчик колоний Flash & Go; в настройках программного обеспечения указывали соответствующее разведение препарата.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1. Специфичность методики была подтверждена наличием характерных для вида *L. plantarum* колоний на поверхности

агаризованной среды. Нижний предел количественного определения составил менее 100 КОЕ/мл. Образование колоний и подсчет концентрации возможны вплоть до единичных колоний, однако точность такого определения является очень низкой (относительное стандартное отклонение более 40%), а правильность (менее 70%) не соответствует установленному критерию. Таким образом, наиболее оптимальным представляется использование рабочего диапазона от 10^4 до 10^5 КОЕ/мл. При большей концентрации микроорганизмов на поверхности среды наблюдается сплошной рост, а при меньшей концентрации — единичные колонии (рис. 1).



Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by the authors

Рис. 1. Количество колоний на чашке с питательной средой при логарифмическом спиральном посеве 0,1 мл суспензии бактериальных клеток *L. plantarum* с концентрацией: А — 3×10^6 КОЕ/мл (разведение 10^{-3}); В — 3×10^5 КОЕ/мл (разведение 10^{-4}); С — 3×10^3 КОЕ/мл (разведение 10^{-6}).

Fig. 1. Number of colonies on plates with a nutrient medium upon logarithmic spiral plating of 0.1 mL of the *L. plantarum* bacterial cell suspension at the following concentrations: A, 3×10^6 CFU/mL (10^{-3} dilution); B, 3×10^5 CFU/mL (10^{-4} dilution); C, 3×10^3 CFU/mL (10^{-6} dilution).

Таблица 2. Результаты определения линейности методики спирального посева
Table 2. Results of linearity determination for the spiral plating method

Разведение исходного образца <i>Stock sample dilution</i>	Фактическое содержание <i>L. plantarum</i> согласно методике спирального посева, КОЕ/мл <i>L. plantarum count determined by the spiral plating method, CFU/mL</i>	RSD, %	Правильность методики (в сравнении с результатами, полученными референс- методом), % <i>Accuracy of the spiral plating method (in comparison with the reference method results), %</i>
1/2	12900	3,6	91,1
1/4	8550	8,2	121,1
1/8	4440	9,8	125,7
1/16	1500	14,7	85,2
1/32	764	18,3	86,5
1/64	406	15,9	92,1
1/128	207	23,1	93,9

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

Примечание. КОЕ – колониеобразующие единицы; RSD – относительное стандартное отклонение.
Note. CFU, colony-forming units; RSD, relative standard deviation.

Определение линейности методики спирального посева

Оценку линейности методики спирального посева определяли в пределах рабочего диапазона, проводя двукратные серийные разведения бактериальной суспензии *L. plantarum*, содержащей 3×10^4 КОЕ/мл. Подготовка и оценка образца референс-методом проводилась, как описано в предыдущем эксперименте. Результаты определения линейности методики спирального посева представлены в таблице 2.

В соответствии с полученными данными строили график зависимости десятичных логарифмов фактического содержания бактериальных клеток по методике спирального посева от теоретического содержания по референс-методу (рис. 2). Коэффициент линейной детерминации R^2 составил 0,99.

рифмов фактического содержания бактериальных клеток по методике спирального посева от теоретического содержания по референс-методу (рис. 2). Коэффициент линейной детерминации R^2 составил 0,99.

Сравнение двух схем серийных разведений образца с использованием разных объемов разводящей жидкости

Согласно ОФС.1.7.2.0009.15¹⁰ проведение серийных разведений испытуемого образца выполняют с использованием пипеток или автоматических дозаторов, перенося

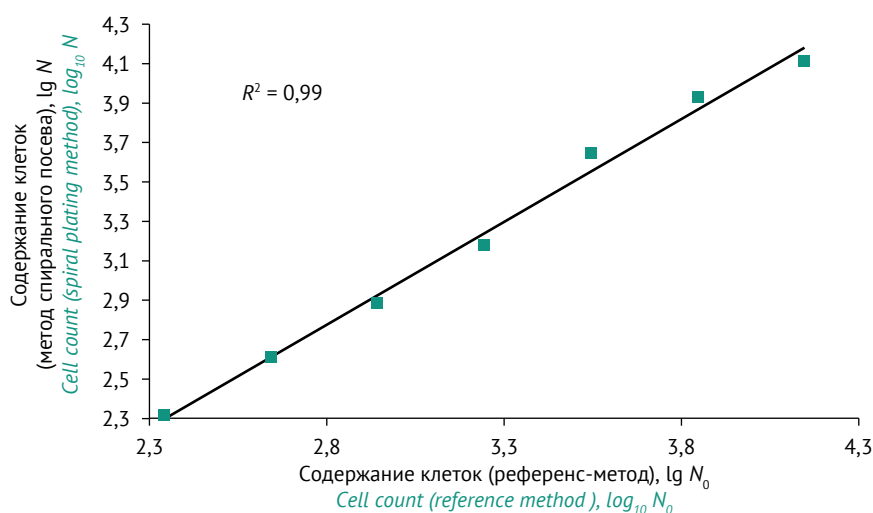


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Зависимость значений содержания клеток *L. plantarum*, полученных методом спирального посева (N), от значений, полученных референс-методом (N_0), при определении линейности методики спирального посева.

Fig. 2. Relationships between the results of *L. plantarum* cell counting by the spiral plating method (N) and by the reference method (N_0), obtained when determining the linearity of the spiral plating method.

¹⁰ ОФС.1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

1,0 мл бактериальной суспензии в 9,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида. При реализации методики спирального посева возможен высеив из разведения малого объема (0,9 мл). Сравнение сопоставимости результатов посева с использованием двух схем разведений проводили, используя большие и малые объемы проб: 1,0 мл + 9,0 мл, посев референс-методом (далее – большой объем) и 0,1 мл + 0,9 мл, методом спирального посева (далее – малый объем).

Испытания проводили два оператора в течение трех дней с использованием шести флаконов одной серии лактодержащего пробиотического препарата. Подготовленную суспензию препарата разводили десятикратно в большом и малом объеме разводящей жидкости. После разведений проводили посев на плотные питательные среды референс-методом и методом спирального посева. По окончании культивирования рассчитывали концентрацию микроорганизмов в исходном препарате. Результаты представлены в таблице 3.

Результаты испытаний, полученные при использовании двух схем разведений суспензии бактериальных клеток *L. plantarum*, показали отсутствие статистически значимых различий: значение *t*-критерия Стьюдента, рассчитанного по экспериментальным данным $t_{\text{эсп}}$, составило 0,79, что меньше критического табличного значения $t_{\text{табл}}=2,2881$ ($df=10$; $\alpha=0,05$) при достигнутом уровне значимости $p=0,44$. Следовательно, для снижения трудозатрат

и материальных затрат предпочтительнее использовать схему разведения 0,1 мл + 0,9 мл в микропробирках.

Методика оценки лактодержащих пробиотических лекарственных препаратов по показателю «Специфическая активность» методом спирального посева

Методика оценки специфической активности лактодержащих пробиотических препаратов включает три этапа.

1. Подготовка десятикратных серийных разведений исходного образца препарата (до разведения 10^{-4}) в микропробирках с объемом среды разведения 0,9 мл.
2. Проведение посева на одну чашку Петри из разведения 10^{-4} логарифмическим спиральным посевом.
3. Проведение учета результатов с использованием автоматического счетчика колоний.

Графически методика спирального посева в сравнении с референс-методикой представлена на рисунке 3.

Оценка повторяемости и правильности методики спирального посева при определении специфической активности лактодержащего пробиотического препарата

Для оценки повторяемости и правильности методики спирального посева использовали коммерческий препарат «Лактобактерин». Испытания проводили два оператора в течение трех дней. Каждый оператор за один день

Таблица 3. Результаты определения концентрации микроорганизмов в лактодержащем пробиотическом препарате при использовании разных схем серийных разведений

Table 3. Results of determining the concentration of microorganisms in a lactobacillus-containing probiotic, obtained using different serial dilution schemes

Определяемая характеристика <i>Parameter of interest</i>	Концентрация микроорганизмов <i>L. plantarum</i> (КОЕ/мл) при схеме серийных разведений <i>Concentration of L. plantarum microorganisms (CFU/mL) in serial dilutions</i>	
	в объеме 9,0 мл <i>in a volume of 9.0 mL</i>	в объеме 0,9 мл <i>in a volume of 0.9 mL</i>
Экспериментальные значения (число проб $n=6$) <i>Experimental values (number of samples, n=6)</i>	$2,25 \times 10^9$	$2,66 \times 10^9$
	$2,40 \times 10^9$	$2,36 \times 10^9$
	$2,30 \times 10^9$	$2,11 \times 10^9$
	$2,59 \times 10^9$	$1,94 \times 10^9$
	$2,74 \times 10^9$	$2,55 \times 10^9$
	$2,25 \times 10^9$	$2,24 \times 10^9$
Среднее значение <i>Mean value</i>	$2,42 \times 10^9$	$2,31 \times 10^9$
RSD, %	8,4	10,1

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

Примечание. КОЕ – колониеобразующие единицы; RSD – относительное стандартное отклонение.

Note. CFU, colony-forming units; RSD, relative standard deviation.

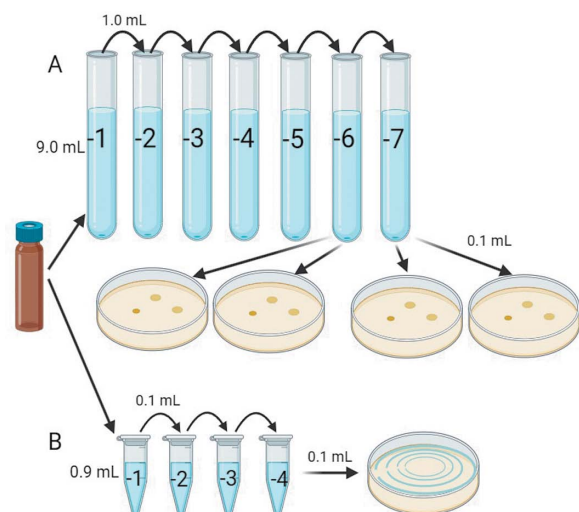


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Схематическое изображение методики спирального посева (В) в сравнении с референс-методом (А).

Fig. 3. Schematic representation of the spiral plating method (B) compared with the reference method (A).

проводил два повторных испытания каждым методом. Результаты испытаний представлены в таблице 4.

Результаты валидационных исследований, полученные при оценке специфической активности лактосодержащего пробиотического препарата с помощью методики спирального посева, соответствуют требованиям ОФС.1.1.0021.18¹¹. Сравнение выборок с использованием *t*-критерия Стьюдента показало, что статистически значимых различий между результатами, полученными двумя методами, выявлено не было: значение *t*-критерия Стьюдента, рассчитанное по экспериментальным данным $t_{\text{эксп}} = 1,19$, меньше критического табличного значения $t_{\text{табл}} = 2,2281$ ($df=10$; $\alpha=0,05$) при достигнутом уровне значимости $p=0,27$.

При использовании метода спирального посева определено меньшее значение относительного стандартного отклонения (*RSD*) в сравнении с референс-методом – 4,9 и 7,6% соответственно. Использование метода спирального посева способствует оптимизации

Таблица 4. Результаты определения правильности и повторяемости при оценке специфической активности лактосодержащего пробиотического препарата с помощью методики спирального посева

Table 4. Results of determining the accuracy and repeatability of the spiral plating method obtained when evaluating the potency of a lactobacillus-containing probiotic product

Показатель <i>Parameter</i>	Специфическая активность препарата, КОЕ/мл <i>Probiotic product potency, CFU/mL</i>	
	Референс-метод <i>Reference method</i>	Методика спирального посева <i>Spiral plating method</i>
Экспериментальные значения (число проб $n=6$) <i>Experimental values (number of samples, $n=6$)</i>	$2,28 \times 10^9$	$2,10 \times 10^9$
	$2,29 \times 10^9$	$2,32 \times 10^9$
	$1,96 \times 10^9$	$2,17 \times 10^9$
	$2,47 \times 10^9$	$2,02 \times 10^9$
	$2,14 \times 10^9$	$2,07 \times 10^9$
	$2,24 \times 10^9$	$2,12 \times 10^9$
Рассчитанное значение показателя специфической активности, КОЕ/мл <i>Calculated potency, CFU/mL</i>	$2,23 \times 10^9$	$2,13 \times 10^9$
Значение показателя специфической активности согласно данным производителя, КОЕ/мл <i>Potency according to the manufacturer's data, CFU/mL</i>	$2,30 \times 10^9$	
Повторяемость (<i>RSD</i>), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	7,6	4,9
Правильность (в сравнении с данными производителя), % <i>Accuracy (in comparison with the manufacturer's data), %</i>	97	93

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

Примечание. КОЭ – колониеобразующие единицы; *RSD* – относительное стандартное отклонение.

Note. CFU, colony-forming units; *RSD*, relative standard deviation.

¹¹ ОФС.1.1.0021.18 Валидация микробиологических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

затрат и повышению точности выполняемого анализа [8], так как количество операций по серийному разведению меньше, чем при постановке чашечного метода.

Выводы

1. Установлены валидационные характеристики методики спирального посева для определения показателя «Специфическая активность» биологических лекарственных препаратов на примере лактосодержащего пробиотика: рабочий диапазон от 10^4 до 10^5 КОЕ/мл, предел количественного определения – 10^2 КОЕ/мл, коэффициент линейной детерминации $R^2 = 0,99$, повторяемость в пределах 5%.
2. Метод спирального посева с автоматическим подсчетом колоний может рассматриваться как альтернативный стандартному методу Коха, который применяется в настоящее

время в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации и включен в нормативную документацию на зарегистрированные в России лекарственные лактосодержащие пробиотические препараты.

3. Предложена методика оценки показателя «Специфическая активность» лактосодержащих пробиотических препаратов, включающая следующие этапы:
 - подготовка десятикратных серийных разведений исходного образца препарата (до разведения 10^{-4}) в микропробирках с объемом среды разведения 0,9 мл;
 - проведение посева на одну чашку Петри из разведения 10^{-4} логарифмическим спиральным посевом;
 - проведение учета результатов с использованием автоматического счетчика колоний.

Литература/References

1. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(4):2782–858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
2. Nordström EA, Teixeira C, Montelius C, Jeppsson B, Larsson N. *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (LP299V®): three decades of research. *Benef Microbes*. 2021;12(5):441–65. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0191>
3. Dias FRS, Lourenço FR. Measurement uncertainty evaluation and risk of false conformity assessment for microbial enumeration tests. *J Microbiol Methods*. 2021;189:106312. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106312>
4. Буйлова ИА, Гунар ОВ. Практические аспекты применения валидационных параметров на примере методик определения количественного содержания микроорганизмов в лекарственных препаратах. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(4):267–72. Buylova IA, Gunar OV. Validation parameters as applied to methods for quantification of microorganisms in medicinal products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(4):267–72 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-4-267-272>
5. Donnelly CB, Gilchrist JE, Peeler JT, Campbell JE. Spiral plate count method for the examination of raw and pasteurized milk. *Appl Environ Microbiol*. 1976;32(1):21–7. <https://doi.org/10.1128/aem.32.1.21-27.1976>
6. Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Sukenobe J, Murakami Y, Kawamura S, Komatsu Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*. 2000;41(3):251–5. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2282>
7. Соколов ДМ, Соколов МС. Автоматизация микробиологических исследований при оценке безопасности пищевых продуктов и сырья. *Молочная промышленность*. 2014;(2):70–3. Sokolov DM, Sokolov MS. Automation of microbiological testing of foods and raw materials safety. *Dairy Industry*. 2014;(2):70–3 (In Russ.). EDN: [RVAMEP](https://www.edn.ru/rvamep)
8. Ben-David A, Davidson CE. Estimation method for serial dilution experiments. *J Microbiol Methods*. 2014;107:214–21. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.023>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Воропаев** – формирование цели и задач исследований, выполнение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация результатов исследований, написание текста рукописи; **О.В. Фадейкина** – обобщение экспериментальных данных, анализ, статистическая обработка и интерпретация результатов исследований, написание текста рукописи; **В.Ф. Евлашкина** – проведение экспериментальных исследований;

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Voropaev** formulated the study aim and objectives, conducted experiments, analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **O.V. Fadeikina** summarised the experimental data; analysed, processed, and interpreted the study results; and drafted the manuscript. **V.F. Evlashkina** conducted experiments and provided consulting assistance with the analysis of study results. **T.D. Bohanova** conducted experiments.

консультативная помощь при анализе результатов; **Т.Д. Боханова** — проведение экспериментальных исследований; **Д.С. Давыдов** — консультативная помощь при анализе результатов, написание текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

D.S. Davydov provided consulting assistance with the analysis of study results, drafted the manuscript, 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

Фадеекина Ольга Васильевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
fadeikina@expmed.ru

Евлашкина Вера Францевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6106-6674>
evlashkina@expmed.ru

Боханова Татьяна Дмитриевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5704-5523>
bohanova@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

Vera F. Evlashkina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6106-6674>
evlashkina@expmed.ru

Tatiana D. Bohanova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5704-5523>
bohanova@expmed.ru

Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>
Davydov@expmed.ru

Поступила 08.08.2023

После доработки 08.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Received 8 August 2023

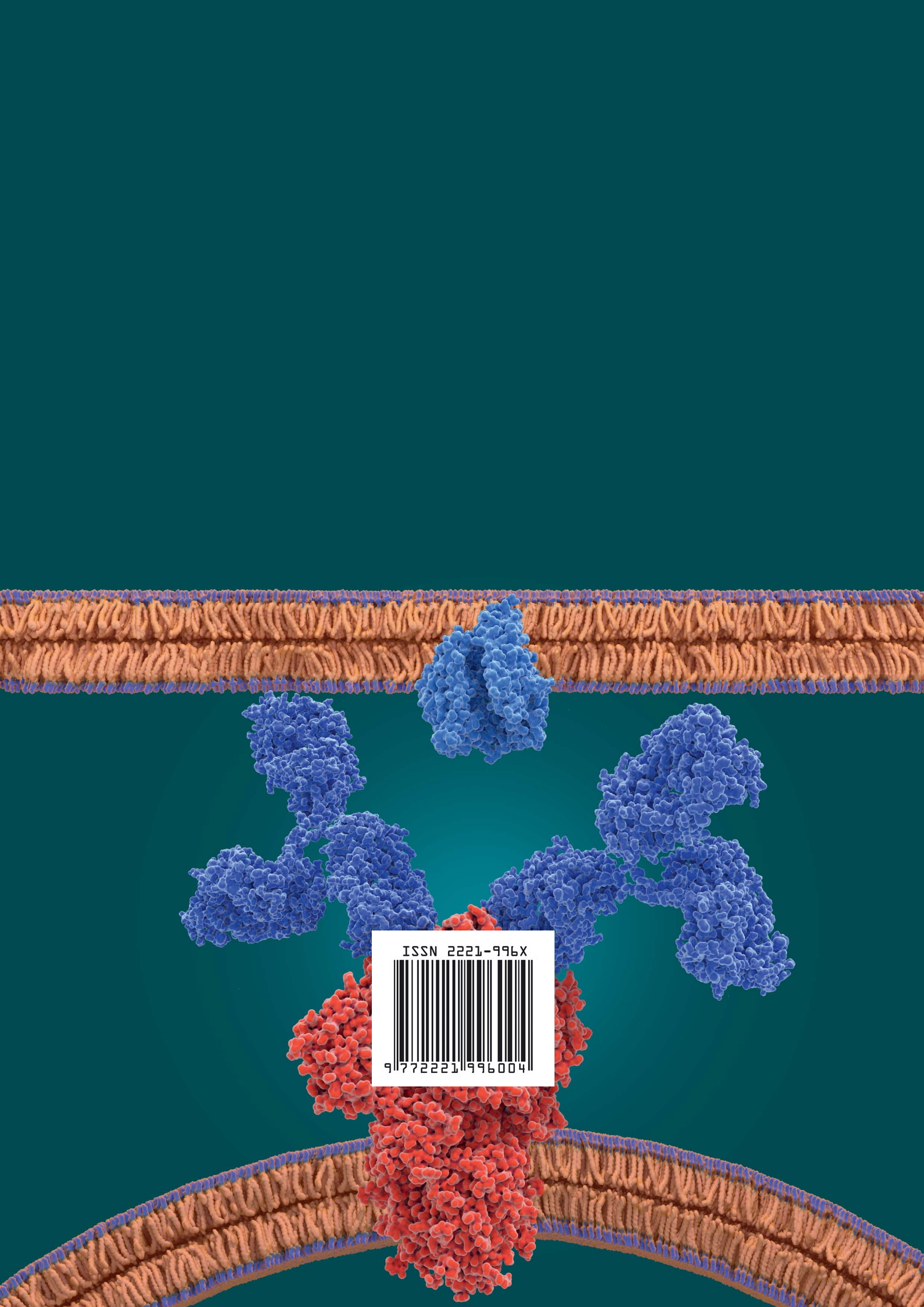
Revised 8 November 2023

Accepted 24 November 2023

Благодарности рецензентам Thank you to all our reviewers

Выражаем искреннюю признательность рецензентам, которые оказали неоценимую помощь при подготовке выпусков журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».
В 2023 г. объективную оценку и рекомендации авторам поступивших в редакцию рукописей дали:

Авдеева Ж.И. (Москва)	Курбатова Е.А. (Москва)
Алешкин А.В. (Москва)	Куслий А.Г. (Кольцово, Новосибирская обл.)
Алпатова Н.А. (Москва)	Кюрегян К.К. (Москва)
Амвросьева Т.В. (Минск, Республика Беларусь)	Лещенко А.А. (Киров)
Анисимов Р.Л. (Вольгинский, Владимирская обл.)	Лисицына О.М. (Вольгинский, Владимирская обл.)
Астрелина Т.А. (Москва)	Лобастов В.С. (Киров)
Бондарев В.П. (Москва)	Максимов Н.Л. (Санкт-Петербург)
Борисевич С.В. (Сергиев Посад, Московская обл.)	Макаревич П.И. (Москва)
Бубенчиков Р.А. (Москва)	Медведева О.А. (Курск)
Владимирский М.А. (Москва)	Мельникова Е.В. (Москва)
Волкова Р.А. (Москва)	Мионов А.Н. (Москва)
Гаврилова Л.Б. (Киров)	Мухачева А.В. (Москва)
Гончаров А.Е. (Минск, Республика Беларусь)	Найденова Е.В. (Саратов)
Гребенникова Т.В. (Москва)	Никитюк Н.Ф. (Москва)
Гурин К.И. (Киров)	Никифоров А.К. (Саратов)
Дармов И.В. (Киров)	Оксанич А.С. (Москва)
Дейкин А.В. (Белгород)	Орлова О.Р. (Москва)
Дубинкин И.В. (Москва)	Осин А.В. (Саратов)
Евсеев В.А. (Кольцово, Новосибирская обл.)	Охупкина В.Ю. (Киров)
Есмагамбетов И.Б. (Москва)	Пашенко Ю.И. (Сергиев Посад, Московская обл.)
Захарова Ю.А. (Москва)	Перунова Н.Б. (Оренбург)
Зинченко А.И. (Минск, Республика Беларусь)	Поддубиков А.В. (Москва)
Зурдинова А.А. (Бишкек, Кыргызская Республика)	Подколзин И.В. (Вольгинский, Владимирская обл.)
Иванов В.Б. (Москва)	Постнова Е.Л. (Москва)
Иванов Р.А. (Сириус, Краснодарский край)	Потанина О.Г. (Москва)
Ивановская Е.А. (Новосибирск)	Пятницкий А.М. (Москва)
Игнатьев Г.М. (Москва)	Рузанова Э.А. (Санкт-Петербург)
Ильичева Т.Н. (Кольцово, Новосибирская обл.)	Русанова Д.В. (Ставрополь)
Исупов С.Г. (Киров)	Саканян Е.И. (Москва)
Карань Л.С. (Москва)	Салимова Е.Л. (Санкт-Петербург)
Каратаев Г.И. (Москва)	Скирда Т.А. (Москва)
Карлина М.В. (Кузьмоловский, Ленинградская обл.)	Скоцелас Е.Д. (Москва)
Карякин А.В. (Москва)	Смирнов В.В. (Москва)
Касина И.В. (Москва)	Соколова Т.М. (Москва)
Козловская Л.И. (Москва)	Суханова С.М. (Москва)
Косман В.М. (Кузьмоловский, Ленинградская обл.)	Торопыгин И.Ю. (Москва)
Корнилова О.Г. (Москва)	Тыринова Т.В. (Новосибирск)
Краева Л.А. (Санкт-Петербург)	Устинникова О.Б. (Москва)
Красько А.Г. (Минск, Республика Беларусь)	Фаустова Н.М. (Кузьмоловский, Ленинградская обл.)
Кретенчук О.Ф. (Ростов-на-Дону)	Хамитов Р.А. (Вольгинский, Владимирская обл.)
Кузнецовский А.В. (Киров)	Черникова Н.К. (Сергиев Посад, Московская обл.)
Купраш Д.В. (Москва)	Шарова А.А. (Москва)



ISSN 2221-996X



9 772221 996004